

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

Д-Р ИВЕЛИНА ДИМИТРОВА МИХАЛЕВА

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ, ГЕНЕТИЧНИ И ГЕННО -
ЕКСПРЕССИОННИ ПРОУЧВАНИЯ НА ГЛЮКОЗНАТА
ХОМЕОСТАЗА И ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2**

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ: ДОЦ. Д-Р ПАВЛИНА ГАТЕВА, ДМ

ПРОФ. Д-Р ИВАНКА ДИМОВА, ДМ

СОФИЯ

2022 г.

Дисертационният труд съдържа 157 стандартни страници, 17 таблици и 33 фигури. Литературната справка включва 344 литературни източника, от които 8 на кирилица и 336 на латиница.

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| Съкращения..... | 3 |
| Въведение..... | 8 |
| Цел и задачи..... | 11 |
| Материали и методи..... | 12 |
| Резултати..... | 34 |
| Обсъждане..... | 56 |
| Изводи..... | 69 |
| Приноси..... | 71 |
| Научни публикации, участия в научни форуми и проекти..... | 72 |

СЪКРАЩЕНИЯ

АТФ – аденозин трифосфат

АХ - артериална хипертония

ВГТТ - венозен глюкозо-толерантен тест

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

ДПНП - диабетна полиневропатия

ЗД – захарен диабет

ИТМ - индекс на телесна маса

иРНК - информационна РНК

КАБ - коронарна артериална болест

кДНК - комплементарна ДНК

КЗГ - кръвна захар на гладно

МИ - миокарден инфаркт

ОГТТ – орален глюкозо-толерантен тест

РААС - ренин-ангиотензин-алдостеронова система

РНК - рибонуклеинова киселина

СЗО - Световна здравна организация

СМК - свободни мастни киселини

СН - сърдечна недостатъчност

ССЗ - сърдечно-съдови заболявания

ТГ- триглицериди

ФИ - фракция на изтласкване

ХБЗ - хронично бъбречно заболяване

ЦЕК - циркулиращи ендотелни клетки

ЦНС – централна нервна система

β -МЕ - β -Mercaptoethanol

АСЕ - ангиотензин конвертиращ ензим

AGEs - advanced glycation end products – крайни продукти на гликирането

Апо – аполипопротеин

BNP - B-type natriuretic peptide

CCL 2 - C-C motif chemokine ligand 2

СЕТР - cholesterol ester transfer protein

СрG - цитозин-фосфат-гуанин

CRP - C-reactive protein

DAMPs - damage-associated molecular patterns

DNMT – ДНК метилтрансферази

ECFC - endothelial colony forming cells - ендотелни колония-формиращи клетки

eNOS - endothelial nitric oxide synthase

EPC - endothelial progenitor cells - ендотелни прогениторни клетки

FVL - фактор V Leiden

GIP - gastric inhibitory polypeptide - гастро-инхибиторен полипептид

GLP-1 - glucagon-like peptide-1 - глюкагоноподобен пептид 1

GWAS - genome-wide association study

HATs - histone acetyltransferases

HbA1c – гликиран хемоглобин

HDACs - хистонови деацетилази

HDL - high density lipoprotein

HIF – hypoxia-inducible factor

HMGB-1 - high mobility group box 1

HMTs - хистонови метилтрансферази

HRP - horseradish peroxidase

HUVEC – human umbilical vein endothelial cells - човешки ендотелни клетки от умбиликалната вена

IDF – International Diabetes Federation - Международна диабетна федерация

IGF-1 - insulin-like growth factor 1

IL-1 β - интерлевкин 1 β

IL-6 – интерлевкин 6

iNOS - inducible nitric oxide synthase - индуциращата форма на NOS

IRS-1 - инсулин-рецепторен субстрат 1

LDL - low density lipoprotein

lncRNA - long non-coding RNA - дълги некодиращи РНК

LVMИ - left ventricular mass index

МАР киназа - mitogen-activated protein киназа

MCP1 - monocyte chemotactic protein 1

miRNA – микроРНК

MODY - Maturity Onset Diabetes of the Young

MTHFR - Methylene tetrahydrofolate reductase

NAD - nicotinamide adenine dinucleotide

NHANES III - The Third National Health and Nutrition Examination Survey

NOD - non-obese diabetic mice

ncRNA – non-coding RNA

NETs - neutrophil extracellular traps

NF- κ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO - азотен оксид

NOS - азотен оксид синтаза

NYHA - New York Heart Association

OASIS - Organization to Assess Strategies for Ischaemic Syndromes

PAD4 – peptidylarginine deiminase 4

PAI-1 - plasminogen activator inhibitor-1

PCR - полимеразна верижна реакция

PKC β II - протеин киназа C β II

PI3-киназа - фосфатидилинозитол 3-киназа

PPAR - peroxisome proliferator – activated receptor

RAGE –receptor for advanced glycation end products

Ras - Rat sarcoma oncogene

ROS - reactive oxygen species

RQ - relative quantification

SCF – stem cell factors - стволовоклетъчни фактори

SCFA - късоверижни мастни киселини

SCN - супрахиазматично ядро

SDF-1 - stromal-derived factor 1

TNF- α - tumor necrosis factor alpha

tPA - tissue plasminogen activator - тъканен плазминогенен активатор

VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule

VDR – vitamin D receptor - рецептор за витамин D

VDRE - витамин D респондърни елементи

VEGF - Vascular endothelial growth factor

VEGFR – рецептор за VEGF

VLDL - very low density lipoprotein

ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет е хронично метаболитно, но и социално-значимо заболяване, което показва тенденция за все по-широко разпространение в световен мащаб. Според последните данни на Международната диабетна федерация през 2021 г. броят на пациентите с диабет в света е 537 милиона във възрастта 20-79 години. През 2030 г. се очаква той да достигне 643 милиона, а през 2045 г. – 783 милиона, което представлява нарастване с 46%. Съществува силна връзка между диабета и сърдечно-съдовите заболявания, които са водеща причина за морбидност и смъртност сред диабетната популация. Атеросклеротичният процес настъпва в по-ранна възраст и има по-обширно засягане при пациентите със захарен диабет. Сърдечно-съдовите заболявания настъпват средно с около 10-15 години по-рано при пациенти с диабет. Около 2/3 от хората със захарен диабет тип 2 ще починат от някаква форма на сърдечно-съдово заболяване.

Захарният диабет се характеризира с количествени и качествени промени в коагулационните протеини, които колективно повишават резистентността към фибринолизата, което съответно увеличава риска от тромбоза. ценката на риска на базата на единични генетични варианти показва устойчива способност за идентифициране на пациенти с висок риск, което води до “рекласифициране” на риска. Генетичните фактори осигуряват допълнително силна оценка на риска при всички заболявания, като се явяват значима добавка към традиционните рискови фактори. В тази връзка е от особено важно значение да се идентифицират генетичните фактори, които биха могли да допринасят за увеличения сърдечно-съдов риск при пациентите със захарен диабет.

Съществуват данни, че регулацията на генната експресия е от съществено значение. Тя оказва влияние върху времето, мястото и количеството на определения генен продукт в дадена клетка и може да има ефект върху клетъчната структура и функция. Регулацията на генната експресия е основата за клетъчната диференциация, развитие, морфогенеза и адаптивността на всеки организъм. Установено е, че факторите на средата, външни и вътрешни, играят важна роля в определянето на функцията и вариабилността на клетките. Повечето клетки имат различна степен на фенотипна пластичност, а от друга страна фенотипът, определен от генотипа, зависи от външни фактори. Епигенетичните модификации представляват унаследяеми промени във функциите на гените, които се появяват без да има промяна в нуклеотидната последователност. Те са потенциално

обратими. Унаследените или спорадични епимутации, или нарушаване на регулацията на епигенома, могат да доведат до развитие на заболяване. Епигенетичните механизми може би играят съществена роля във все още липсващите унаследяеми детерминанти на комплексни заболявания като метаболитния синдром, атеросклерозата, артериалната хипертония, захарния диабет. Предполага се, че епигенетични механизми играят важна роля не само в развитието, но и в предиспозицията към метаболитни заболявания като захарен диабет тип 2. От друга страна съществуват данни, които подкрепят факта, че епигенетични процеси участват както в прогресията на плаките, така и в тяхното появяване при атеросклероза. Заключение е, че патогенетичните пътища, които са отговорни за развитието на захарен диабет тип 2 и сърдечно-съдови заболявания може би също имат епигенетичен произход и е важно тези епигенетични детерминанти, които участват в развитието и прогресията на тези заболявания да бъдат установени и изучени по-задълбочено. Установена е връзка на промените в нивата на циркулиращите miRNA с определени физиологични състояния. Но нивата на циркулиращите miRNA могат да варират и при различни заболявания. Тяхната експресия е различна при здрави хора и при такива със сърдечно-съдови заболявания. Предполага се, че miRNA могат да се използват и като биомаркери за диагнозата и прогнозата на съдовото ангажиране при болни от диабет пациенти, поради което установяването им е от много важно значение.

Хипергликемията при захарен диабет води до увреждане на кръвоносните съдове и до поява на усложнения на заболяването. Ендотелните прогениторни клетки (EPC) участват във възстановяването на ендотела и в процеса на ангиогенеза чрез секретиране на ангиогенни фактори или чрез инкорпориране в нарушения ендотел и диференциране в ендотелни клетки. EPC експресират различни маркери върху клетъчната си повърхност. Аберантни техни нива в периферната кръв са открити при различни клинични състояния като сърдечно-съдови, метаболитни, белодробни, онкологични, а също и при атеросклероза. Хипергликемията и ендотелната дисфункция са основните причини за съдовите усложнения при пациенти със захарен диабет. Необходимо е да се изучи експресията на съдово-ендотелните маркери, които имат отношение към развитието на диабета и възникването на неговите усложнения.

Освен участие в регулацията на калциево-фосфорната хомеостаза в организма, витамин D притежава и много други роли. 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 и някои

метаболитни заболявания. Витамин D участва в регулацията на 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 захарен диабет тип 2. Възстановяването на нивото на витамин D подобрява гликемията и инсулиновата секреция при пациенти с диабет тип 2 с установена хиповитаминоза D, като това предполага ролята му в патогенезата на заболяването. Кетогенната диета представлява нисковъглеводен, високомазнинен начин на хранене, който намира приложение при различни състояния - тя е подходяща за потискане на гърчовата активност при деца с рефрактерна епилепсия; евентуални терапевтични ползи от кетогенната диета са изучавани и в други неврологични състояния като болест на Алцхаймер, амиотрофична латерална склероза, главоболие, болест на Паркинсон, а също и при някои видове рак, гликогенози, синдром на поликистозни яйчници и много други. Ограничаването на въглеводите, приемани с храната, има позитивни ефекти върху сърдечно-съдовите параметри, намалява затлъстяването и подобрява метаболитния синдром. Съществуват данни, че кетодиетата води до намаляване на нивата на глюкозата и подобрява инсулиновата чувствителност. С оглед на изнесените по-горе данни е интересно да се установи влиянието на витамин D и на кетогенната диета върху експресията на инсулина и върху някои параметри на метаболитния синдром.

Известно е, че пациентите със захарен диабет тип 2 са с повишен сърдечно-съдов риск, развиват различни тежки микро – и макроваскуларни усложнения, имат и промени в някои метаболитни показатели. Установени са различни маркери, които допринасят за увеличаването на тези рискове, а именно генетични, епигенетични, съдово-ендотелни. От друга страна, все по-често се коментира участието на някои диетични режими като кетогенната диета и на витамин D, които пък биха имали позитивно влияние върху глюкозната хомеостаза. Важно е да се положат усилия да бъдат идентифицирани тези маркери с оглед откриването на хората в риск да развият заболяването, а също така и своевременно да могат с тяхна помощ да се вземат мерки за намаляване честотата на развитие на сърдечно-съдовите усложнения на захарния диабет.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на проучването

Целта на настоящото проучване е да се идентифицират някои от генетичните, епигенетичните и съдово-ендотелните маркери, обуславящи високия риск от ССЗ при хората с диабет, и да се проучи ролята на кетогенната диета и на витамин D върху глюкозната хомеостаза, и върху някои от показателите на метаболитния синдром.

Задачи на проучването

1. Да се проучи честотата на генетичните варианти, свързани със сърдечно-съдовия риск при пациенти със ЗД тип 2
2. Да се анализира нивото на някои miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2
3. Да се анализира експресията на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2
4. Да се проучи ефектът на кетодиетата върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром
5. Да се проучи ефектът на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследване на генетични варианти, свързани със сърдечно-съдов риск при пациенти със ЗД тип 2

Бяха събрани общо 36 проби от периферна венозна кръв – от 19 мъже и 17 жени, средна възраст $49,4 \pm 9,8$ (от 30 до 77 години). Те бяха разделени в две групи в зависимост от наличието на ССЗ: 20 пациенти със ЗД тип 2 и ССЗ и 16 пациенти със ЗД тип 2 без ССЗ (контроли). Основните характеристики са представени в таблица 1.

Таблица 1. Основни характеристики на участниците в подгрупите

| Параметри | ЗД тип 2 и ССЗ | ЗД тип 2 без ССЗ |
|--------------------------------|-----------------|------------------|
| брой | 20 | 16 |
| възраст (години) | $56,3 \pm 10,8$ | $42,5 \pm 10,8$ |
| ИТМ (kg/m^2) | $34,8 \pm 8,4$ | $38,1 \pm 13,7$ |
| НbA1c (%) | $8,8 \pm 1,8$ | $7,9 \pm 2,3$ |

Всички участници подписаха информирано съгласие и бяха запознати с целите, условията и рисковете от участието в проучването в съответствие с Декларацията от Хелзинки и правилата за Добра клинична практика, като проучването е одобрено от Комитета по етика на Медицинския университет - София. Всички участници бяха интервюирани за тяхната възраст, наличието на ЗД (диагнозата поставена съгласно определението на СЗО) и неговата продължителност, ССЗ (АХ, КАБ, инсулт). Бяха измерени антропометричните параметри – ръст (cm) и тегло (kg), и изчислен ИТМ по формулата kg/m^2 . При всички участници беше изследвано на гладно: НbA1c (NGSP сертифициран) в цели кръвни проби чрез имунотурбидиметричен метод (Roche Diagnostics). Статистическият анализ на данните се извърши чрез SPSS v.20.0 (SPSS, Chicago, USA). Данните са изразени като средна стойност \pm стандартно отклонение (SD). Student's T-тест и еднопосочен дисперсионен анализ са използвани за сравнение на непрекъснати променливи, и хи квадрат тест на Пийърсън за пропорционални сравнения. Р-стойност по-малка от 0.05 се счита за статистически значима.

Нашите данни не показват статистически значима разлика в разпределението на пола, средната възраст, ИТМ, HbA1c сред подгрупите, така че тези променливи не могат да повлияят резултатите от ДНК анализа.

Използван беше кит CVD StripAssay от Vienna Lab за идентифициране на мутации, свързани със ССЗ на базата на полимеразна верижна реакция (PCR) и обратна хибридизация. Анализът обхваща 12 мутации: *FV G1691A (Leiden)*, *FV H1299R (R2)*, *Prothrombin G20210A*, *Factor XIII V34L*, β -*Fibrinogen -455 G-A*, *PAI-1 4G/5G*, *GPIIIa L33P (HPA-1)*, *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *ACE I/D*, *Apo B R3500Q*, *Apo E2/E3/E4*.

CVD StripAssay[®]

REF 4-240



20 Tests



2-8°C

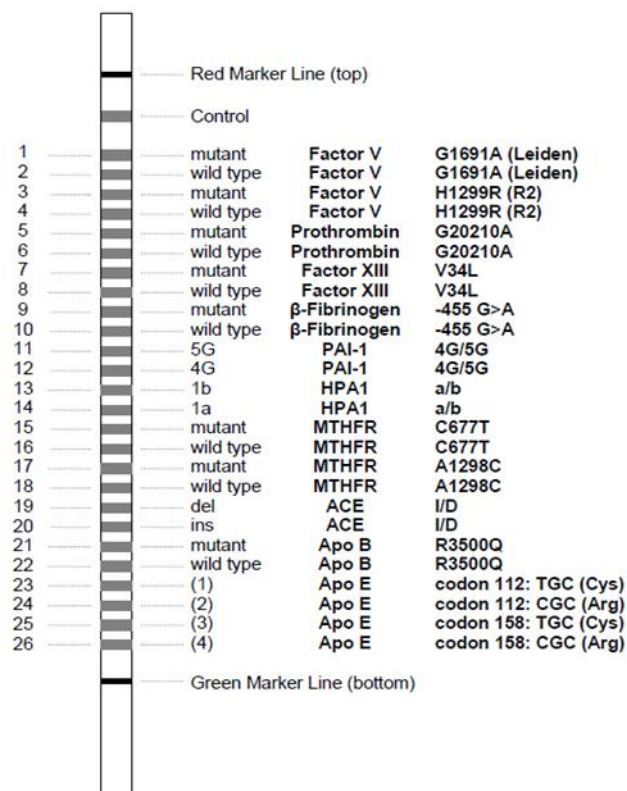
IVD



| | | | |
|-----|---|--------|---------|
| 1. | Lysis Solution | 50 ml | |
| 2. | GEN^XTRACT Resin | 5 ml | |
| | <i>Resuspend each time <u>immediately</u> before removing an aliquot.</i> | | |
| 3a. | Amplification Mix A (yellow cap) | 500 µl | |
| 3b. | Amplification Mix B (green cap) | 500 µl | |
| 4. | Taq Dilution Buffer (transparent cap) | 500 µl | |
| 5. | DNAT (blue cap) | 1.5 ml | R 36/38 |
| 6. | Typing Trays | 3 | |
| 7. | Teststrips | 20 | |
| 8. | Hybridization Buffer (white cap) | 25 ml | |
| 9. | Wash Solution A (white cap) | 80 ml | |
| 10. | Conjugate Solution | 25 ml | |
| 11. | Wash Solution B | 80 ml | |
| 12. | Color Developer | 25 ml | |

Фигура 1. Предоставени консумативи в CVD StripAssay кит от Vienna Lab

Процедурата включва три етапа: 1. Изолиране на ДНК; 2. PCR амплификация с помощта на биотинилирани праймери; 3. Хибридизация на амплификационни продукти върху тест лента, съдържаща специфични за алела олигонуклеотидни сонди, обездвижени като масив от паралелни линии (фигура 2). Свързани биотинилирани последователности се откриват с помощта на стрептавидин-алкална фосфатаза и цветни субстрати.



Фигура 2. Тест лента за отчитане на алел-специфичната хибридизация

In vitro амплификация (PCR; 2 отделни реакции на проба)

Всички стъпки до стартиране на програмата за термичните цикли се извършват върху лед (0-4 ° C).

