

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„Проф. Д-р Параскев Стоянов“ Варна  
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ  
КАТЕДРА ПО БИОХИМИЯ, МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА И НУТРИГЕНОМИКА**

**Тодорка Димова Сократева**

**ПРОУЧВАНЕ НА МОЛЕКУЛНИТЕ МЕХАНИЗМИ НА  
ДЕЙСТВИЕ НА СЯРАСЪДЪРЖАЩИТЕ МИНЕРАЛНИ ВОДИ  
ОТ ВАРНЕНСКИЯ БАСЕЙН ВЪРХУ ЧОВЕШКИЯ  
МЕТАБОЛИЗЪМ С ОГЛЕД ИЗПОЛЗВАНЕТО ИМ КАТО  
ЛЕЧЕБНО-ПИТЕЙНО СРЕДСТВО**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд за присъждане  
на образователно и научна степен „доктор“  
по научна специалност Биохимия**

**Научен ръководител: проф. Диана Иванова, д.б.н.**

**Рецензенти:**

1. Проф. Илия Николов Илиев, д.б.
2. Проф. д-р Красимир Тихомиров Методиев, д.м.н.

**ВАРНА**

**2020**

*Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна и насочен за защита пред Научно жури.*

*Дисертационният труд обхваща 174 страници, 29 фигури и 21 таблици. Цитирани са 269 заглавия, от които 26 са на кирилица, а останалите на латиница.*

*Дисертантът е асистент в Катедрата по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет – Варна.*

## **НАУЧНО ЖУРИ**

### **Външни членове:**

1. Проф. Татяна Иванова Влайкова, д.б.
2. Проф. Илия Николов Илиев, д.б.
3. Доц. Татяна Янкова Манолова, д.б.

### **Вътрешни членове:**

1. Проф. Диана Георгиева Иванова, д.б.н.
2. Проф. д-р Красимир Тихомиров Методиев, д.м.н.

*Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 14.02.2020 г. от 11.00 часа в осма аудитория на Факултет Фармация при Медицински университет Варна.*

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	8
<b>III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	9
1. Изследване на физико-химичния състав на минерална вода .....	9
2. Провеждане на проучване със здрави доброволци.....	10
3. Анализ на класически биохимични маркери .....	12
3.1. Класически клинично-биохимични показатели в кръвен серум .....	12
3.2. Класически клинично-биохимични показатели в урина.....	12
3.3. Изчисляване на индекс на гломерулна филтрация на бъбреците (ИГФ) мл/мин.....	13
4. Определяне на оксидативен статус и антиоксидантна защита чрез оценка на специфични биохимични маркери .....	13
4.1. Показатели в кръвна плазма, оценяващи генерирането на активни кислородни форми.....	13
4.2. Показатели в кръвен серум, оценяващи антиоксидантната защита: концентрация на общи тиоли, общ и редуциран глутатион .....	14
5. Анализ на специфични биохимични маркери за възпаление в кръвен серум.....	14
6. Изследване на генна експресия на избрани гени в периферни моноклеарни клетки (РВМС) във връзка с оценка на антиоксидантния статус и противовъзпалителния отговор .....	15
7. Статистическа обработка и графично представяне на данните .....	16
<b>IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ</b> .....	18
1. Определяне на физико-химичен състав на минерална вода от Варненски басейн .....	18
1.2. Дискусия на резултатите от физико-химичния анализ на минерална вода от Североизточен Черноморски басейнов район .....	21
2. Резултати от анонимно анкетно проучване, проведено сред жители на гр. Варна и резултати от анкетно проучване, проведено сред доброволците в изследването относно режима на наливане – честота, количество и съхранение на минералната вода, и установяващо причините за наливане на минерална вода.....	29