1. Приготвя се прясно работно разреждане (0,2 U / μl) на Taq ДНК полимераза в буфер за разреждане на Taq (прозрачна капачка).
2. Подготвят се две реакционни епруветки за всяка проба, която ще бъде амплифицирана. Епруветките се поставят върху лед.
3. За всяка проба се приготвят 2 окончателни PCR реакционни смеси (А и В) върху лед (таблица 2).

Таблица 2. Съдържание на реакционни смеси А и В

| | |
|--|---|
| 15 μl Амплификационен микс А (жълта капачка) | 15 μl Амплификационен микс В (зелена капачка) |
| 5 μl разредена Taq ДНК полимераза (1U) | 5 μl разредена Taq ДНК полимераза (1U) |

| | |
|-------------------|-------------------|
| 5 µl ДНК темплейт | 5 µl ДНК темплейт |
|-------------------|-------------------|

4. Затварят се плътно епруветките. Загрява се термоциклерът до 94 ° С.
5. Поставят се реакционните епруветки и изпълнява следната програма за термоциклиране (таблица 3):

Таблица 3. Програма за PCR

| Стъпка | Времетраене | Температура | Коментар |
|--|-------------|-------------|-------------------------|
| Начална стъпка на активиране (Pre-PCR) | 2 минути | 94 °С | Активира Taq Polymerase |
| 3-стъпков цикъл | | | |
| Денатурация | 15 сек. | 94 °С | |
| Анилинг | 30 сек. | 58 °С | |
| Екстензия | 30 сек. | 72 °С | |
| Брой на циклите – 35 | | | |
| Крайно удължаване | 3 минути | 72 °С | |

Амплификационните продукти се съхраняват на лед или при 2-8 ° С за по-нататъшна употреба.

Проверка с електрофореза

Анализират се продуктите на амплификация чрез гел електрофореза (2,8% агарозен гел).

Дължини на фрагментите:

134, 156, 173, 202, 223, 254, 297, 324 bp (амплификационен продукт А)

225, 248, 283, 346 bp (амплификационен продукт В)

1. Приготвя се агарозен гел с концентрация 2,8 % като в 100 ml 1x TAE Буфер се миксира приблизително 2,8 g агароза.

2. Поставя се в микровълнова за 1-3 минути на максимална температура и когато започне да се забелязва кипене се изважда и разклаща. Проверява се дали агарозата е започнала да се разтапя.
3. Температурата се намалява на минимум за още 1-3 минути. Отново се вади и разклаща. Температурата се увеличава на максимум като се внимава да не изкипи.
4. Когато агарозата е напълно разтворена се изважда и се добавят 10 μl етидиев бромид. Разклаща се внимателно за пълно смесване и гелът се отлива във ваничката с гребен, за да стегне.
5. Към амплификационните продукти се добавя Loading буфер в съотношение 3 μl PCR продукт към 3 μl буфер, и се хомогенизират с пипета.
6. Стегнатият гел се поставя в електрофорезата и се изливат 350 – 400 ml 1xTAE буфер до пълно покриване на гела.
7. Подготвените проби се отпипетират в кладенчетата на гела.
8. Гелът се пуска на приблизително 135 V за 35-40 минути и се снима на UV лампа.

Хибридизация (45 ° C; водна баня с клатъчна система)

Начало на хибридизацията

1. Загрива се водната баня до точно 45 ° C ($\pm 0,5$ ° C). Предварително се затопля Хибридизационен буфер и Wash разтвор от А до 45 ° C, за да се разтворят всички утайки.
2. Загрива се и клатъчната платформа до 45 ° C.
3. Тест лентите, DNAT, Conjugate Solution, Wash разтвор В и Color Developer да достигнат стайна температура. Подготвя се Typing Tray(s).
4. Взима се по една тест лента за всяка проба, като се използват чисти пинсети. Надписват се извън маркерните линии с молив.
5. 20 μl DNAT (синя капачка) се поставя в долния ъгъл на улея на съответната проба в тавата за въвеждане (по една лента на проба).
6. Добавя се 8,5 μl амплификационен продукт А в съответната капка DNAT. Добавя се 8,5 μl амплификационен продукт В в същата капка. Миксира се старателно с пипета. (Разтворът ще остане син.)
7. Остава се да престои 5 минути при стайна температура.
8. Добавя се 1 ml Хибридизиращ буфер (предварително затоплен до 45° C) във всяка лента. Внимателно се разклаща тавата. (Синият цвят ще изчезне.)

9. Поставят се тест лентите с маркираната страна нагоре (видими линии!) в съответните ленти. Потопят се напълно.
10. Инкубиране за 30 минути при 45 ° C на клатачната платформа. Задава се умерена честота на разклащане (приблизително 50 об / мин), за да се избегне разливане. Капака на платформата се държи затворен, за да се избегнат промени в температурата.
11. В края на инкубацията се отстраняват хибридизационните разтвори чрез пипета от 1ml.

Продължава се незабавно, за да не се позволи на тест лентите да изсъхнат по време на цялата процедура.

Пълно измиване (45 ° C с клатачка)

1. Добавя се 1 ml Wash разтвор А (Wash Solution А) (предварително загрят до 45 ° C). Промива се на клатачната платформа за кратко (10 сек.). Отстраняват се течностите чрез вакуум аспирация.
2. Добавя се 1 ml Wash разтвор А (45° C).
3. Инкубира се за 18 минути. при 45° C на клатачна платформа. Отстраняват се течностите чрез вакуум аспирация.
4. Добавя се 1 ml Wash разтвор А (45° C).
5. Инкубира се за 18 минути. при 45° C на клатачна платформа. Отстраняват се течностите чрез вакуум аспирация.
6. На 15. минута се отваря капакът и се сваля температурата на клатачната платформа.

Проявяване на цвета (стайна температура)

1. Добавя се 1 ml Съединяващ разтвор (Conjugate solution).
2. Инкубира се за 15 минути при стайна температура на клатачната платформа. Течностите се отстраняват чрез вакуум аспирация.
3. Добавя се 1 ml Wash разтвор В. Промива се на клатачната платформа за кратко (10 сек). Течностите се отстраняват чрез вакуум аспирация.
4. Добавя се 1 ml Wash разтвор В. Инкубира се за 6 минути при стайна температура на клатачната платформа. Течностите се отстраняват чрез вакуум аспирация.

5. Добавя се 1 ml Color Developer. Инкубира се за 2-6 минути при стайна температура в тъмното на клатачната платформа. Лилаво оцветяване ще се появи при положителна реакция.
6. Тест лентите се измиват 1-2 пъти с дестилирана вода. Оставят се да изсъхнат на тъмно върху абсорбираща хартия. Не се излагат на интензивна светлина след проявяването на цветовете.

Тълкуване на резултатите

Генотипът на пробата се определя с помощта на приложения Collector™ лист. Поставя се обработеният Teststrip в едно от определените полета, подравнява се към схематичния чертеж с помощта на червената маркерна линия (отгоре) и зелената маркерна линия (отдолу) и се фиксира с лепило. Положителна реакция на най-горната контролна линия показва правилната функция на Conjugate Solution и Color Developer. Тази линия винаги трябва да се оцветява положително. За всяка полиморфна позиция трябва да се получи един от следните модели на оцветяване, като интензитетът на оцветяване на положителните линии може да варира (фигура 3). Това няма никакво значение за резултата.

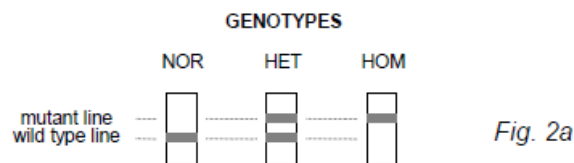


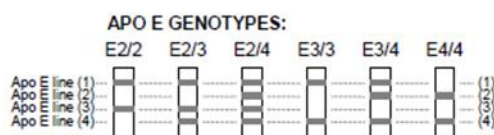
Fig. 2a

| | wild type line | mutant line | genotype |
|-----|-----------------|-----------------|-------------------|
| NOR | positive | negative | normal |
| HET | positive | positive | heterozygous |
| HOM | negative | positive | homozygous mutant |

Фигура 3. Модели на оцветяване на тест лента

За трите *Apo E* изоформи *E2*, *E3* и *E4* се получават следните модели на оцветяване (фигура 4):

E2 (112: Cys, 158: Cys) lines (1) + (3)
 E3 (112: Cys, 158: Arg) lines (1) + (4)
 E4 (112: Arg, 158: Arg) lines (2) + (4)



Фигура 4. Модели на оцветяване на тест лента за Apo E

Шестте възможни хомозиготни и хетерозиготни *apo E* генотипа (*E2/2*, *E3/3*, *E4/4*, *E2/3*, *E2/4*, *E3/4*) ще доведат до комбинация от съответните отделни изоформи.

След определянето на алелните честоти за всеки от изследваните генетични варианти те бяха сравнени с популационните честоти, съобщени в общодостъпните геномни база данни - The Genome Aggregation Database (gnomAD), 1000 Genomes Project phase 3 database, Ensembl Genome Browser.

Анализ на нивото на някои miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2

Бяха събрани кръвни проби от 15 пациенти със ЗД тип 2 (диагнозата поставена спрямо критериите на СЗО), разделени в следните групи – 6 със ЗД без ССЗ и 9 със ЗД и ССЗ. Всички пациенти декларираха своето писмено информирано съгласие и бяха подробно запознати с целите, методите и рисковете от участието в проучването в съответствие с Хелзинкската декларация и правилата за Добра клинична практика. Изследването е одобрено от Комитета по етика на Медицински университет - София. Основните характеристики на пациентите са представени в таблица 4.

Таблица 4. Основни характеристики на участниците в подгрупите

| Параметри | ЗД тип 2 без ССЗ | ЗД тип 2 и ССЗ |
|--------------------------|------------------|----------------|
| Брой | 6 | 9 |
| Пол (мъже/жени) | 3/3 | 5/4 |
| Възраст (години) | 52.8±4.2 | 55.7±7.7 |
| ИТМ (kg/m ²) | 34.6±3.4 | 34.0±2.7 |
| НbA1c (%) | 8.8±1.8 | 8.7±2.1 |

Пациентите са интервюирани за наличие и продължителност на ЗД тип 2, наличие на ССЗ (АХ, КАБ, инсулт). Бяха измерени антропометричните параметри – ръст (cm) и тегло (kg), и изчислен ИТМ по формулата kg/m^2 . При всички участници беше изследвано на гладно: HbA1c (NGSP сертифициран) в цели кръвни проби чрез имунотурбидиметричен метод (Roche Diagnostics).

Изолира се РНК от плазма като се използва кит за *екстракция на РНК* miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) и се следва протоколът:

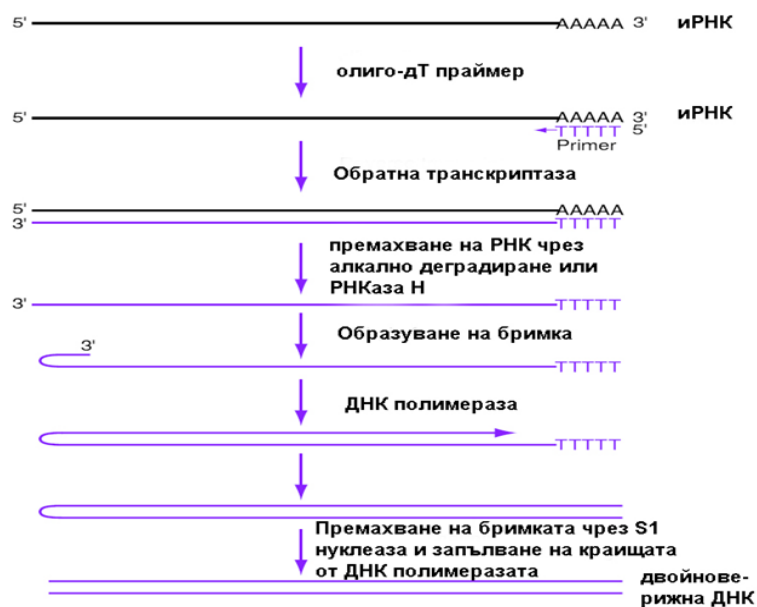
1. Приготвя се плазмата
2. Прехвърля се 200 μl от плазмата в 2 ml тръбичка
3. Добавя се 60 μl Buffer RPL. Затваря се капачката и се вортексира за над 5 секунди. Остава се на стайна температура (15–25°C) за 3 минути
4. Добавя се 20 μl Buffer RPP. Затваря се капачката и се смесва интензивно чрез вортексиране за над 20 секунди. Инкубира се на стайна температура за 3 минути
5. Центрофугира се на 12 000 оборота за за 3 минути на стайна температура
6. Трансферира се супернатантът (около 230 μl за 200 μl плазма) в нова тръбичка. Добавя се 1 обем изопропанол. Смесва се добре чрез вортексиране.
7. Прехвърля се цялата проба в колонка RNeasy UCP MinElute. Затваря се капакът и се центрофугира за 15 секунди на $\geq 8\ 000$ оборота. Утайката се отстранява.
8. Пипетира се 700 μl Buffer RWT в колонката RNeasy UCP MinElute. Затваря се капакът и се центрофугира за 15 секунди на $\geq 8\ 000$ оборота. Утайката се отстранява.
9. Пипетира се 500 μl Buffer RPE в колонката RNeasy UCP MinElute. Затваря се капакът и се центрофугира за 15 секунди на $\geq 8\ 000$ оборота. Утайката се отстранява.
10. Добавя се 500 μl 80% етанол към колонката RNeasy UCP MinElute. Вниматерно се затваря капакът се центрофугира за 2 минути на $\geq 8\ 000$ оборота за да се измие мембраната на колонката. Утайката се отстранява. След центрофугирането внимателно се отстранява колонката от събирателната тръбичка, за да няма колонката контакт с утайката. В противен случай ще има пренос на етанол.
11. Колонката се поставя в нова 2 ml събирателна тръбичка. Отваря се капачето на колонката и се центрофугира на максимална скорост за 5 секунди, за да се изсуши мембраната. Изхвърлят се утайката и събирателната тръбичка.

12. Поставя се колонката в нова 1.5 ml събирателна тръбичка. Добавя се 20 μ l RNase-free water директно в центъра на мембраната на колонката и се инкубира за 1 минута. Затваря се капакът и се центрофугира за 1 минута на максимална скорост, за да се елуира РНК.

За измерване концентрацията и качеството на изолираната тотална РНК беше използван NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Масачузетс, САЩ). Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната $\lambda=260\text{nm}$ от пуриновите и пиримидиновите бази на ДНК и РНК. Абсорбцията при $\lambda=280\text{nm}$ дава концентрацията на белтъците. Отношението на абсорбциите, измерени съответно при $\lambda 260$ и $\lambda 280$, показва чистотата на ДНК/РНК. Чистите ДНК проби дават A260/280 съотношение приблизително 1.8 като стойности под 1.6 показват наличието на примеси от белтъци, а над 2 - примеси от РНК. Чистите РНК проби дават A260/280 съотношение от около 2 като в този случай стойности под 1.8 показват примеси от белтъци. Върху съотношението A260/280 влияние оказва и киселинността на пробите. Съотношението A260/A230 дава представа за съдържанието на други контаминиращи вещества, които абсорбират при $\lambda 230$ или $\lambda 260$. 79 Чистите проби имат съотношение на A260/A230 в обхвата 2-2.2.

Обратна транскрипция – по същество представлява процес, при който се синтезира комплементарна ДНК от РНК като матрица. Осъществява се от ензима РНК-зависима ДНК-полимераза (обратна транскриптаза). Този ензим има две активности - ДНК полимеразна – добавя нуклеотиди, и - РНКазна Н активност – отговорна е за разграждането на РНК матрицата след обратната транскрипция в хетеродуплекса ДНК-РНК.

Механизъм на обратната транскрипция - Първо се използва oligo-dT праймер, закачащ се за polyA, и се синтезира комплементарен праймер от 5'-3' края. Синтезира се хетеродуплекс ДНК-РНК. Обратната транскриптаза разгражда РНК от дуплекса. Едноверижните нуклеинови киселини имат склонност да образуват третични структури поради хидрофобността на базите. 3' краят се огъва и може да послужи като праймер за синтезата на комплементарна верига. Получава се двуверижна ДНК, която в единия край е съединена. Тази структура се разпознава от S1 нуклеаза и се запълват краищата на веригата – фигура 5.



Фигура 5. Механизъм на обратната транскрипция.

50 ng от общата РНК от всяка проба се употреби, за да се получи комплементарна ДНК (кДНК), като се използва QuantiTect Reverse Transcription Kit, следвайки протокола:

1. РНК се поставя на лед. Съдържанието на кита - gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix, and RNase-free water, се размразяват на стайна температура. Центрофугира се за кратко, за да се събере останалата течност от стените на съда, и се оставя на лед.
2. Приготвяне за елиминационната реакция на геномната ДНК – на лед (таблица 5).

Таблица 5. Елиминационна реакция на геномната ДНК

| Компонент | Обем/реакция | Финална концентрация |
|----------------------------|------------------|----------------------|
| gDNA Wipeout buffer, 7x | 2 µl | 1x |
| Матрична РНК | Варира (до 1 µg) | |
| RNase-free water | Варира | |
| Тотален обем | 14 µl | |

3. Инкубиране за 2 минути на 42°C. След това веднага се поставя на лед.
4. Приготвяне на master mix за обратната транскрипция – таблица 6

Таблица 6. Компоненти на реакцията обратна транскрипция

| Компонент | Обем/реакция | Финална концентрация |
|------------------------------------|--------------|----------------------|
| QuantiScript Reverse Transcriptase | 1 µl | |
| QuantiScript RT buffer, 5x | 4 µl | 1x |
| RT primer mix | 1 µl | |
| Общ обем | 20 µl | |

5. Добавя се РНК от стъпка 3 (14 µl) към master mix и се поставя на лед.
6. Инкубира се за 15 минути на 42°C.
7. Инкубиране за 3 минути на 95°C, за да се инактивира QuantiScript Reverse Transcriptase
8. Добавя се кратно количество на всяка завършена реакция на обратна транскрипция към real-time PCR mix. Реакциите на обратна транскрипция се съхранява на -20°C до извършване на real-time PCR

Real time PCR – ‘чрез този метод се наблюдава амплифицирането на таргетната ДНК молекула по време на PCR в реално време, а не в края на процеса, както при конвенционалната PCR. Багрилото SYBR Green позволява проследяване хода на PCR реакциите. Молекулите на багрилото интеркалират с ДНК – когато се закачат за малката бразда на двойно верижните спирали те започват да флуоресцират. Точното определяне на количеството на изследваната секвенция става с помощта на стандартна крива, за построяването на която се използват серийни разредки на проба, съдържаща предварително известни количества от същата последователност. В хода на PCR реакцията се отчита флуоресценцията на всяка от разреdkите и се построява графика на зависимостта на светенето от концентрацията им. Така построената графика се използва

за да се определи на каква концентрация съответства измерената в неизвестната проба флуоресценция.