2.1. Дискусия на резултатите от анкетните проучавания относно режима на наливане - честотата, количество и съхранение на минералната вода, както и на причините за наливане на минерална вода .....	34
3. Интервенция с прием на минерална вода .....	37
3.1. Резултати от анкетно проучване за ефектите от приема на минерална вода .....	37
3.2. Дискусия на резултатите от проведеното анкетно проучване за ефектите от приема на минерална вода .....	38
3.3. Ефект на минералната вода върху антропометричните показатели .....	39
3.4. Ефект на минералната вода върху нивата на класически биохимични маркери в кръв .....	41
3.5. Ефект на минералната вода върху нивата на класически биохимични показатели в урина .....	42
3.6. Ефект на минералната вода върху функцията на бъбреците.....	43
3.7. Сравнение на резултатите по групи в зависимост от предпочитания източник на минерална вода .....	44
3.9. Дискусия на резултатите от анализа на класическите биохимични маркери в кръв и урина.....	46
4. Ефект на минералната вода върху специфични биохимични и молекулярно генетични маркери от оксидативен статус и възпаление в кръвен серум.....	50
4.1. Ефект на минералната вода върху маркери на оксидативен статус в кръвен серум .....	50
4.2. Ефект на минералната вода върху маркери на възпалението.....	51
4.3. Корелация между маркери на антиоксидантен статус и маркери за оксидативен стрес в плазма.....	52
4.4. Ефект на минералната вода върху експресията на гени, свързани с възпалението и редокс баланса в изолирани РВМС клетки .....	53
4.5. Сравнение на резултатите от анализирания специфични маркери в зависимост от предпочитания източник на минерална вода.....	53
4.6. Дискусия на резултатите от изследваните специфични биохимични и молекулярно-генетични маркери.....	55
5. Ефекти на минералната вода в зависимост от начина на живот .....	59
5.1. Влияние на ИТМ върху ефектите от приема на минерална вода.....	59
5.2. Влияние на физическата активност върху ефектите от приема на минерална вода .....	61

5.3. Влияние на тютюнопушенето върху ефектите от приема на минерална вода .....	62
5.4. Влияние на алкохолната консумация върху ефектите от приема на минерална вода .....	63
5.5. Дискусия.....	64
<b>V. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ .....</b>	<b>68</b>
1. Изводи .....	68
2. Приноси .....	69
<b>VI. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>71</b>
<b>VII. ФИНАНСИРАНЕ .....</b>	<b>72</b>

## СПИСЪК НА ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

ВФА – висока физическа активност  
НМ - хиломикрони  
K<sup>+</sup><sub>АТФ</sub> – АТФ зависими калиеви канали  
РВМС – периферни мононуклеарни кръвни клетки  
А – консумиращи високоалкохолни напитки  
АКФ – Активни кислородни форми  
АТФ – аденозин трифосфат  
ГГТ - гама-глутамил трансфераза  
ГМК – гладко мускулни клетки  
ЕДТК – етилендиаминтетраоцетна киселина  
ИТМ – индекс на телесната маса  
МДА – малонов диалдехид  
НА – некосумиращи и рядко консумиращи високоалкохолни напитки  
НП – непушачи  
НФА – ниска физическа активност  
П – пушачи  
РКМ – реактивни кислородни метаболити  
РКМ – реактивни кислородни метаболити  
СЕК – съдови ендотелни клетки  
ССЗ – сърдечно съдови заболявания  
ССМВ - сярасъдържаща минерална вода  
ССС – сярасъдържащи съединения  
ФДЕ – фосфодиестераза  
цАМФ – цикличен аденозин монофосфат

цГМФ - цикличен гуанозин монофосфат  
CBS – цистатионин бета-синтаза,  
CSE\* - цистатионин гама-лиаза (същият ензим се съкращава също Cse, CGL СТН, СТТ)  
eNOS – ендотелна азотен оксид синтаза  
GCL – глутамат-цистеин лигаза  
GSH – редуциран глутатион  
GSSG – окислен глутатион  
hs-CRP –С-реактивен протеин  
ICAM – 1 – междуклетъчна адхезионна молекула  
EFSA – Европейска асоциация по безопасност на храните  
ERK – екстрацелуларна сигнална каскада  
HDL – липопротеинови комплекси с висока плътност  
iNOS – индуцируема азотен оксид синтаза  
LDL – липопротеинови комплекси с ниска плътност  
MAPK – митоген активирана протеин киназа  
MBST – меркаптопириват сулфотрансфераза  
NF-kB - ядрен фактор капа-В  
PAPS – 3-фосфоаденозин-5-сулфофосфат  
PBS – Phosphate buffered saline (изотоничен фосфатен буфер)  
PCR – polymerase chain reaction (полимеразна верижна реакция)

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Научните проучвания върху факторите, влияещи на човешкото здраве, се ограничават най-вече до начина на живот, влиянието на храната, физическата активност, фактори като социален статус, тютюнопушене и други. Приемът на вода се разглежда предимно от гледна точка на осигуряване на водния баланс и науката за хранене не отчита в достатъчна степен приема на макро-и микроелементи в състава на питейните води. Лечебните ефекти на използваните за питейни нужди минерални води се приемат като даденост и оценката им е базирана на емпирични наблюдения, свързани предимно със симптомите на различни заболявания. Към момента данните за проведени интервенции с прием на минерални води при хора са твърде оскъдни и противоречиви.