Експресията на miRNA се оцени като се използва miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen) с 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). Използваха се miRNA праймери за шест miRNA: miRNA-16, miRNA-155-3p, miRNA-155-5p, miRNA-210-3p, miRNA-221-3p и miRNA-424-5p. Реакциите бяха изпълнени спрямо протокола:

1. Размразяват се 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, кДНК, праймерите и RNase-free water
2. Приготвя се реакционната смес – таблица 7:

Таблица 7. Приготвяне на реакционната смес

| Компонент | Обем/реакция | Финална концентрация |
|--|---------------------------|-----------------------------|
| 2xQuantiTect SYBR Green PCR Master mix | 25 μ l (12,5 μ l) | 1x |
| 10xQuantiTect Primer Assay | 5 μ l (2.5 μ l) | |
| RNase-free water | Варира | |
| кДНК (добавя се при стъпка 4) | Варира (4 μ l) | <100 ng/реакция |
| Тотален обем | 50 μ l | |

3. Смесване на реакционната смес и се разпределя в ямките на плаката
4. Добавят се кДНК в ямките на плаката
5. Програмира се real-time cycler – таблица 8:

Таблица 8. Условия за провеждане на Real Time PCR

| Стъпка | Времетраене | Температура | Коментар |
|------------------------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Начална стъпка на активиране | 15 мин. | 95 °C | Активира HotStar DNA Polymerase |
| 3-стъпков цикъл | | | |
| Денатурация | 15 сек. | 94 °C | |
| Анилинг | 30 сек. | 55 °C | |
| Екстензия | 30 сек. | 72 °C | Събира флуоресцентните данни |
| Брой на циклите – 35-40 | | | |

6. Плаката се поставя в real-time cycler и се стартира програмата

RQ (relative quantification) на плазмените нива на miRNA на таргетната група се анализира чрез $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода. $RQ \geq 2$ се определи като свръхекспресия, $RQ < 0,5$ като намалена експресия, а RQ между 1,99 и 0,5 – без промяна в експресията.

Методът $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (относителен анализ) дава информация за разликата в нивата на експресия между две проби и се изчислява чрез следните уравнения:

$$\Delta Ct \text{ проба} = Ct \text{ прицелен ген} - Ct \text{ ендогенна контрола}$$

$$\Delta Ct \text{ контрола} = Ct \text{ прицелен ген} - Ct \text{ ендогенна контрола}$$

$$\Delta Ct \text{ проба} - \Delta Ct \text{ контрола} = \Delta\Delta Ct$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Референтна проба – пасивен или активен сигнал се използва за нормализиране на експерименталните резултати. Пример за активни референтни проби са ендогенните и екзогенните контроли. При активните ендогенни проби сигналът се генерира като

резултат от PCR амплификацията. Тя има свой собствен набор от праймери и сонда. Ендогенна контрола – РНК или ДНК, която се съдържа във всяка експериментална проба. Чрез използване на ендогенни контроли като активни референтни проби може да се нормализира количествената оценка на иРНК за разлики в тоталната РНК, добавена към реакцията.

За статистически анализ се използва SPSS software, версия 16.8 23.0 за Windows (IBMSPSS, NY, USA). Стойност на $p < 0.05$ се приема за статистически значима.

Анализ на експресията на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2

Бяха събрани кръвни проби от здрави контроли (с нормален глюкозен толеранс, $n = 12$) и пациенти със ЗД тип 2 ($n = 27$). Диагнозата ЗД е поставена съгласно критериите на СЗО. Пациентите бяха подразделени според продължителността на диабета: с новодиагностициран ЗД тип 2 ($n = 9$); ЗД тип 2 с продължителност ≤ 5 години, но не и новодиагностициран ($n = 9$); и ЗД тип 2 с продължителност над 5 години ($n = 9$). Всички пациенти са декларирали своето писмено информирано съгласие и са били запознати с целите, методите и рисковете от участието в проучването в съответствие с Хелзинкската декларация и правилата за Добра клинична практика, като изследването е одобрено от Комитета по етика на Медицински университет - София. Основните характеристики на пациентите са представени в таблица 9.

Таблица 9. Основни характеристики на участниците в подгрупите

| Параметри | Новодиагностициран ЗД тип 2 | ЗД тип 2 с давност ≤ 5 години | ЗД тип 2 с давност над 5 години |
|--------------------------|--|--|--|
| Брой | 9 | 9 | 9 |
| Пол (мъже/жени) | 6/3 | 5/4 | 5/4 |
| Възраст (години) | 62.0 \pm 7.5 | 51.3 \pm 14.0 | 55.7 \pm 7.7 |
| ИТМ (kg/m ²) | 34.8 \pm 8.4 | 38.1 \pm 13.7 | 34.0 \pm 2.7 |
| НbA1c (%) | 7.9 \pm 2.3 | 8.8 \pm 1.8 | 8.7 \pm 2.1 |
| Давност (години) | 0 | 2.2 \pm 0.8 | 6.8 \pm 1.9 |
| АХ (%) | 6/9 (66.9) | 8/9 (88.9) | 8/9 (88.9) |

Пациентите са интервюирани за наличие и продължителност на ЗД тип 2, наличие на АХ и други хронични заболявания и усложнения на заболяването, включително и ДПНП. От всички пациенти със ЗД тип 2 17 са с ДПНП, а 10 нямат това усложнение. Изчислен е ИТМ по формулата kg/m^2 . Артериалното кръвно налягане е измервано в стандартни условия. При всички участници беше измерен на гладно HbA1c (NGSP сертифициран метод) в цели кръвни проби чрез имунотурбидиметричен метод (Roche Diagnostics).

Кръвните проби от пациентите ($n = 27$) и контролите ($n = 12$) бяха използвани за пречистване на обща РНК за експресионен анализ на гените *VEGFR1* и *VEGFR 2* в клетки от периферна кръв. РНК е изолирана чрез QIAamp RNA Blood Kit (Qiagen), следвайки протокола:

1. Смесват се 1 обем цяла кръв с 5 обема Buffer EL.
2. Сместа се инкубира за 10-15 мин на лед. Двукратно по време на инкубацията се размесва чрез вортексиране.
3. Центрофугира се на 400 оборота за 10 минути на 4°C и супернатантът се отделя.
4. Добавят се 2 обема Buffer EL към 1 обем цяла кръв и се вортексира.
5. Центрофугира се на 400 оборота за 10 минути на 4°C и супернатантът се отделя.
6. Добавя се Buffer RLT в количество 350 μl при до 0,5 ml кръв или 600 μl при кръв 0,5-1,5 ml и се размесва.
7. Лизатът се пипетира директно в колонка в 2 ml събирателна тръбичка и се центрофугира за 2 минути на максимална скорост, за да се хомогенизира. Маха се колонката и се запазва хомогенизираният лизат.
8. Добавя се 1 обем 70% етанол към хомогенизирания лизат и се размесва чрез пипетиране. Не се центрофугира.
9. Внимателно се пипетира пробата, включително и преципитатите, ако има такива, в нова колонка в 2 ml събирателна тръбичка. Центрофугира се за 15 секунди на ≥ 8000 оборота.
10. Колонката се прехвърля в нова 2 ml събирателна тръбичка. Добавя се 700 μl Buffer RW1 към колонката и се центрофугира за 15 секунди на ≥ 8000 оборота.
11. Колонката се прехвърля в нова 2 ml събирателна тръбичка. Пипетира се 500 μl Buffer RPE в колонката и се центрофугира за 15 секунди на ≥ 8000 оборота.
12. Внимателно се отваря колонката и се добавя 500 μl Buffer RPE. Центрофугира се на максимална скорост за 3 минути.

13. Колонката се прехвърля в нова 2 ml събирателна тръбичка като старата се изхвърля заедно с филтрата. Центрофугира се на максимална скорост за 1 минута.
14. Колонката се прехвърля в 1,5 ml тръбичка и се пипетира 30–50 μ l of RNase-free water директно върху мембраната. Центрофугира се за 1 минута на ≥ 8000 оборота.

За измерване концентрацията и качеството на изолираната тотална РНК беше използван NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Масачузетс, САЩ). Количество от 500 ng от всяка РНК проба е подложено на обратна транскрипция до кДНК като се използва QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). Използваха се праймери RT² qPCR Primer Assay for Human *VEGFR1* и *VEGFR2* (Qiagen). Real time PCR се извърши като се използва miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen). Общият обем на всяка реакция е 50 μ l с по-малко от 100 ng кДНК за една реакция. Условието на амплификация на всеки real time PCR цикъл бяха както следва: реакция на денатуриране при 94°C за 15 секунди, етап на отгряване на праймер при 55°C за 30 секунди, последвано от удължаване на праймера - 72°C за 30 sec. Протоколите са представени по-горе. Нивата на експресия на *VEGFR1* и *VEGFR2* бяха нормализирани към GAPDH, използвайки Δ Ст калкулациите. Беше изчислена относителната експресия на *VEGFR1* и *VEGFR2* във всяка пациентска група спрямо експресията на този фактор при контролите. $RQ \geq 2$ се определи като свърхекспресия, $RQ < 0,5$ като намалена експресия, а RQ между 1,99 и 0,5 – без промяна в експресията.

Анализ на ефектите на кетогенната диета и на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром

Четири групи мъжки мишки (n=10 във всяка група) бяха разделени на следните групи – на стандартна диета (контролна група), на кетогенна диета, суплементирани с витамин D и приемащи кетодиета с витамин D. След 1 месец на третиране мишките бяха сакрифицирани според приетите етични стандарти и бяха събрани проби от панкреасна тъкан, които се замразиха на -70°C. 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 ketoCal 4:1 ad libitum. 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 беше

3.5 g или приблизително 30 UI дневен прием на витамин D на мишка. Съставът на диетите е представен в таблица 10.

Таблица 10. Състав на диетите

| | Nutricia KetoCAL 4:1 | Стандартна храна за гризачи |
|---------------------|---------------------------------|--|
| Нутриенти | на 100 g | на 100 g |
| енергия, kcal (kJ) | 705(2950) | 335 (1400) |
| белтък, g | 14.4 | 20 |
| въглехидрат.g | 8.2 | 59.4 |
| влакнини, g | 5.3 | 4.8 |
| • разтворими, g | 3.2 | 2.4 |
| • неразтворими, g | 2.1 | 2.4 |
| мазнини.g | 69.2 | 4.8 |
| • наситени, g | 26.7 | 0.74 |
| • мононенаситени,g | 22.8 | 2 |
| • полиненаситени, g | 19.7 | 1.77 |
| • витамин D UI | 100 | 100 |

Животните бяха отглеждани при стандартни лабораторни условия. Експериментът се проведе през м. юни 2020г. 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 гените: *Ins 1* (кодиращ инсулин), *GSK* (кодиращ глюкокиназа), *ABCC8* и *KCNJ11* (кодиращи двете субединици SUR1 и Kir6.2 на АТФ-чувствителния

калиев канал) в панкреасните клетки. РНК беше изолирана чрез кит RNeasy Kit (Qiagen) като се спази протоколът:

Преди започване на изолирането β -Mercaptoethanol (β -МЕ) се добавя към Buffer RLT. Прибавя се 10 μ l β -МЕ на 1 ml Buffer RL. Buffer RPE се използва като консервант. Преди да се използва за пръв път се добавят 4 обема етанол.

1. Изрязва се тъканната проба. Използва се не повече от 30g.
2. Тъканта се поставя в подходящ съд за хомогенизиране.
3. Тъканта се раздробява и се хомогенизира лизатът с Buffer RLT. При количество на тъканта 20 - 30 g се използва 600 μ l буфер. Използва се ротор до пълно хомогенизиране.
4. Лизатът се центрофугира за 3 минути на максимална скорост. Чрез пипетиране внимателно се отстранява супернатантът и се прехвърля в нова центрофужна колонка. В следващите стъпки се използва само този супернатант (лизат).
5. Добавя се 1 обем 70% етанол към пречистения лизат и веднага се смесва чрез пипетиране. Не се центрофугира.
6. Прехвърля се до 700 μ l от пробата включително и преципитатите, ако има такива, в колонка, поставена в 2 ml събирателна тръбичка. Центрофугира се за 15 секунди на ≥ 8000 оборота. Утайката се изхвърля.
7. Добавя се 700 μ l Buffer RW1 към колонката и се центрофугира за 15 секунди на ≥ 8000 оборота. Утайката се изхвърля.
8. Добавя се 500 μ l Buffer RPE към колонката и се центрофугира за 15 секунди на ≥ 8000 оборота. Утайката се изхвърля.
9. Добавя се 500 μ l Buffer RPE към колонката и се центрофугира за 2 минути на ≥ 8000 оборота.
10. Колонката се поставя в нова 2 ml събирателна тръбичка и старата се изхвърля заедно с утайката. Центрофугира се за 1 минута на максимална скорост.
11. Колонката се поставя в нова 1.5 ml събирателна тръбичка. Добавя се 30–50 μ l RNase-free water директно върху мембраната на колонката. Центрофугира се за 1 минута на ≥ 8000 оборота, за да елуира РНК.

За измерване концентрацията и качеството на изолираната тотална РНК беше използван NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Масачузетс, САЩ). Количество от 500 ng от всяка РНК проба беше подложено на обратна транскрипция до кДНК (QuantiTect Reverse Transcription kit, Qiagen). Използвани са праймери RT² qPCR Primer Assay for Mouse

(Qiagen). Амплификацията чрез PCR в реално време (real time PCR) беше извършена с Rotor-Gene инструмент. Общият обем на всяка реакция беше 50 μ l с по-малко от 100 ng кДНК за една реакция. Условиата на амплификация на всеки real time PCR цикъл бяха както следва: реакция на денатуриране при 94°C за 15 секунди, етап на праймер анийлинг при 55°C за 30 секунди, последвано от удължаване на праймера - 72°C за 30 sec. Протоколите са представени по-горе. Нивата на експресия на *Ins 1*, *GCK*, *ABCC8* и *KCNJ11* бяха нормализирани към GAPDH, използвайки Δ Ст калкулациите. Беше изчислена относителната им експресия във всяка група спрямо експресията на този фактор при контролите. $RQ \geq 2$ се определи като свръхекспресия, $RQ < 0,5$ като намалена експресия, а RQ между 1,99 и 0,5 – без промяна в експресията.

Измерването на нивата на КЗ, кетотела, кетони и ТГ в кръвта се осъществи с апарат с тест ленти Wellion GALILEO®.

Нивата на инсулин в кръвта се измериха чрез Mouse Insulin Ultra Sensitive ELISA kit. Това е двустранен ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA). Микроплаката е предварително покрита с моноклонално антитяло срещу инсулин. Стандарти и проби се добавят в ямки и се инкубират с моноклонално антитяло, конюгирано с ензим horseradish peroxidase (HRP). След стъпка на измиване за отстраняване на несвързаните вещества се добавя субстрат ТМВ и интензитетът на цвета е пропорционален на количеството първоначално свързан инсулин. Анализът се спира и оптичната плътност на ямките се определя с помощта на четец за микроплаки.

Преди започване на изследването всички реагенти и материали се оставят на стайна температура; смесват се 30 ml Wash buffer с 270 ml дестилирана вода; приготвя се разтвор за улавяне на антитела чрез разреждането му с Assay buffer и се размесва добре, за всяка ямка са необходими 100 μ l от разтвора за улавяне на антитела.

Протоколът е следният:

1. Добавят се 25 μ l от пробата във всяка ямка.
2. Слагат се 100 μ l от разтвора за улавяне на антитела.
3. Плаката се запечатва и се инкубира на стайна температура за два часа като се разклаща с 600 rpm (оборотата в минута) на хоризонтален micro-plate shaker.
4. Съдържанието се премахва и плаката се поставя на чиста хартия, за да се премахне остатъчният разтвор от всяка ямка. Добавят се 300 μ l Wash buffer във

всяка ямка. Инкубира се на стайна температура за 20 секунди. Отстранява се Wash buffer и плаката се поставя на чиста хартия, за да се премахне остатъкът от всяка ямка. Стъпката с промиването се повтаря общо 4 пъти.

5. Прибавят се 100 µl Substrate solution във всяка ямка, инкубира се на стайна температура за 15 минути като се предпазва от светлината.
6. Добавят се 100 µl Stop solution във всяка ямка и се размесва.
7. Веднага се измерва абсорбирането на всяка ямка на 450 nm.

Изважда се абсорбцията на празната ямка от тази на стандартите и пробите. Генерира се стандартна крива, като се нанася получената абсорбция (оста y) спрямо концентрациите на инсулина (ос x). Най-подходящата линия може да бъде генерирана с всеки софтуер за мониториране на криви чрез регресионен анализ. Определя се концентрацията на инсулин в пробите от стандартната крива.

Измерването на HDAC се извърши чрез Mouse Histone deacetylase 7 (Hdac7) ELISA Kit. Преди започване китът се оставя на стайна температура за 30 минути. Използва се следният протокол:

1. Добавят се 100 µl от пробата или стандарта във всяка ямка. В празните ямки се слага разредител за проби. Прибавят се разтворите на дъното на микро ELISA плака като се избягват докосване или разпенване. Разбърква се. Плаката се покрива. Инкубира се за 120 минути на 37°C.
2. Премахва се течността от всяка ямка, не се изплаква. Прибавят се 100 µl Detection Reagent A във всяка ямка. Покрива се плаката. Инкубира се за 1 час на 37°C.
3. Аспирира се всяка ямка и се промива като процесът се повтаря три пъти. Измива се като всяка ямка се пълни с Wash Buffer (около 400µl). На всяка стъпка е необходимо пълно отстраняване на течността. След последното промиване напълно се отстранява останалият Wash Buffer чрез аспириране. Плаката се обръща и се поставя върху чиста хартия.
4. Добавят се 100 µl Detection Reagent B във всяка ямка. Покрива се и се инкубира за 60 минути на 37°C.
5. Промиването се повтаря пет пъти както е описано в стъпка 3.
6. Прибавят се 90 µl Substrate Solution във всяка ямка. Покрива се и се инкубира за 10-20 минути на 37°C. Трябва да се пази от светлината. Времето на реакцията не трябва да е повече от 30 минути.
7. Добавят се 50 µl Stop Solution във всяка ямка.

8. Определя се оптичната плътност (OD value) на всяка ямка като се използва четец за микроплаки, настроен на 450 nm.

Нивата на 25ОНD бяха измерени с помощта на Mouse 25-ОН Vitamin D (25ОНVD) ELISA Kit. Използва се протоколът:

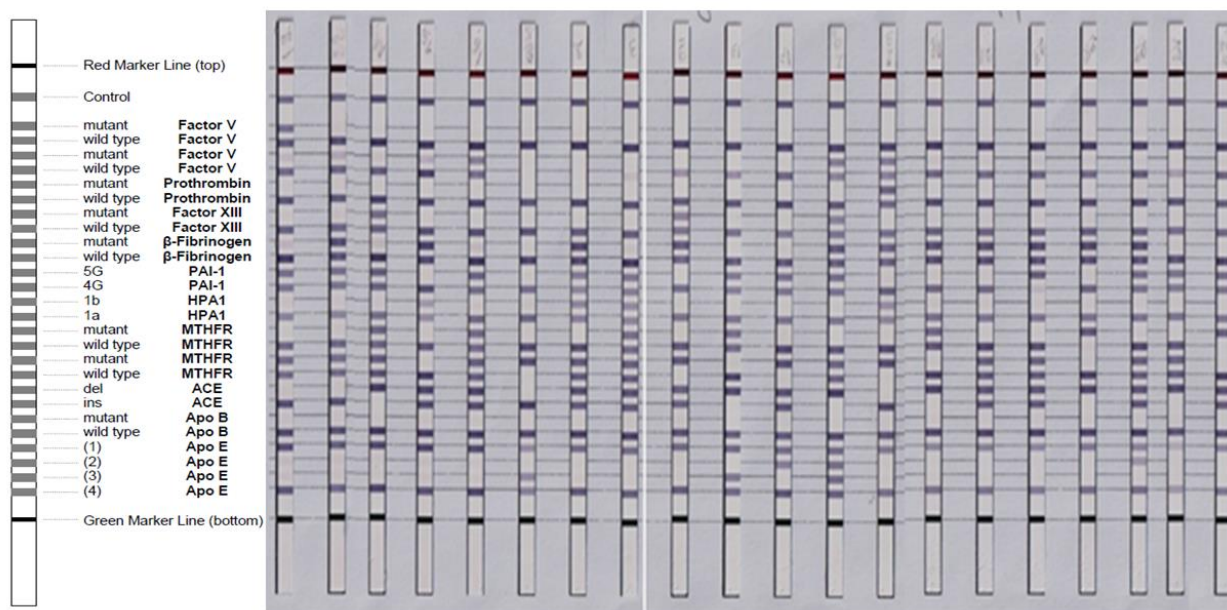
1. Слагат се 50 μ l от проба или стандарт във всяка ямка. В празните ямки се слага разредител за проби. Разтворите се поставят на дъното на микро ELISA плака като се избягват докосване или разпенване.
2. Веднага се прибавят 50 μ l Detection Reagent A във всяка ямка. Покрива се и се инкубира за 1 час на 37°C.
3. Всяка ямка се аспирира и се промива като процедурата се повтаря три пъти. Промива се като се пълни всяка ямка с 400 μ l Wash Buffer и се оставя за 1-2 минути. Важно е напълното отстраняване на течността на всяка стъпка. След последната промивка напълно се премахва останалият Wash Buffer чрез аспирация. Объща се плаката върху абсорбираща хартия.
4. Добавят се 100 μ l Detection Reagent B във всяка ямка. Покрива се и се инкубира за 45 минути на 37°C.
5. Промиването се повтаря пет пъти както е описано в стъпка 3.
6. Прибавят се 90 μ l Substrate Solution във всяка ямка . Покрива се и се инкубира за 10-20 минути на 37°C. Трябва да се предпазва от светлина. Реакционното време не трябва да е по-дълго от 30 минути.
7. Добавят се 50 μ l Stop Solution във всяка ямка.
8. Определя се оптичната плътност (OD value) на всяка ямка като се използва четец за микроплаки, настроен на 450 nm.

РЕЗУЛТАТИ

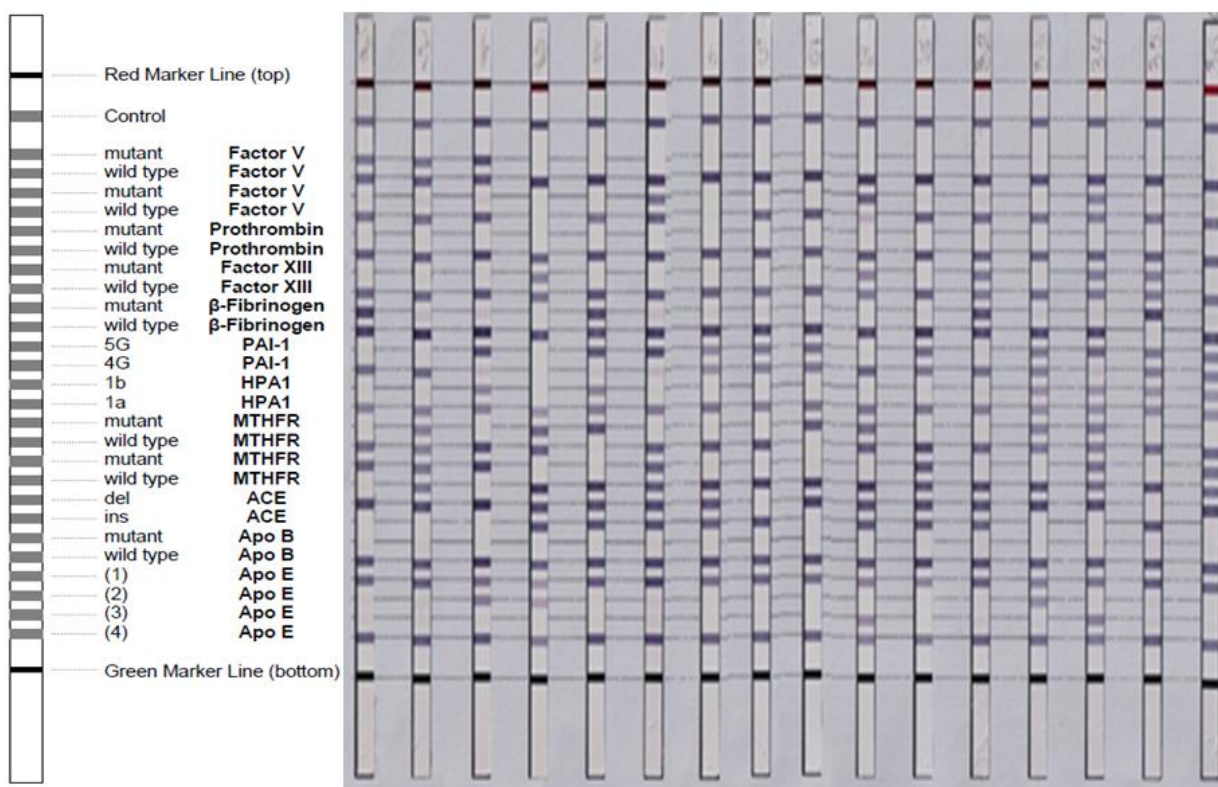
Резултати от изследването на генетични варианти, свързани със сърдечно-съдов риск при пациенти със ЗД тип 2

В нашето проучване общият брой изследвани пациенти е 36, т.е. 72 алели – 20 пациенти от първата група (40 алели) и 16 пациенти от втората (32 алели). За някои генетични варианти броят е по-малък поради неуспешен анализ.

На фигура 6 са представени резултатите от генотипирането на изследваните генни варианти при пациенти със ЗД тип 2 и сърдечно-съдови усложнения, а на фигура 7 - резултатите от генотипирането им при пациенти със ЗД тип 2 без сърдечно-съдови усложнения. Таблица 11 обобщава алелните честоти на анализиранияте генни варианти при пациентите със ЗД тип 2.



Фигура 6. Резултати от генотипирането на генните варианти при пациенти със ЗД тип 2 и сърдечно-съдови усложнения



Фигура 7. Резултати от генотипирането на генните варианти при пациенти със ЗД тип 2 без сърдечно-съдови усложнения

Таблица 11. Алелни честоти на анализиранияте генни варианти при пациентите със ЗД тип 2

| Генетичен вариант | Брой (процент) |
|------------------------------|----------------|
| <i>FV (Leiden)</i> | 4/72 (5.5%) |
| <i>FV (R2)</i> | 6/62 (9.7%) |
| <i>Prothrombin 20210A</i> | 1/72 (1.4%) |
| <i>Factor XIII V34L</i> | 8/72 (11.1%) |
| <i>β-Fibrinogen -455 G-A</i> | 16/72 (22.2%) |
| <i>PAI-1 4G</i> | 41/70 (58.6%) |
| <i>HPA-1b</i> | 9/72 (12.5%) |

| | |
|---------------------|---------------|
| <i>MTHFR 677T</i> | 18/72 (25%) |
| <i>MTHFR 1298C</i> | 28/72 (38.9%) |
| <i>ACE Del</i> | 43/72 (59.7%) |
| <i>Apo B R3500Q</i> | 0 |
| <i>Apo E4</i> | 6/72 (8.3%) |

Резултати от генотипирането на фактори за вродена тромбофилия

На таблица 12 са представени обобщените данни на алелните и генотипните честоти на факторите за вродена тромбофилия при пациенти със ЗД тип 2 със и без сърдечно-съдови усложнения.

Таблица 12. Алелни и генотипни честоти на факторите за вродена тромбофилия при пациенти със ЗД тип 2

| Алел/генотип | ЗД със ССЗ | ЗД без ССЗ | Всички |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>FV (Leiden)</i> алел | 1/40 (2.5%) | 3/32 (9.4%) | 4/72 (5.5%) |
| <i>FV G/A</i> генотип | 1/20 (5%) | 3/16 (18.8%) | 4/36 (11%) |
| <i>FV A/A</i> генотип | 0 | 0 | 0 |
| <i>FV (R2)</i> алел | 3/34 (8.8%) | 3/28 (10.7%) | 6/62 (9.7%) |
| <i>FV H/R</i> генотип | 3/17 (17.6%) | 3/14 (21.4%) | 6/31 (19.4%) |
| <i>FV R/R</i> генотип | 0 | 0 | 0 |
| <i>Prothrombin 20210A</i> | 1/40 (2.5%) | 0 | 1/72 (1.4%) |
| алел | 1/20 (5%) | 0 | 1/36 (2.8%) |
| <i>Prothrombin G/A</i> | 0 | 0 | 0 |
| генотип | | | |

| | | | |
|--|------------------------|--------------|---------------|
| <i>Prothrombin A/A</i> генотип | | | |
| <i>PAI-1 4G</i> алел | 26/40 (65%) | 15/30 (50%) | 41/70 (58.6%) |
| <i>PAI-1 4G/5G</i> генотип | 12/20 (60%) | 7/15 (46.7%) | 19/35 (54.3%) |
| <i>PAI-1 4G/4G</i> генотип | 7/20 (35%) | 4/15 (26.7%) | 11/35 (31.4%) |
| <i>Factor XIII 34L</i> алел | 3/40 (7.5%) | 5/32 (15.6%) | 8/72 (11.1%) |
| <i>Factor XIII V/L</i> генотип | 3/20 (15%) | 5/16 (31.2%) | 8/36 (22.2%) |
| <i>Factor XIII L/L</i> генотип | 0 | 0 | 0 |
| <i>β-Fibrinogen - 455 A</i> алел | 11/40 (27.5%) | 5/32 (15.6%) | 16/72 (22.2%) |
| <i>β-Fibrinogen - 455 G/A</i> генотип | 11/20 (55%), p<0.03 | 3/16 (18.7%) | 14/36 (38.9%) |
| <i>β-Fibrinogen - 455 A/A</i> генотип | 0 | 1/16 (6.2%) | 1/36 (2.7%) |
| <i>HPA-1b</i> алел | 3/40 (7.5%) | 6/32 (18.7%) | 9/72 (12.5%) |
| <i>HPA 1a/1b</i> генотип | 3/20 (15%) | 6/16 (37.4%) | 9/36 (25%) |
| <i>HPA 1b/1b</i> генотип | 0 | 0 | 0 |

Резултати от генотипирането на Фактор V Leiden и HR2

Общо при всички пациенти е намерена честота от 5.5% за *FV Leiden* алела - повече от 2 пъти повишена в сравнение с популационната честота от 1.9% в света (2.9% за Европа). Съгласно 1000 Genomes базата данни, честотата на хетерозиготите е 2%, а в нашата група пациенти установихме честота от 11%. Не се установява връзка на мутацията *FV Leiden* с наличието на сърдечно-съдови усложнения, като дори в групата на пациентите без ССЗ се намира още по-висок процент на мутацията – 9.4%. По-висока от

популяционната е установената от нас честота за *FVR2* алела – 9.7% спрямо 5.7% в света и 6% в Европа. Не е намерена асоциация със ССЗ.

Резултати от генотипирането на Протромбин

Установената от нас честота 1.4% за мутантния алел при всички пациенти със ЗД е съизмерима с общата популяционна честота от 0.8% в света и 1.1% в Европа. Този алел е намерен само в групата със ССЗ, без да се достига статистическа значимост.

Резултати от генотипирането на PAI-1

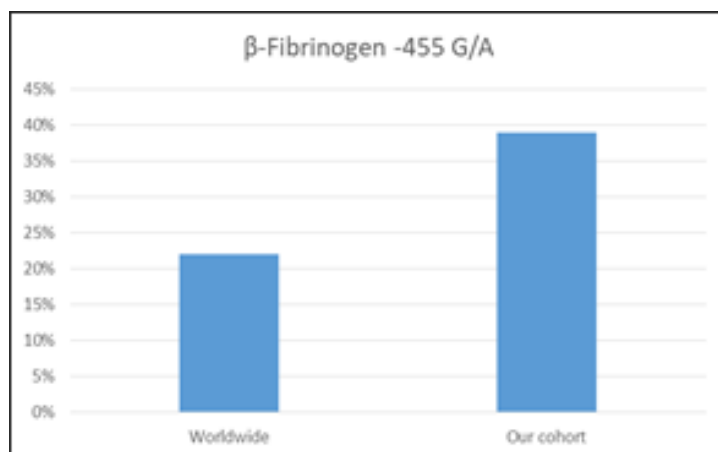
Установява се по-висока честота на патогенния алел от 58.6% спрямо 26.9% популяционна честота в света според геномната база Ensembl (38.9% в Европа). Честотата на хомозиготите *4G/4G* е 31.4% спрямо 20.9% в света и 29.4% в Европа, а на хетерозиготите *4G/5G* при всички пациенти със ЗД – 54.3%. Не е намерена асоциация със ССЗ.

Резултати от генотипирането на Фактор XIII

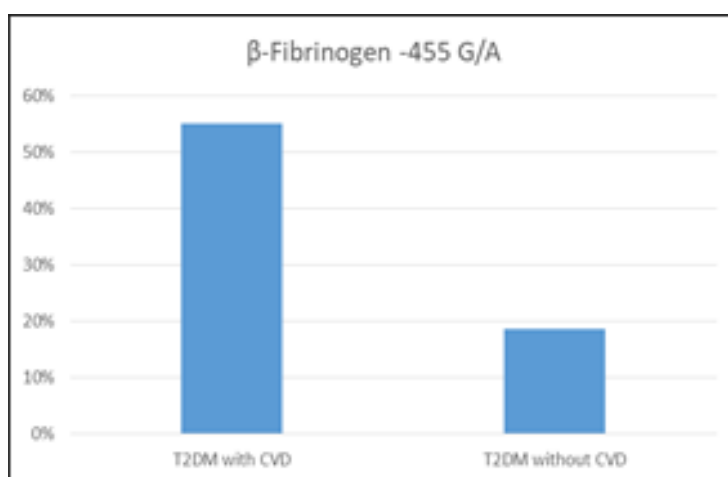
В нашата кохорта пациенти се установява по-ниска честота за минорния алел от 11.1% спрямо 21.9% популяционна честота в света и 25.2% в Европа. Прави впечатление, че в групата със ССЗ е дори по-ниска (7.5%), което предполага евентуалната протективна роля на този генетичен вариант.

Резултати от генотипирането на β -fibrinogen

Установената от нас алелна честота от 22.2% за патогенния алел е по-висока спрямо популяционната честота от 16.9% и близка до тази 20.3% в Европа – фигура 8. Според 1000 Genomes Project Phase 3 популяционната честота на хетерозиготите е 22%, а установената от нас при хора със ЗД е 38.9%. Тя се повишава статистически значимо, $p < 0.03$, в групата със ССЗ в сравнение с тези без ССЗ – 55% срещу 18.7% - фигура 9.



Фигура 8. Честота на хетерозиготите по мутацията за β -фибриноген – 455 G/A – вляво в световен мащаб, вдясно – установена в нашата кохорта



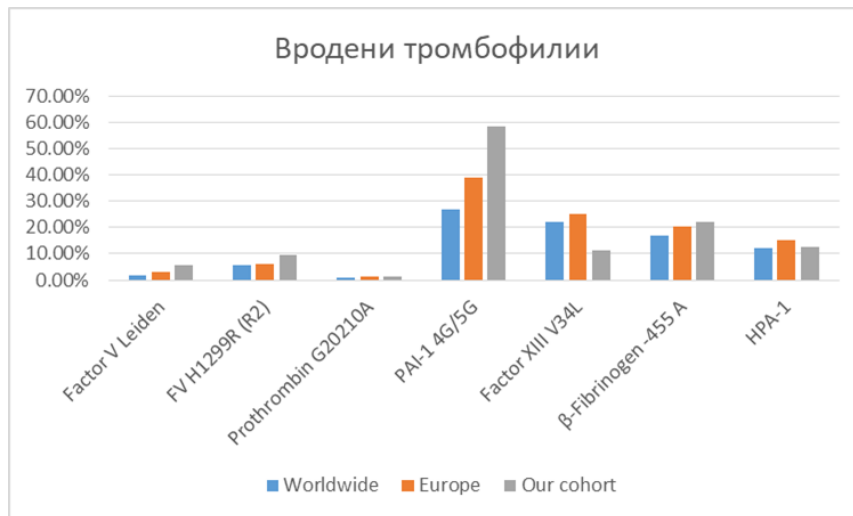
Фигура 9. Честота на хетерозиготите по мутацията за β -фибриноген – 455 G/A в нашето проучване – вляво при пациенти със ЗД тип 2 и ССЗ, вдясно – при хора със ЗД тип 2 без ССЗ

Резултати от генотипирането на HPA1 (гликопротеин GP IIb/IIIa)

Установената от нас алелна честота от 12.5% за мутантния алел е аналогична на популационната честота от 12.1% в света (15.2% в Европа).

В обобщение за факторите, свързани с вродени тромбофилии, установихме за повечето от тях по-висока честота от популационната, без да се достига статистическа значимост – фигура 10 и 11. Най-висока е честотата на носителство на PAI-1 варианта 4G при пациентите със ЗД тип 2 (58.6%). Честотата на FXIII полиморфизма е по-ниска от популационната му честота, което е в съответствие с данните за протективната роля на този полиморфизъм (11.1% срещу 21.9%). При сравняване на честотите в групите със и

без ССЗ, само вариантите в PAI-1 и фибриноген показват по-висока честота в групата със ССЗ, като статистическа значимост се достига за β -фибриноген – 455 G/A генотипа.



Фигура 10. Графично представяне на честотите на изследваните варианти за вродени тромбофилии в световен мащаб, в Европа и в нашата кохорта



Фигура 11. Честоти на изследваните варианти за вродени тромбофилии при ЗД тип 2 със и без ССЗ

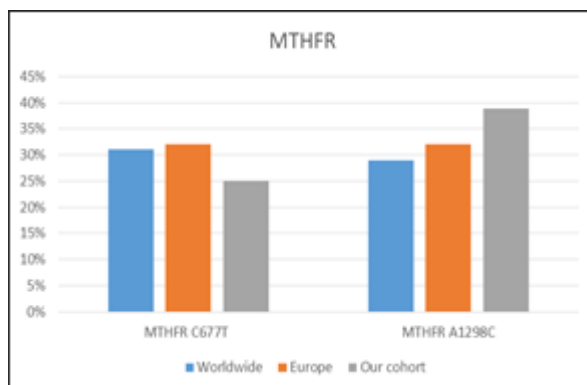
Резултати от генотипирането на MTHFR

На таблица 13 са представени резултатите на алелните и генотипните честоти на *MTHFR* C677T и *MTHFR* A1298C. Установената от нас алелна честота за *MTHFR* 677T от 25% при пациентите е малко по-ниска от популационната – 31% в света и 32% в Европа;

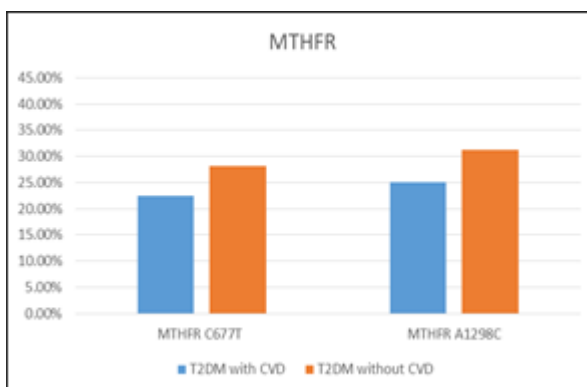
алелната честота за *MTHFR 1298C* в нашето проучване от 38.9% е по-висока от популационната – 29% в света и 32% в Европа – фигура 12 и 13.

Таблица 13. Алелни и генотипни честоти на *MTHFR C677T* и *MTHFR A1298C*

| Алел/Генотип | ЗД и ССЗ | ЗД без ССЗ | Общо |
|--------------------|---------------|--------------|---------------|
| <i>MTHFR 677T</i> | 9/40 (22.5%) | 9/32 (28.1%) | 18/72 (25%) |
| <i>MTHFR C/T</i> | 5/20 (25%) | 5/16 (31.2%) | 10/36 (27.8%) |
| <i>MTHFR T/T</i> | 2/20 (10%) | 2/16 (12.5%) | 4/36 (11.1%) |
| <i>MTHFR 1298C</i> | 19/40 (47.5%) | 9/32 (28.1%) | 28/72 (38.9%) |
| <i>MTHFR A/C</i> | 11/20 (55%) | 5/16 (31.2%) | 16/36 (44.4%) |
| <i>MTHFR C/C</i> | 4/20 (20%) | 2/16 (12.5%) | 6/36 (16.7%) |



Фигура 12. Честота на *MTHFR C677T* и *MTHFR A1298C* в световен мащаб (в синьо), в Европа (в оранжево) и при пациенти със ЗД тип 2 от нашето проучване (в сиво)



Фигура 13. Честота на *MTHFR C677T* и *MTHFR A1298C* при пациенти със ЗД със (в синьо) и без ССЗ (в оранжево)

Резултати от генотипирането на ACE

Таблица 14 представя алелните и генотипните честоти на ACE. Установената от нас честота на хомозиготи по патологичния алел *ACE D/D* от 36.1% при пациентите със ЗД е по-висока от популационната честота от 25% в Европа.

Таблица 14. Алелни и генотипни честоти на ACE

| Алел/Генотип | ЗД и ССЗ | ЗД без ССЗ | Общо |
|----------------|-------------|---------------|---------------|
| <i>ACE Del</i> | 22/40 (55%) | 21/32 (65.6%) | 43/72 (59.7%) |
| <i>ACE I/D</i> | 10/20 (50%) | 7/16 (43.7%) | 17/36 (47.2%) |
| <i>ACE D/D</i> | 6/20 (30%) | 7/16 (43.7%) | 13/36 (36.1%) |

Резултати от генотипирането на ApoB

Мутацията не беше установена в нито един от изследваните пациенти, а популационната му честота е 1 на 5000.

Резултати от генотипирането на ApoE

На таблица 15 са показани честотите на ApoE генотиповете при изследваните пациенти. Честотата на носителство на рисковия алел *E4* от 13.9% е напълно съпоставима с популационната – 13.8% в света и 16.1% в Европа.

Таблица 15. Честота на ApoE генотиповете

| Алел/Генотип | ЗД и ССЗ | ЗД без ССЗ | Общо |
|------------------|-------------|---------------|---------------|
| <i>Apo E3/E4</i> | 2/20 (10%) | 3/16 (18.7%) | 5/36 (13.9%) |
| <i>Apo E2/E4</i> | 1/20 (5%) | 0 | 1/36 (2.8%) |
| <i>Apo E3/E3</i> | 17/20 (85%) | 13/16 (81.3%) | 30/36 (83.3%) |

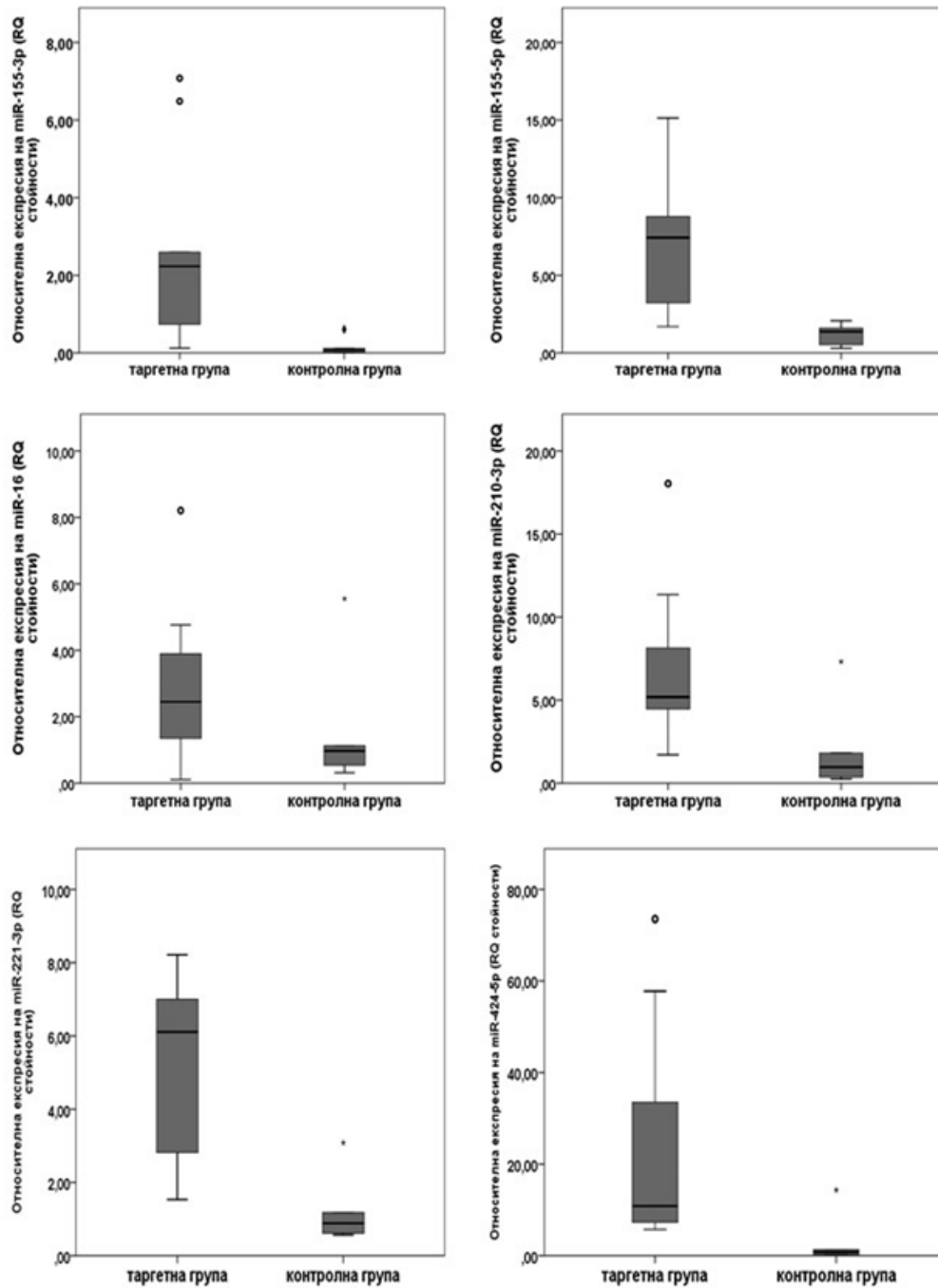
Не се установява статистически значима разлика в алелните и генотипните честоти на представените по-горе изследвани генетични варианти между изследваните групи пациенти с диабет със и без ССЗ.

Резултати от анализа на експресионните нива на някои miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2

В нашето проучване бяха анализирани следните miRNA: miRNA-16, miRNA-155-3p, miRNA-155-5p, miRNA-210, miRNA-221 и miRNA-424 при пациенти със ЗД със (таргетна група) и без ССЗ (контролна група). Сравнителният анализ на експресията показва статистически значимо повишаване на експресията на всички тези miRNA в таргетната група в сравнение с контролната – таблица 16, фигура 14.

Таблица 16. Относителна експресия на анализираниите miRNA

| miRNA | Относителна експресия (RQ) |
|--------------|----------------------------|
| miRNA-16 | 2.2 |
| miRNA-155-3p | 2.5 |
| miRNA-155-5p | 5.1 |
| miRNA-210 | 6.2 |
| miRNA-221 | 7.5 |
| miRNA-424 | 10.5 |



Фигура 14. Средни относителни нива на експресия на изследваните miRNA в таргетната група в сравнение с контролната

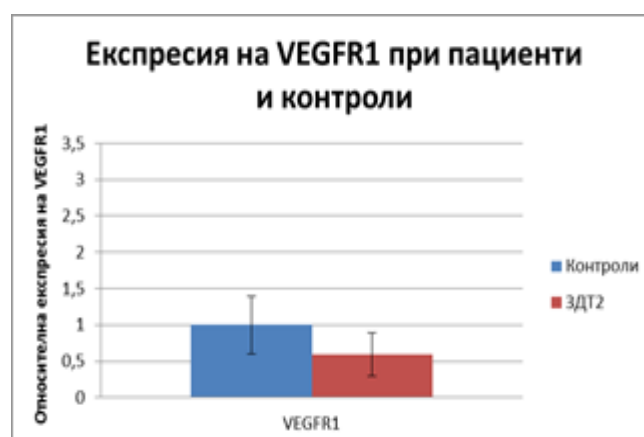
Най-голямо увеличаване в експресията в групата на пациенти със ЗД и установено ССЗ се наблюдава за miRNA-424 със средно RQ 10,5, следвано от miRNA-221 с RQ 7,5, miRNA-210 с RQ 6,2 и miRNA-155-3p с RQ 5,1. Най-малко увеличаване в експресията имаше за miRNA-16 и miRNA-155-3p – съответно 2,2 и 2,5 пъти.

Резултати от анализа на експресията на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2

Генно-експресионният анализ на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв, извършен при пациенти със ЗД тип 2 и контроли, показва средни относителни нива от 1.77 за този маркер при пациентите в сравнение с контролите, без да има статистически значима разлика – фигура 15. Средните относителни нива на експресия на маркера за хемопоеични стволови клетки *VEGFR1* бяха 0.59 и показаха статистически значимо намаление спрямо контролите - $p < 0.01$ – фигура 16.



Фигура 15. Средна експресия на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2 и контроли



Фигура 16. Средна експресия на *VEGFR1* в клетки от периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2 и контроли, $p < 0.01$

При разглеждане на подгрупите с различна давност на ЗД се установиха средни относителни нива на експресия за *VEGFR2* в клетки от периферна кръв съответно 1.09 при новодиагностициран диабет, 2.36 при пациенти под 5 годишна давност и 2.80 при пациенти с над 5-годишна давност на ЗД – фигура 17. По отношение на експресията на *VEGFR1* установените нива бяха 0.69, 0.49 и 0.59, съответно – фигура 18.

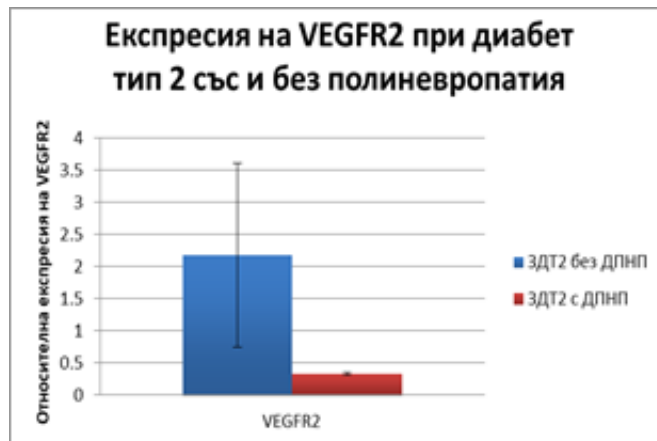


Фигура 17. Средна експресия на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв при пациенти с различна давност на ЗД тип 2

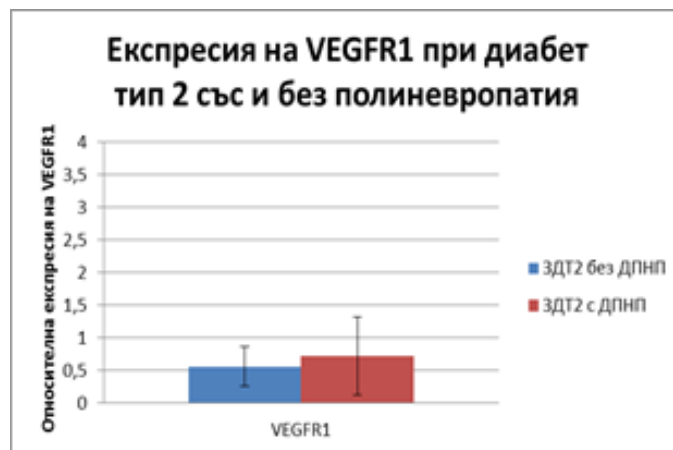


Фигура 18. Средна експресия на *VEGFR1* в клетки от периферна кръв при пациенти с различна давност на ЗД тип 2

Сравнението на експресията на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв на пациенти без ДПНП и такива с наличие на това усложнение показва статистически значимо намаление на експресията ($p < 0.05$) при пациенти с полиневропатия в сравнение с пациенти без – 0.33 срещу 2.18 - фигура 19. Експресията на *VEGFR1* не показва статистически значима разлика в двете групи – 0.72 срещу 0.56 – фигура 20.



Фигура 19. Средна експресия на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2 и наличие или липса на ДПНП, $p < 0.05$



Фигура 20. Средна експресия на *VEGFR1* в клетки от периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2 и наличие или липса на ДПНП

В обобщение нашето проучване установи статистически значимо намаление на експресията на *VEGFR1* (0.59 пъти) при пациенти със ЗД тип 2 в сравнение с контроли ($p < 0.01$); анализът на експресията на *VEGFR2* показва статистически значимо намаление ($p < 0.05$) при пациенти с полиневропатия в сравнение с пациенти без това усложнение – 0.33 срещу 2.18.

Резултати от анализа на ефектите на кетогенната диета и на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром

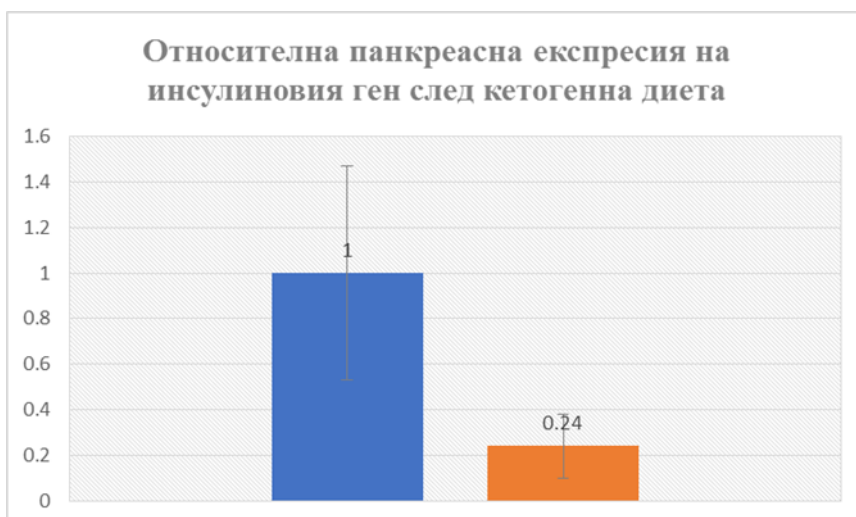
Кетогенната диета намалява експресията на гените *Ins 1*, *GCK*, *ABCC8* и *KCNJ11* – таблица 17; прилагането на витамин D заедно с кетодиета повишава транскрипционните

нива на инсулиновия ген около 3 пъти, без да се достига стойността на контролите; самостоятелното витамин D суплементиране сигнификантно увеличава транскрипционните нива на инсулиновия ген в панкреас на мишки.

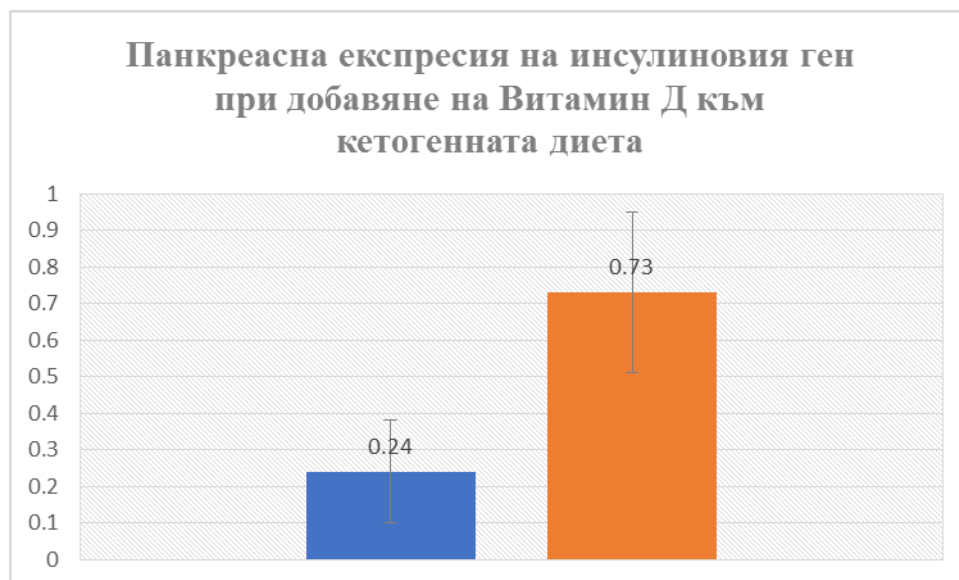
Таблица 17. Относителна панкреасна експресия на изследваните гени след кетодиета

| Ген | Относителна експресия (RQ) |
|---------------|----------------------------|
| <i>Ins1</i> | 0.24 |
| <i>ABCC8</i> | 0.21 |
| <i>KCNJ11</i> | 0.32 |
| <i>GCK</i> | 0.54 |

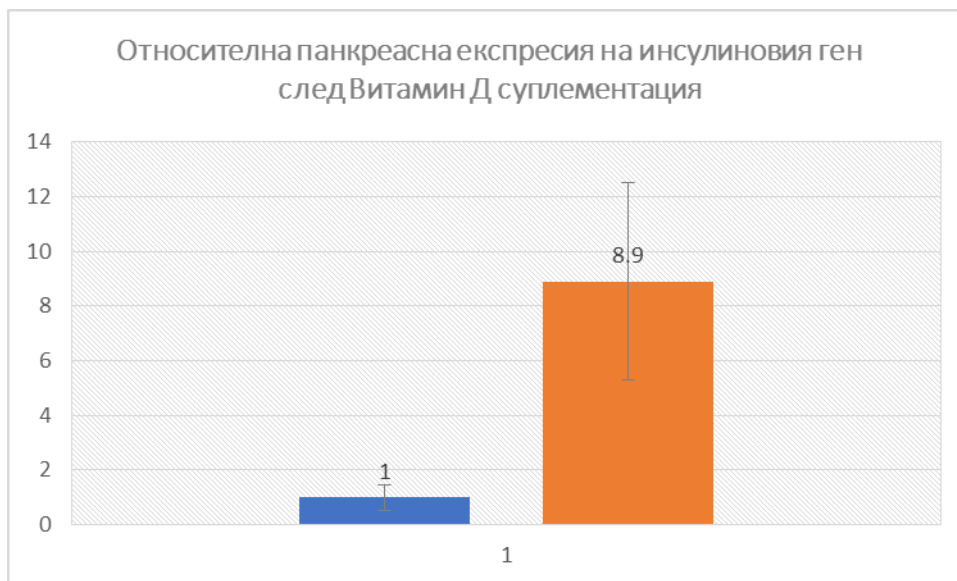
Генно-експресионният анализ на инсулиновия ген установи намаляване в експресията му в групата на кетогенна диета – $RQ = 0,24$, в сравнение с контролната група – фигура 21. В групата, суплементирана едновременно с витамин D и приемаща кетодиета, се наблюдава по-висока експресия на гена ($RQ = 0,73$) спрямо групата само на кетогенна диета, но не достигаща тази при контролите – фигура 22. Резултатите от групата само с витамин D показват статистически значимо увеличаване на експресията на инсулиновия ген спрямо контролната ($RQ = 8,9$, $p = 0,02$) – фигура 23. На фигура 24 са представени обобщените данни от експресионния анализ.



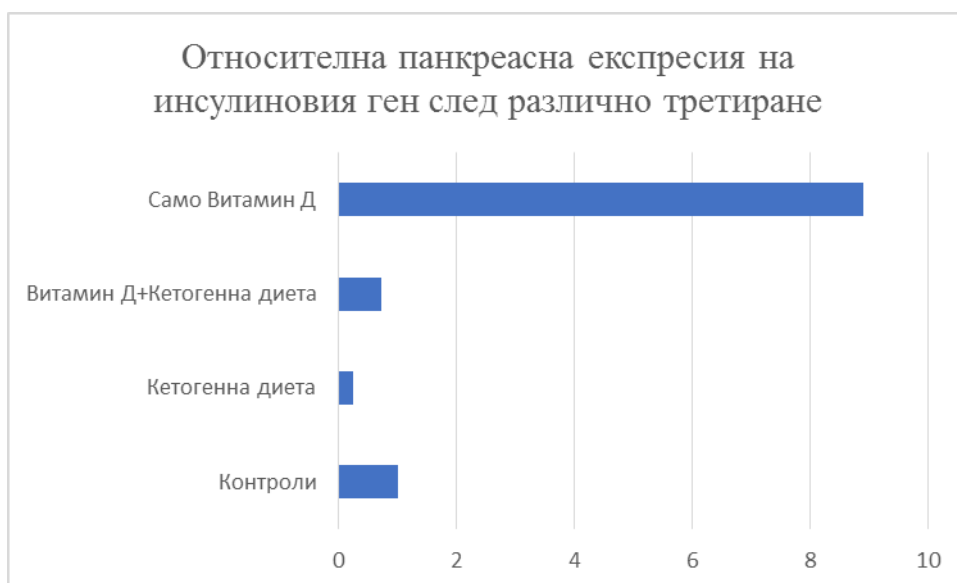
Фигура 21. Относителна панкреасна експресия на инсулиновия ген след кетогенна диета (синьо – контроли, оранжево - третирани)



Фигура 22. Панкреасна експресия на инсулиновия ген при едновременна суплементация с витамин D и кетодиета (синьо – контроли, оранжево - третирани)



Фигура 23. Панкреасна експресия на гена за инсулин при прием само на витамин D спрямо контролната група (синьо – контроли, оранжево - третирани), $p = 0,02$



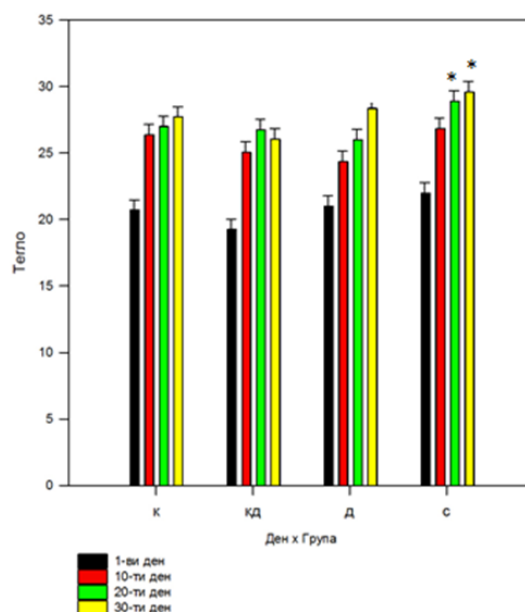
Фигура 24. Относителна панкреасна експресия на инсулиновия ген след различно третирание – обобщени данни

Приемът само на витамин D доведе до значително повишаване на експресията на гените *Ins1*, ($RQ = 8,9$), *GCK* ($RQ = 11,5$) и *KCNJ11* ($RQ = 5,9$) в панкреаса на третираните мишки спрямо контролите – фигура 25.



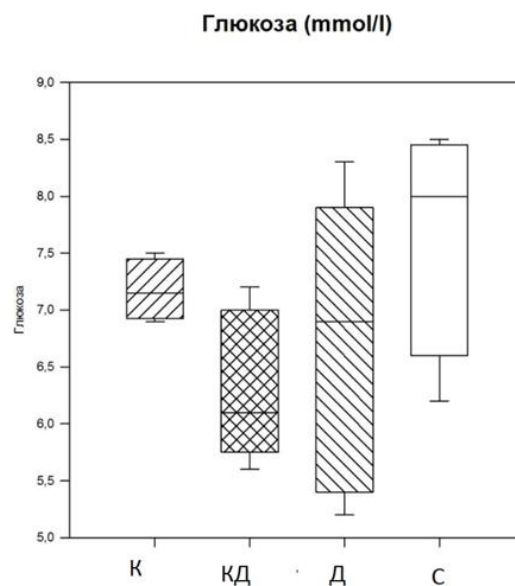
Фигура 25. Повишаване на панкреасната експресия на гените *Ins1*, *GSK* и *KCNJ11* след третиране с витамин D

Теглото на опитните животни беше измервано всяка седмица. Резултатите бяха анализирани чрез двуфакторен ANOVA за факторите „експериментална група“ – К (кетодиета), КД (кетодиета + витамин D суплементиране), Д (витамин D суплементиране) – и С (контрола) и факторът „време на измерване“. И двата фактора оказват статистически значим ефект по отношение на теглото – с времето животните във всяка от групите статистически значимо повишаваше теглото си ($p < 0.001$). В сравнение с контролната група и трите третирани експериментални групи показаха значително по-ниско тегло след първия месец ($p < 0.001$) – фигура 26.



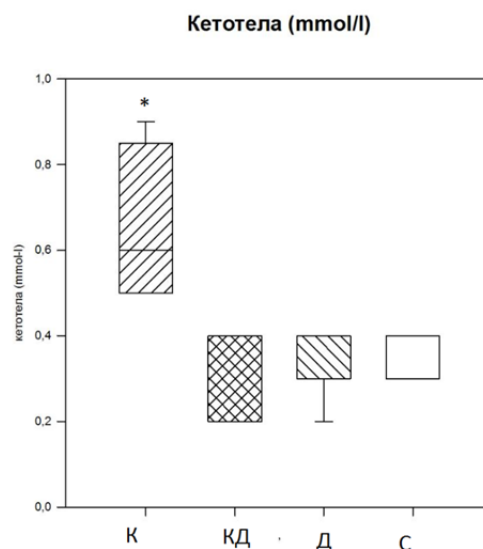
Фигура 26. Промени в теглото на опитните животни по време на третирането, g

Глюкозата в серума не се различаваше статистически значимо между групите ($p = 0.143$, непараметричен ANOVA) – фигура 27.



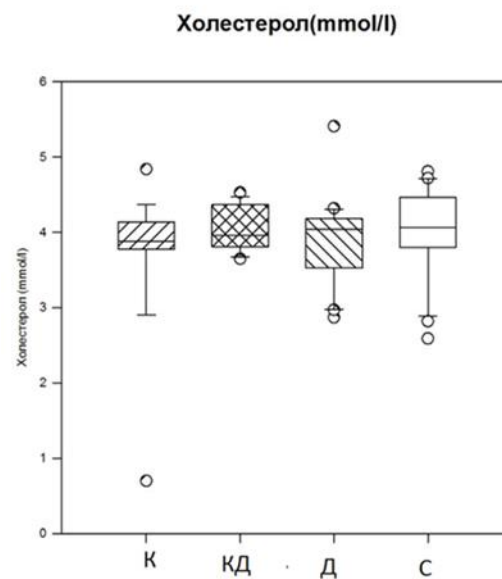
Фигура 27 . Нива на глюкоза в серума в края на експеримента, mmol/l

Кетотелата, както се очакваше, бяха статистически значимо повишени в групата на кетодиета ($p < 0.05$, непараметричен ANOVA). Едновременното суплементиране с витамин D обаче статистически значимо понижава кетонемията – фигура 28.



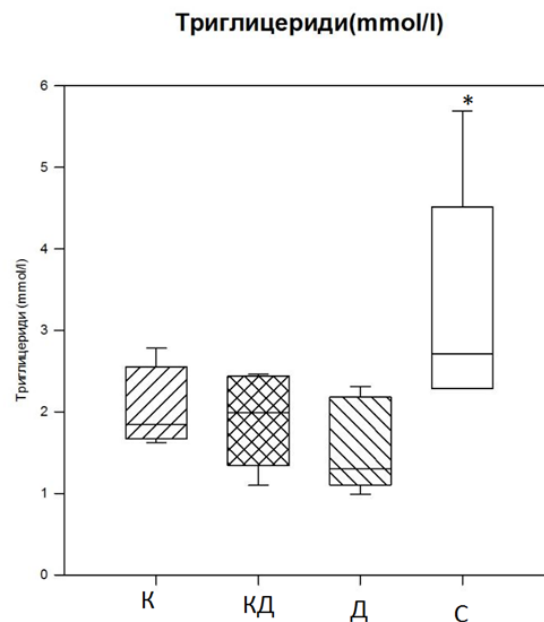
Фигура 28. Нива на кетотела в кръвта, mmol/l

Нивата на общия холестерол в кръвта не се различава статистически значимо между групите ($p > 0.05$, непараметричен ANOVA) – фигура 29.



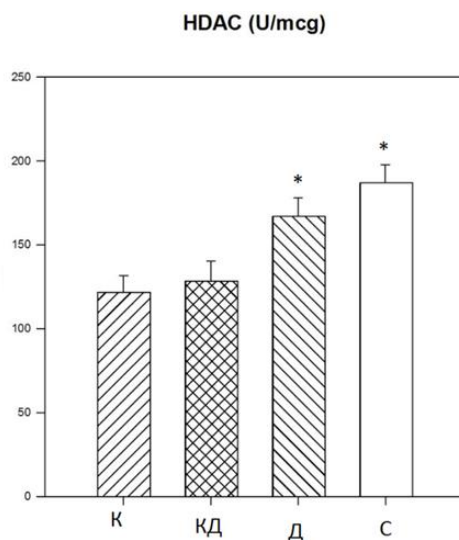
Фигура 29. Нива на общия холестерол в кръвта, mmol/l

Триглицеридемията в трите третиранни групи показва тенденция към по-ниски стойности в сравнение с контролната група ($p = 0.08$, еднофакторен ANOVA) – фигура 30.



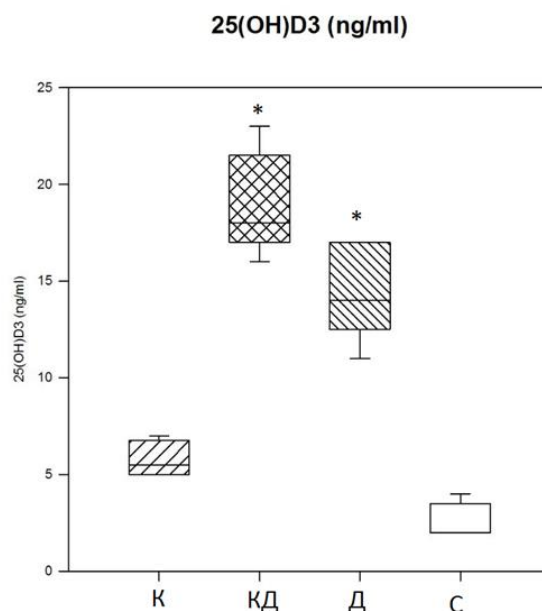
Фигура 30. Ниво на триглицериди в кръвта, mmol/l

HDAC показва по-ниски стойности в групите, третирани с кетодиета, със или без суплементиране с витамин D ($p < 0.01$, еднофакторен ANOVA) – фигура 31.



Фигура 31. Хистондеацетилазна активност в серума, U/ μ g

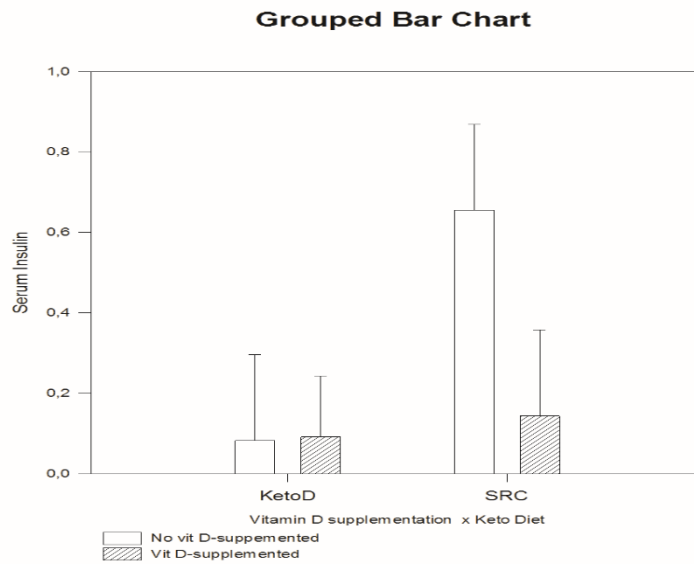
Очаквано, нивата на 25ОНD в серума на животните, допълнително суплементирани с витамин D, бяха статистически значимо по-високи от тези на несуплементираните ($p < 0.05$, непараметричен ANOVA) – фигура 32.



Фигура 32. Ниво на 25ОНD в серума, ng/ml

Във връзка с резултатите от инсулина в серума е приложен факторен анализ по отношение на суплементиране или не с витамин D (фактор суплементиране с витамин

D) и фактор диета (Keto diet или Standard Rodent Show - SRC). Тези резултати изглежда че корелират с генетичните - фигура 33.



Фигура 33. Нива на инсулин, ng/ml

ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Роля на генетичните варианти, свързани със сърдечно-съдов риск при пациенти със ЗД тип 2

Резултатите от нашето проучване върху генотипирането на β -фибриноген - 455 G/A установи, че честотата на патогенния алел е 22.2% и е по-висока спрямо популационната честота от 16.9% в световен мащаб и 20.3% в Европа. Според 1000 Genomes Project Phase 3 популационната честота на хетерозиготите е 22%, а установената от нас при хората с диабет е 38.9%. Тя се повишава статистически значимо в групата от пациенти със ЗД и ССЗ в сравнение с пациентите със ЗД без ССЗ – 55% срещу 18.7% ($p < 0.03$). Известно е, че мутацията 455G/A в промоторния регион на β -фибриновия ген е свързана с повишени нива на фибриногена в плазмата. Carter et al. са проучили връзката между 455G/A генния полиморфизъм и фибриногеновите нива за развитието на КАБ при пациенти със ЗД тип 2. Резултатите показват сигнификантно увеличени нива на фибриногена при пациенти с КАБ в сравнение с тези, които нямат КАБ. Тези данни показват асоциация между 455 G/A генния полиморфизъм и развитието на КАБ при ЗД [55]. Lam et al. са изучавали връзката между същия полиморфизъм и плазмените фибринови концентрации в опит да изяснят ролята му при КАБ при пациенти със ЗД тип 2 и контроли, които нямат ЗД. Установява се, че 455 G/A генният полиморфизъм в β -фибриногеновия ген е генетична детерминанта за нивата на фибриногена в кръвта и за ролята му като рисков фактор за КАБ [56].

По отношение на резултатите от генотипирането на Фактор V Leiden се установи, че общо при всички пациенти честотата е 5.5% - повече от 2 пъти повишена в сравнение с популационната честота от 1.9% в света (2.9% за Европа). Съгласно 1000 Genomes базата данни честотата на хетерозиготите е 2%, а в нашата група пациенти установихме честота от 11%. Не се установява връзка на мутацията FV Leiden с наличието на сърдечно-съдови усложнения, като дори в групата на пациентите без ССЗ се намира още по-висок процент на мутацията – 9.4%. По-висока от популационната е установената от нас честота за FV H1299R (R2) – 9.7% спрямо 5.7% в света и 6% в Европа. Връзката между FVL и атеросклерозата е обект на дебати от известно време поради разнопосочни данни. Изказана е хипотеза за връзка между мутацията и ЗД тип 1 и 2, но резултатите са противоречиви [59, 60]. Braun et al. откриват асоциация между FV G1691A (Leiden) и венозния тромбемболизъм [61]. Проучване установява увеличение в честотата на ЗД

сред пациенти с венозен тромбемболизъм, които са носители на мутацията, сравнени с неносители, но връзката не е статистически значима [62].

Установената от нас честота за генотипирането на протромбин *G20210A* е 1.4% патогенния алел при за всички хора с диабет и е съизмерима с общата популационна честота от 0.8% в света и 1.1% в Европа. Известно е обаче, че мутацията протромбин *G20210A* причинява повишени нива на протромбин и увеличава риска от формиране на съсиреци, включително и от дълбока венозна тромбоза, а също и белодробен тромбемболизъм. След фактор V Leiden, тя е един от най-честите генетични варианти, асоцииращи се с венозен тромбемболизъм [76]. Метаанализ на Ye et al. установява 1,3 пъти повишен риск от КАБ [77].

Нашите резултатите от генотипирането на PAI-1 установяват по-висока честота на патогенния алел от 58.6% спрямо 26.9% популационна честота в света според геномната база Ensembl (38.9% в Европа). Честотата на хомозиготите *4G/4G* е 31.4% спрямо 20.9% в света и 29.4% в Европа, а на хетерозиготите *4G/5G* при всички пациенти със ЗД – 54.3%. От различни проучвания е известно, че повишените му нива са важен рисков фактор за тромбоза и атеросклероза [63]. Той е увеличен при пациенти с КАБ. Има данни, че инсулиновата резистентност може да бъде регулатор на експресията на PAI-1. Образоването му от мастната тъкан би могло да допринесе за повишените му нива, които се откриват при пациенти с инсулинова резистентност и с метаболитен синдром. Проспективни проучвания на хора с МИ или КАБ откриват връзка между увеличените му нива и риска от коронарна болест [64, 65]. Метаанализ доказва, че *4G/5G* полиморфизмът се свързва с МИ [66]. Генотипът *4G/4G* води до повишени нива на PAI-1 и като резултат – хипофибринолитично състояние и повишен тромботичен риск [67]. Съществува асоциация между повишените нива на PAI-1 и коремното затлъстяване, тъй като мастната тъкан го експресира и е негов важен източник при тези пациенти [68]. Комбинацията от ЗД тип 2 и затлъстяване допринася за по-съществено увеличаване на PAI-1 в сравнение с обезитета и ЗД поотделно [69]. PAI-1 има отношение и към РААС, който има голям принос в иницирането на съдовото заболяване и за прогресията му [70].

В нашата кохорта пациенти се установява по-ниска честота за минорния алел на фактор XIII *34L* от 11.1% спрямо 21.9% популационна честота в света и 25.2% в Европа. Прави впечатление, че в групата със ССЗ неговата честота е дори по-ниска (7.5%), което

предполага евентуалната протективна роля на този генетичен вариант. Метаанализ на Wells et al. разкрива, че мутацията *V34L* играе протективна роля срещу венозен тромбемболизъм, умерено намалява риска от МИ и КАБ [79]. От друга страна се счита, че полиморфизмът *4G/4G* на PAI-1 също се счита, че намалява протективния ефект на *V34L* [80].

Резултатите от генотипирането на *HPA1* на гликопротеин GP IIb/IIIa разкриват, че установената от нас алелна честота от 12.5% е аналогична на популационната честота от 12.1% в света (15.2% в Европа). Известно е, че инхибиторите на GP IIb/IIIa се използват за намаляване риска от формиране на кръвни съсиреци при пациенти с риск от КАБ или инсулт. При дефекти в гликопротеин GP IIb/IIIa има риск от развитие на коагулопатията тромбастения на Glanzmann, която се характеризира с нарушена тромбоцитна агрегация и повишен риск от кървене [74]. Установено е, че полиморфизмът *HPA-1* на GPIIb/IIIa се асоциира с развитието на АХ при пациенти с терминална бъбречна недостатъчност [75].

Установената от нас алелна честота за *MTHFR 677T* от 25% е малко по-ниска от популационната – 31% в света и 32% в Европа; алелната честота за *MTHFR 1298C* в нашето проучване от 38.9% е по-висока от популационната – 29% в света и 32% в Европа. Известно е, че *C677T* полиморфизмът е свързан с повишен риск от развитие на ССЗ. Мутацията води до хиперхомоцистеинемия, което е рисков фактор за атеросклероза [57]. От друга страна има данни, че мутации в гени, кодиращи FVL и MTHFR може да имат принос за развитието на дълбока венозна тромбоза – състояние, което се дължи на повишена съсирваемост и може да бъде вродено или придобито. Проучване изследва честотата на FVL, *MTHFR C677T* и *MTHFR A1298C* генни полиморфизми при пациенти с това заболяване. Резултатите установяват *MTHFR A1298C* полиморфизма в 77% от случаите, *MTHFR C677T* при 67% и FVL при 17% от пациентите [58].

Честотата на хомозиготи по патологичния алел *ACE D/D* от 36.1% в нашето проучване е по-висока от популационната честота от 25% в Европа. Генетичният полиморфизъм на гена за ACE взема участие в патогенезата на атеросклерозата [26]. Различни проучвания съобщават, че *DD* генотипът на ACE е свързан с по-високата му активност и увеличен риск от левокамерна хипертрофия, АХ и КАБ [82].

Мутацията за ароВ не беше установена в нито един от изследваните пациенти, а популационната му честота е 1 на 5000. По отношение на ароЕ честотата на носителство

на рисковия алел E4 от 13.9% в нашето проучване е напълно съпоставима с популационната – 13.8% в света и 16.1% в Европа. ApoB 100 е отговорен за усвояването на LDL в черния дроб [83]. При генетичен дефект в apoB 100 повишено количество LDL се натрупва в плазмата, което води до хиперхолестеролемия и преждевременна атеросклероза [84]. От друга страна пациенти, които нямат apoE, акумулират липопротеинови останки. В атеросклеротичните лезии липопротеините съдържат apoE и apoB 100. Липопротеиновите останки с apoE стимулират натрупването на холестеролови естери в макрофагите [85]. В лезиите повечето от apoE молекулите се синтезират локално от макрофагите [86].

5.2. Роля на експресионните нива на miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2

В нашето проучване бяха анализирани следните miRNA: miRNA-16, miRNA-155-3p, miRNA-155-5p, miRNA-210, miRNA-221 и miRNA-424 при пациенти със ЗД със ССЗ (таргетна група) и без ССЗ (контролна група). Сравнителният анализ на експресията показва статистически значимо повишаване на експресията на всички тези miRNA в таргетната група в сравнение с контролната. Най-голямо увеличаване в експресията в групата на пациентите със ССЗ се наблюдава за miRNA-424 със средно RQ 10,5, следвано от miRNA-221 с RQ 7,5, miRNA-210 с RQ 6,2 и miRNA-155-5p с RQ 5,1. Най-малко увеличаване в експресията имаше за miRNA-16 и miRNA-155-3p – съответно 2,2 и 2,5 пъти.

В големи кохортни проучвания е доказано, че miRNA биха могли да се използват като потенциални прогностични маркери за развитие на КАБ, включително и при пациенти със ЗД. Полиморфизъм на miRNA-451 например се асоциира с по-висока честота на увеличена кръвна захар на гладно, с развитие на ЗД тип 2, а също с по-лоша преживяемост при КАБ [184]. Motawae et al. доказват, че miRNA-9 и miRNA-370 са много по-силно експресирани при пациенти с КАБ и ЗД тип 2 в сравнение с такива, които имат само ЗД или само КАБ [185]. Zampetaki et al. установяват, че miRNA-126 е силен прогностичен фактор за развитие на МИ. При пациенти със ЗД тип 2 и КАБ са налице по-ниски нива на експресия на miRNA-126 в циркулиращи ендотелни клетки [186]. Други проучвания също установяват, че различни miRNA са променени при ЗД и при ССЗ. Добрият гликемичен контрол намалява някои от симптомите при диабета, но е известно, че дори и след оптимизирането на нивата на кръвната захар диабетната

кардиомиопатия прогресира. Дори след подобряване на контрола на 3Д при мишки с диабет дисрегулацията на miRNA, които участват в метаболитни пътища от миокардната увреда (дисрегулирани miRNA-221, miRNA-146a, miRNA-34a, miRNA-210, miRNA-19b, miRNA-27a, miRNA-155), персистират [187]. Nielsen et al. установяват, че веднага след физическо натоварване няколко miRNA, включително miRNA-16 и miRNA-221, сигнификантно се понижават в циркулацията [188]. Данните предполагат, че това е от особено важно значение за отговора на сърцето към физиологичния стрес по време на натоварване. Ikitimur et al. откриват връзката между експресията на miRNA и параметри от електрокардиограмата, свързани с LVMI при пациенти с хронична СН. Резултатите сочат, че 29 miRNA са променени при хронична СН. Измежду тях miRNA-155 показва директна корелация с LVMI [187]. Доказано е, че при подобряване на СН се понижават нивата на miRNA-210, miRNA-126 и miRNA-423.

MiRNA-16 играе важна роля в контрола на ангиогенезата и съдовия интегритет, а също така е и свързана с оцеляването, запазването и формирането на нови капиляри [192]. Установено е, че VEGF е таргет на miRNA-16 в ендотелните клетки. Chamorro et al. са демонстрирали, че miRNA-16 инхибира ендотелната функция и ангиогенезата чрез модулиране на експресията на VEGF [193]. Fernandes et al. наблюдават промени в експресията на miRNA-16 при мишки със затлъстяване и нарушение в глюкозния толеранс – има увеличение в експресията ѝ в сърцето и същевременно намаляване в експресията на VEGF [194]. Установено е, че нивата на miRNA-16 са повишени в серума и в проангиогенни клетки на хора с диабет с критична исхемия на крайниците [195].

Съществуват данни, че miRNA-155 играе важна роля в процесите на хематопоеичната диференциация, имунитетът, възпалението, съдовото ремоделиране, като по този начин се свързва с различни ССЗ [196]. Проучване демонстрира, че miRNA-155 е специфично експресирана в атеросклеротични плаки и проинфламаторни макрофаги, и стимулира развитието на атеросклероза [197]. От друга страна обаче Yao et al. установяват, че експресията ѝ е намалена при пациенти с остър коронарен синдром [198]. При хора с ранна коронарна атеросклероза miRNA-155 е с потисната експресия в плаките [199]. Като цяло може да се заключи, че тези разнопосочни резултати за miRNA-155 в патофизиологията на атеросклерозата показват комплексността на тази мултифункционална молекула в регулацията на сърдечно-съдовото моделиране. Евентуалните причини за това биха могли да са свързани с различните патологични стадии на това състояние. Установено е, че експресията на miRNA-155 е повишена при

СН. В голямо проучване на miRNA от проби от лява камера при мишки със стрептозотоцин-индуциран диабет се открива, че miRNA-155 остава сигнификантно променена в сърдечните тъкани дори след възстановяване на нормалните нива на гликемията [200]. Дефицитът на miRNA-155 би могъл да предотврати развитието на сърдечна фиброза вследствие на ЗД при мишки и да намали синтеза на колаген, провокиран от високите нива на глюкоза във фибробластите на кардиомиоцитите [201].

Проучвания, които използват човешки ендотелни клетки от умбиликалната вена (HUVEC), посочват, че miRNA-221 регулира ангиогенезата в отговор на стволово-клетъчни фактори (SCF) вероятно чрез потискане на клетъчното оцеляване, миграцията и съдовото формиране, а също така взема участие и при диабет-индуцираната ендотелна дисфункция [202]. Въпреки че все още не е ясно дали експресията на miRNA-221e променена по време на физиологичния процес на формиране на капилярите в отговор на SCF, е установено, че модулирането ѝ е потенциален път за терапевтично повлияване на ангиогенезата. Пациенти с хронично артериално заболяване имат увеличени нива на miRNA-221 в ендотелните прогениторни клетки и това води до тяхната мобилизация [203]. Връзката между miRNA-221 и сърдечно-съдовата система е известна. Експресионните ѝ нива са измерени в серумни проби от пациенти с инсулт и така тя става нов биомаркер за това заболяване [204]. Циркулиращите ѝ нива са завишени при хора след остър МИ [205]. От друга страна обаче те са понижени при пациенти със СН и тежка сърдечна фиброза. Това предполага, че miRNA-221 играе важна роля в регулирането на клетъчното оцеляване при пациенти със ССЗ [206].

Експресията на miRNA-210 се повишава в условията на хипоксия, а е установено, че притежава проангиогенни свойства *in vitro* [207]. Свръхекспресията ѝ в ендотелните клетки води до ускорено съдово формиране при нормални условия. Проучванията потвърждават, че miRNA-210 участва в регулацията на хипоксия-индуцирания клетъчен отговор. Експресията ѝ се повишава в условия на исхемия като МИ и СН при пациенти със ЗД [208, 209]. Съществуват данни, че нивата на miRNA-210 са позитивно свързани със степента на СН по класификацията на NYHA [189]. Промени в експресията на miRNA-210 често са наблюдавани в периферна кръв или увредени тъкани на пациенти със ССЗ, включително атеросклероза, остър коронарен синдром, сърдечно клапно заболяване, белодробна артериална хипертония и СН [210]. В някои клинични проучвания са установени повишени нива на miRNA-210 в плазма и урина на младежи със ЗД тип 1 [211]. Amr et al. изследват експресията на miRNA-210 и miRNA-126 при

хора със ЗД тип 2 с или без КАБ и откриват, че и в двете групи експресията на miRNA-210 е повишена. От двете групи обаче пациентите с КАБ имат по-изразена промяна в нивото на miRNA-210 в сравнение с тези само със ЗД. От друга страна обаче нивото на miRNA-126 при ЗД е намалено в сравнение със здрави контроли, а пациентите с КАБ имат по-ниска експресия в сравнение с онези без. В резултат може да се заключи, че miRNA-210 и miRNA-126 са епигенетични биомаркери за ЗД тип 2 със съдови усложнения, особено КАБ [212].

Проведено е проспективно проучване с 10-годишно проследяване, при което са идентифицирани множество циркулиращи miRNA (включително и miRNA-424-5p), които предсказват развитие на бъдещ фатален МИ при здрави участници. Sayed et al. предполагат, че miRNA-149, miRNA-424 и miRNA-765 биха могли да се използват като нови индикатори за диагнозата на КАБ [208]. Известно е, че miRNA-424 стимулира ангиогенезата при хипоксия [213]. Експресията ѝ е увеличена при компенсаторно уголемяване на сърцето в резултат от прогресията на СН в хроничната ѝ фаза. По този начин miRNA-424 би могло да бъде полезен индикатор за мониториране на напредването на СН, но е неподходяща за предсказване на риска от настъпване на внезапна сърдечна смърт [214].

5.3. Експресия на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2

Генно-експресионният анализ на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв, извършен при пациенти със ЗД тип 2 и контроли, показва средни относителни нива от 1.77 за този маркер при пациентите в сравнение с контролите, без да има статистически значима разлика. Средните относителни нива на експресия на маркера за хемопоеични стволови клетки *VEGFR1* бяха 0.59 и показаха статистически значимо намаление спрямо контролите - $p < 0.01$. При разглеждане на подгрупите с различна давност на ЗД се установиха средни относителни нива на експресия за *VEGFR2* в клетки от периферна кръв съответно 1.09 при новодиагностициран диабет, 2.36 при пациенти под 5 годишна давност и 2.80 при пациенти с над 5-годишна давност на ЗД. По отношение на експресията на *VEGFR1* установените нива бяха 0.69, 0.49 и 0.59, съответно.

Сравнението на експресията на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв на пациенти без ДПНП и такива с наличие на това усложнение показва статистически значимо намаление на експресията ($p < 0.05$) при пациенти с полиневропатия в сравнение с пациенти без – 0.33 срещу 2.18. Експресията на *VEGFR1* не показва статистически значима разлика в двете групи – 0.72 срещу 0.56.

Установено е, че VEGF се свързва към няколко рецептора. Както е известно, VEGFR1 е необходим за набирането на хематопоеични стволови клетки и за мигрирането на моноцитите и макрофагите; VEGFR2 регулира съдовата ендотелна функция; VEGFR3 участва в активността на ендотела на лимфните съдове [248]. VEGFR2 медира почти всички известни клетъчни отговори към VEGF. Функцията на VEGFR1 е по-малко известна, въпреки че се счита, че модулира сигнализирането на VEGFR2 [249]. Установено е, че физиологични нива на VEGF стимулират пролиферацията на ендотелни клетки чрез VEGFR2, а също така и активацията на eNOS за образуването на азотен оксид чрез VEGFR1 [215]. Образуването на VEGF-A може да се стимулира в клетки, при които има недостиг на кислород. В този случай клетките образуват HIF, който стимулира освобождаването на VEGF-A. Циркулиращият VEGF-A след това се свързва към рецепторите си върху ендотелните клетки, което стартира процеса на ангиогенеза [248]. При диабетните микросъдови усложнения се наблюдава аберантна ангиогенеза, която се характеризира с локална експресия на индуцирания от хипоксията VEGF, намаляване на нивата на азотен оксид, оксидативен стрес, повишен съдов пермеабилитет и възпаление. VEGF провокира абнормна пролиферация на ендотелните клетки чрез VEGFR-2 [215]. Различни проучвания установяват, че EPC експресират VEGFR-2 и неговото активиране регулира клетъчната пролиферация [250].

Съществуват данни, че експресията на ангиогенните фактори VEGF и HIF-1 α е намалена в сърцето на пациенти със ЗД при остър коронарен синдром и че големината на МИ при плъхове е увеличена поради намалена експресия на HIF-1 α [253]. Поради тази причина по-слабото формиране на колатерали при ЗД може да води до по-слаба стимулация на костния мозък от исхемичната тъкан. Наскоро е установено, че мобилизирането на EPC от костния мозък след исхемия е нарушено при плъхове с диабет. Невъзможността за мобилизацията на EPC се свързва с down-регулация на HIF-1 α и по-слабо освобождаване на костно-мозъчни стимулиращи фактори като VEGF и SDF-1, което от своя страна води до недостатъчна компенсаторна ангиогенеза [254].

Както е известно, често усложнение на ЗД, което засяга голяма част от пациентите, е ДПНП. Загубата на сетивност в долните крайници може да доведе до наранявания, придружени от разязвявания (често в резултат и на влошеното кръвоснабдяване), които в краен случай да прогресират до ампутация. В експериментални условия бе установено, че ДПНП се характеризира с нарушена микроциркулация в периферните нерви, причинена от засягането на невралните съдове. ЕРС могат да бъдат кандидат за лечението на това усложнение, тъй като те притежават паракринни свойства, които имат както ангиогенни, така и невротрофични ефекти [265]. Установено е, че пациенти със ЗД и периферна артериална болест имат намалени нива на циркулиращи ЕРС особено при наличието и на исхемични лезии. ЕРС в този случай са с нарушена пролиферация и адхезия към зрелия ендотел [266].

Увреждането на ендотелните клетки настъпва рано в хода на ХБЗ, но възстановяването им е нарушено поради дефекта на ЕРС при ЗД. Пациентите с ХБЗ имат доказано количествени и качествени изменения в ЕРС [267]. Като цяло механизмите са неизвестни, но се предполага, че вероятно уремичните токсини вземат участие, понеже хемодиализата и бъбречната трансплантация са в състояние да възстановят ендогенния пул на ЕРС [268]. Установено е, че връзката между бъбречната функция и ЕРС е доста по-комплексна, понеже еритропоетинът се явява преобладаващ регулатор за мобилизацията и диференциацията на ЕРС [269]. Връзката кислород – еритропоетин, която зависи от HIF-1 α , е с нарушена регулация при ЗД. Мобилизирането на ЕРС при диабет не е изправно поради down-регулация на HIF-1 α [254]. Makino et al. докладват за негативна корелация между броя на ЕРС и албуминурията при ЗД [270].

Yoon et al. демонстрират, че диабетната кардиомиопатия при плъхове се характеризира с ранно и прогресивно намаляване на експресията на VEGF в миокарда, което води до намаляване в гъстотата на капилярната мрежа, повишена фиброза и нарушен контрактилитет. Нивата на ЕРС са били намалени. Възстановяването на миокардната експресия на VEGF повишава циркулиращите ЕРС и води до подобряване в миокардната микроциркулация [271].

5.4. Ефекти на кетогенната диета и на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром

Нашето проучване установи, че кетогенната диета намалява експресията на гените *Ins 1*, *GCK*, *ABCC8* и *KCNJ11*; прилагането на витамин D заедно с кетодиета повишава транскрипционните нива на инсулиновия ген около 3 пъти, без да се достига стойността на контролите; витамин D сигнификантно увеличава транскрипционните нива на инсулиновия ген в панкреас на мишки. 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 (RQ = 8,9, p = 0,02). Резултатите ни от нивата на инсулина в серума изглежда корелират с генетичните. Установи се също така в нашето проучване, че приемът само на витамин D води до значително повишаване на експресията на гените *Ins1*, *GCK* и *KCNJ11* в панкреаса на третираните мишки спрямо контролите. Проучвания доказват, че биоактивната форма на витамин D може да индуцира секреция на инсулин чрез директно свързване на VDR-RXR комплекс с VDRE (витамин D респондърни елементи), идентифицирани преди това в промотора на инсулиновия ген в панкреатичните β -клетки [309]. В съответствие с това откритие, съществуват данни, че 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, които участват в организацията на цитоскелета, клетъчния растеж, диференциацията и оцеляването на β -клетките на панкреаса [310]. Установено е, че мишки с мутация на VDR имат нарушена инсулинова секреция в сравнение със здрави [291]. Jayanarayanan et al. доказват, че суплементацията с витамин D увеличава нивата на инсулина чрез регулиране на променената 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 АМРА рецептора и експресията на IP3 и АМРА – рецепторите в панкреасните острови и така се възстановява калций-медираната инсулинова секреция [311]. Bornstedt et al. доказват, че метаболити на витамин D повлияват панкреасните β -клетки и глюкозо-стимулираната инсулинова секреция чрез промяна в експресията на гени, които участват във функционирането и жизнеспособността на β -клетките [312]. От друга страна е доказано, че витамин D регулира експресията на гена за инсулиновия рецептор [313]. Има данни,

че диета, която е и бедна на въглехидрати, каквато е кетодиетата, често се прилага за контрол на симптомите на ЗД тип 2 при хора [332]. Към момента не е известно дали ефектът на тази диета върху глюкозната хомеостаза е резултат от редуцията на тегло или от рестрикцията на въглехидратите с храната. Kinzig et al. провеждат проучване, което доказва, че консумирането на нисковъглехидратна кетодиета от гризачи води до потискане нивата на инсулина и глюкозата, което се наблюдава и при прием на диета с нисък гликемичен индекс от хора [333]. Скорошни проучвания при мишки установяват, че кетодиетата подобряват инсулиновата чувствителност в целия организъм, редуцират инсулиновите нива на гладно въпреки увеличаването на чернодробната стеатоза [334]. Съществуват проучвания обаче, които показват, че приемът на кетодиета води до нарушен глюкозен толеранс. Освен това, консумацията на високо въглехидратно хранене при плъхове, които преди това са били на кетодиета, води до значително по-високи нива на инсулин и глюкоза за продължителен период от време, в сравнение с контролите. Отговорът към инсулин е увеличен при плъхове на кетодиета. Връщането към обикновена диета бързо възстановява ефектите на кетодиетата върху инсулиновата чувствителност и глюкозния толеранс. Тези данни предполагат, че поддържането на кетодиета влияе отрицателно върху хомеостазата на глюкозата, ефект, който бързо се възстановява след прекратяване на диетата [333].

По отношение на телесното тегло с времето животните във всяка от групите статистически значимо повишаваше теглото си ($p < 0.001$). В сравнение с контролната група и трите третирани експериментални групи обаче показаха значително по-ниско тегло след първия месец ($p < 0.001$). Глюкозата в серума не се различаваше статистически значимо между групите ($p = 0.143$). Кетотелата, както се очакваше, бяха статистически значимо повишени в групата на кетодиета ($p < 0.5$). Едновременното суплементиране с витамин D обаче статистически значимо понижава кетонемията. Нивата на общия холестерол в кръвта не се различава статистически значимо между групите ($p > 0.05$). Триглицеридемията в трите третирани групи показва тенденция към по-ниски стойности в сравнение с контролната група ($p = 0.08$). HDAC показва по-ниски стойности в групите, третирани с кетодиета, със или без суплементиране с витамин D ($p < 0.01$). Очаквано, нивата на 25OHD в серума на животните, допълнително суплементирани с витамин D, бяха статистически значимо по-високи от тези на несуплементираните ($p < 0.05$). Като цяло данните сочат, че суплементацията с витамин D предизвиква редуция на тегло при дефицит. Нееднозначни обаче са резултатите по

отношение на показателите за въглехидратния и липидния метаболизъм. Seldeen et al. откриват, че по-малкото добавяне на холекалциферол както при слаби, така и при затлъстели мишки, значително и устойчиво намалява серумните концентрации на 25ОНD. Интересното е, че затлъстяването забавя темповете на спад. По време на проучването недостатъчността на витамин D впоследствие не корелира с по-висок ИТМ, въпреки че слабите мишки с по-висока добавка консумират повече калории без видимо увеличение на ИТМ [314]. Mason et al. проследяват за 12 месеца постменопаузални жени, които са включени в програма за редуциране на теглото, като част от тях приемат и витамин D. В края на проследяването се открива, че жените, които са били суплементирани и нивото на витамин D е било достатъчно, са постигнали по-голямо отслабване и загуба на мазнини в сравнение с онези, които са били на плацебо [315]. Khosravi et al. доказват, че суплементацията с витамин D води до сигнификантна редукция на телесното тегло, но от друга страна не се достига значимост по отношение на общия холестерол, ТГ, LDL и КЗГ [316]. Друго проучване обаче показва, че суплементацията с витамин D води до намаляване в нивата на НОМА индекса, а също и на LDL холестерола [317]. Yang et al. съобщават за по-високи нива на холестерол, триглицериди и глюкоза при лица с дефицит на витамин D в сравнение с тези без дефицит [318]. Branco et al. са установили по-високи нива на ТГ при пациенти с хиповитаминоза D [319]. Major et al. проследяват жени с наднормено тегло или затлъстяване за 15 седмици, като част от тях суплементират с 400 IU дневно витамин D и калций, а останалите получават плацебо. В края на този период тези, които са получавали калций с витамин D, показват по-изразено намаляване в нивата на LDL [320]. От друга страна, Yuan et al. установяват, че кетодietetата води до намаляване в нивата на КЗГ, триглицеридите и общия холестерол, а също и на телесното тегло [335]. Kennedy et al. провеждат опит, в който разделят мишки на четири групи – хранени с кетогенна диета, високомазнинна и с високо съдържание на сукроза, такива, подложени на калорийна рестрикция, и контролна група. Теглото на мишките, които са били на кетогенна диета и са приемали същото количество калории като тези в контролната група и тези които са били на високомазнинна диета, са постигнали редукция на теглото – 85% от изходното, също както и контролите. Животните, които са били на високомазнинната диета и впоследствие са преминали на кетодиета, са успели да редуцират наддаденото тегло, а също се е подобрил и глюкозният им толеранс [334]. Друго проучване категорично показва, че мишки, хранени с кетогенна диета, драстично са редуцирали тегло въпреки че са приемали повече калории [336]. Goday et al. сравняват

пациенти със 3Д тип 2, като едната група са били подложени на кетогенна диета, а другата – на нискокалориен режим. Резултатите показват статистически значимо намаляване на телесното тегло в групата на кетодиета, а също така и на нивото на HbA1c [337]. Dashti et al. проследяват пациенти с диабет със затлъстяване, които са били подложени на кетогенна диета. В края на периода се открива значимо намаляване в телесното тегло, кръвната захар, общия холестерол, LDL, ТГ, а нивото на HDL се е увеличило [338]. Друго проучване показва сходни резултати – след кетодиета се наблюдава намаляване на телесното тегло, кръвната захар, подобряване на инсулиновата чувствителност, редукция на холестерола и ТГ [325]. От друга страна обаче, Gumbiner et al. не установяват промяна в телесното тегло и нивата на инсулина на гладно и в хода на ОГТТ след кетогенна диета [339]. По отношение на епигенетичното регулиране е доказано, че кетотелата, в частност β -хидроксibuтиратът, намаляват активността на HDAC. Счита се, че β -хидроксibuтиратът е и директен епигенетичен регулатор като се свързва към хистоните и по този начин регулира генната експресия [340, 341]. Проучване установява, че кетогенната диета предизвиква промяна в експресията на гени, свързани с глюкозния и липидния метаболизъм. Четири седмици на кетодиета води до намаляване експресията на гени, участващи в глюкозния метаболизъм в сърцето и скелетните мускули. 12 седмици на този начин на хранене е предизвикало повишена експресия на гени, които вземат участие в усвояването на мастни киселини от клетките и окислението им. Интересно е, че тези ефекти са се увеличавали при физическо натоварване [342]. 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 GLUT1 и лактат дехидрогеназа А, без данни за инсулиновата експресия [343]. В друго проучване се съобщава за редуциране на α - и β -клетъчната маса в панкреаса след дългосрочна кетодиета, което би могло да има отношение към наблюдаваната редукция в инсулиновата експресия [344].

ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати биха могли да се направят следните изводи:

1. По отношение на факторите, свързани с вродени тромбофилии, се установи за повечето от тях по-висока честота от популационната, без да се достига статистическа значимост. Най-висока е честотата на носителство на PAI-1 варианта *4G* при пациентите със ЗД тип 2. Честотата на FXIII полиморфизма е по-ниска от популационната му честота, което е в съответствие с данните за протективната роля на този полиморфизъм. При сравняване на честотите в групите със и без ССЗ, само вариантите в PAI-1 и фибриноген показват по-висока честота в групата със ССЗ, като статистическа значимост се достига за β -фибриноген – *455 G/A* генотипа. По отношение резултатите от генотипирането на MTHFR, ACE, ApoB, ApoE - не се установява статистически значима разлика в алелните и генотипните честоти на представените по-горе изследвани генетични варианти между изследваните групи пациенти с диабет със и без ССЗ.
2. При анализирането на следните miRNA: miRNA-16, miRNA-155-3p, miRNA-155-5p, miRNA-210, miRNA-221 и miRNA-424 при пациенти със ЗД със ССЗ (таргетна група) и без ССЗ (контролна група) сравнителният анализ на експресията показва статистически значимо повишаване на експресията на всички тези miRNA в таргетната група в сравнение с контролната като най-голямо увеличаване в експресията в тази група се наблюдава за miRNA-424 със средно RQ 10,5, следвано от miRNA-221 с RQ 7,5, miRNA-210 с RQ 6,2 и miRNA-155-5p с RQ 5,1. Най-малко увеличаване в експресията имаше за miRNA-16 и miRNA-155-3p – съответно 2,2 и 2,5 пъти.
3. Сравнението на експресията на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв на пациенти със ЗД без ДПНП и такива с наличие на това усложнение показва статистически значимо намаление на експресията ($p < 0.05$) при пациенти с полиневропатия в сравнение с пациенти без това усложнение. Установи се статистически значимо намаление на експресията на *VEGFR1* при пациенти със ЗД тип 2 в сравнение с контроли ($p < 0.01$).
4. Генно-експресионният анализ на инсулиновия ген установи намаляване в експресията му в групата на кетогенна диета около 4 пъти – 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. Кетогенната диета намалява също така експресията на гените *GSK*, *ABCC8* и *KCNJ11*. HDAC показва по-ниски стойности в групите, третирани с кетодиета, със или без суплементиране с витамин D.

5. Резултатите от групата само с витамин D суплементиране показват статистически значимо увеличаване на експресията на инсулиновия ген спрямо контролната. Приемът само на витамин D доведе до значително повишаване на експресията на гените *GSK* и *KCNJ11* в панкреаса на третираните мишки спрямо контролите. По отношение на теглото, с времето животните във всяка от групите (на кетодиета, суплементирани с витамин D, едновременно подложени на кетодиета и приемащи витамин D, и контроли) статистически значимо повишаваше теглото си ($p < 0.001$). В сравнение с контролната група и трите третирани експериментални групи показаха значително по-ниско тегло след първия месец ($p < 0.001$). Глюкозата в серума не се различава статистически значимо между групите. Кетотелата бяха статистически значимо повишени в групата на кетодиета. Едновременното суплементиране с витамин D обаче показва статистически значимо понижаване на кетонемията. Нивата на общия холестерол в кръвта не се различава статистически значимо между групите. Триглицеридемията в трите третирани групи показва тенденция към по-ниски стойности в сравнение с контролната група. Очаквано, нивата на 25ОНD в серума на животните, допълнително суплементирани с витамин D, бяха статистически значимо по-високи от тези на несуплементираните. Във връзка с резултатите от инсулина в серума се установи, че те корелират с генетичните.

ПРИНОСИ

1. За първи път в България се провежда проучване за асоциация на някои генетични варианти, свързани с повишен сърдечно-съдов риск, при пациенти със захарен диабет тип 2. За първи път се дискутира ролята на β -фибриногена като проинфламаторен белтък в развитието на ЗД тип 2 и неговите усложнения.
2. За първи път в България се изследва експресията на miRNA в плазма от пациенти със ЗД тип 2 и се оценява тяхното експресионно ниво спрямо сърдечно-съдовия статус на пациентите със ЗД.
3. За първи път в България се изследва експресията на *VEGFR2* и *VEGFR1* в клетки от периферна кръв чрез PCR в реално време с използването на относителния метод за сравнение между пациенти със ЗД тип 2 и контроли, а също така и се оценява тяхното експресионно ниво в зависимост от наличието на усложнения от заболяването при пациентите – в случая - ДПНП.
4. За първи път в България се изследват ефектите на кетогенната диета и на суплементацията с витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ И ПРОЕКТИ

Публикации в списания с Impact Factor:

1. Andreeva-Gateva PA, **Mihaleva ID**, Dimova II - Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular risk; what the pharmacotherapy can change through the epigenetics, Postgrad Med. 2019 Oct 29;1-17. doi: 10.1080/00325481.2019.1681215.

Цитирания на статията:

- Epigenetic signaling and RNA regulation in cardiovascular diseases - A Mongelli, S Atlante, T Bachetti, F Martelli... - International journal of ..., 2020 - mdpi.com
- АРТЕРИАЛНА ГИПЕРТОНИЯ И САХАРНИЯ ДИАБЕТ 2 ТИПА (обзор литературы) - АЭ Багрий, ОА Приколота... - Медико ..., 2021 - journal.ak-gin.org
- Кишкова микробиота як чинник епігенетичного програмування фенотипів ожиріння та цукрового діабету 2 типу. Огляд літератури - КО Шишкань-Шишова... - ... and Endocrine Surgery, 2021 - jcees.endocenter.kiev.ua
- Case of type 2 diabetes mellitus with edema resulting in subcutaneous insulin resistance syndrome - Y Hu, Q Zhu, X Yang, J Yan, J Shi - Journal of Diabetes ..., 2021 - Wiley Online Library
- Att med hjälp av omvårdnadsinterventioner motivera patienter med typ 2 diabetes till livsstillsförändring: en litteraturöversikt R Westberg, C Patriksson - 2021 - diva-portal.org

Публикации в списания без Impact Factor:

1. **И. Михалева**, П. Андреева – Гатева “Нови показатели за оценка на инсулинова резистентност и сърдечно-съдов риск”, Ендокринология, XXIV, 23-28, 2019
2. И. Димова, Р. Димова, С. Гирагосян, Р. Додова, **И. Михалева**, П. Гатева, Ц. Танкова “Експресия на съдово-ендотелния маркер VEGFR2 при пациенти със захарен диабет тип 2”, Военна медицина, LXXI, 32-37, 2019

Участия в международни и национални научни форуми:

1. **Михалева И**, Йончева М, Андреева – Гатева П. Оценка на сърдечно-съдов риск при пациенти със захарен диабет тип 2. VII конгрес по фармация с международно участие – 21-24 ноември 2019, Боровец

2. **I. Mihaleva**, M. Mincheva, M. Hristova-Savova, K. Belemezova, M. Rizov, S. Yovinska, R. Dimova, T. Tankova, P. Andreeva-Gateva, I. Dimova. Screening for genetic variants associated with cardiovascular diseases in patients with type 2 diabetes mellitus. European Human Genetics Virtual Conference – June 6-9, 2020
3. **I. Mihaleva**, P. Gateva, R. Nikolov, T. Markova, M. Shahid, R. Dimova, T. Tankova, I. Dimova. Computational Epigenetic Analysis of Genes for Cellular Stress and Toxicity in Complex Diseases. Международен симпозиум по Биоинформатика и Биомедицина - 8-10 Октомври 2020, Бургас, България
4. **I. Mihaleva**, M. Strokova, E. Dimova, P. Gateva, I. Dimova. Pancreatic expression of genes connected to glucose metabolism - nutrigenetic regulation. European Human Genetics Virtual Conference – August 28-31, 2021

Участия в научни проекти:

1. Значение на витамин D-статуса за епигенетичната регулация на метаболизма при захарен диабет тип 2. Фонд „Научни изследвания” - „КОНКУРС ЗА ФИНАНСИРАНЕ НА ФУНДАМЕНТАЛНИ НАУЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ– 2019 г.
2. Оценка на генетичния риск за сърдечно-съдови усложнения при пациенти с диабет тип 2 чрез ново-генерационно секвениране - „ГРАНТ-2019”, МУ-София
3. Експериментално нутритивно модулиране на експресията на гени от инсулиновия сигнален път. ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ Конкурс „Млад изследовател-2020“