Минералните води на Северното Черноморие съставляват почти една четвърт от общия хидроминерален ресурс на България. Оскъдни са данните, както от експериментални модели, така и от проучвания при хора, за биологичните ефекти на съдържащи сероводород и разтворими сулфиди минерални води, каквито са тези в Североизточен черноморски район. В същото време хиляди хора използват активно за питейни нужди тези води. Това обуславя нуждата от систематично научно изследване върху молекулните механизми на ефектите от приема на минерални сярасъдържащи води при хора и дава възможност за получаването на оригинални данни за ефекта върху човешкия метаболизъм на сярасъдържащите минерални води като лечебно-питейно средство.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Настоящото научно изследване има за цел да се проучат молекулните механизми на действие на Варненските минерални води върху човешкия метаболизъм. Очаква се да бъдат получени данни за ефектите на водата върху биохимични маркери в кръв и урина, маркери за оксидативния статус и експресията на гени, свързани с антиоксидантната защита и метаболизма на сярна съдържащи аминокиселини.

Постигането на тази цел налага изпълнението на следните задачи:

1. Изследване на физико-химичния състав на Варненската минералната вода от три обекта: обществена чешма под Аквариума, обществена чешма до "Дом Младост" и балнеология при х-л „Естрея Резиденс“, кк „Св.св. Константин и Елена“;

2. Провеждане на интервенция върху доброволци с прием на минерална вода от обществени чешми в гр. Варна;

3. Фенотипиране на метаболитни промени като резултат от приема минерална вода от обществени чешми в гр. Варна;

4. Проучване влиянието на приема на Варненска минерална вода върху нивата на генна експресия в изолирани РВМС клетки във връзка с антиоксидантната защита и възпалението;

5. Анализ на механизмите на действие на Варненската минерална вода във връзка с потенциални здравни ефекти и възможността за използването ѝ като лечебно питейно средство.



### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Изследване на физико-химичния състав на минерална вода

##### *Изследвани сондажи*

Предмет на изследването е минералната вода от 3 сондажа от Варненски басейн: обществена минерална чешма до Дом „Младост“ (P-106x), обществена минерална чешма под Аквариума (P-1x) и балнеология при хотел „Естрея Резиденс“, к.к. „Св. св. Константин и Елена“ (P-6x).

##### *Пробовземане*

Пробовземането е извършено на 16.03.2017 г., съгласно БДС ISO 5667-11; 11 БДС EN ISO 19458, от представител на Лабораторен изпитвателен комплекс при „ВиК – Варна“ ООД в присъствието на докторанта ас. Тодорка Сократева.

Процедурата по пробовземане включваше темпериране чрез няколкократно пълнене и изпразване на бутилката с течаща минерална вода; измерване на температурата на минералната вода с калибриран термометър И№5.8 ( $37.0 \pm 0,6$ )°C.; вземане на проба минерална вода в стъклена бутилка на шлиф (тип "Карлсруе") с вместимост 250 ml за изпитване на свободен сероводород и разтворени сулфиди (след вземане на пробата стъклената бутилка се съхраняваше на тъмно); вземане на проба минерална вода в пластмасови бутилки с вместимост 2.5 L за изпитване на: физико-химични показатели по Наредба 9/16.03.2001 г. и Наредба 14, целеви показатели, невлизащи в Наредба 9 и избрани показатели в динамика. Бутилките бяха напълвани с приливане и въздухът бе изгонван преди затварянето им.

##### *Физикохимичен анализ*

Взетите проби са кодирани и подадени за анализ в акредитиран Лабораторен изпитвателен комплекс при „ВиК – Варна“ ООД, съгласно изискванията на БДС EN ISO/IEC 17025:2006.

Анализът на пробите от трите водоизточника (Естрея, Аквариума, Дом Младост) е започнал след темпериране на пробите на стайна температура ( $21 \pm 3$ °C), в 13.30 часа на 16.03.2017 г.

Изследвани са:

- класически физикохимични показатели, включени в **Наредба №9** от 16.03.2001 г. за качеството на водата, предназначена за питейно-битови цели, които са идентични с тези, посочени в **Наредба №14** за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., посл.изм.бр. 70 от 2004 г.), , **а именно: температура, цвят** по Рубльовската скала (БДС 8451:1977), **мирис** (БДС 8451:1977), **мътност** (БДС EN ISO 7027-1:2017), **активна реакция** (БДС EN ISO 10523:2012), **амониев йон** (ВМИ 3/2003), **нитрити** (ВМИ 4/2003), **нитрати** (ВМИ 5/2003), **електропроводимост** (БДС EN 27888:2002), **обща твърдост** (БДС 3775:1987), **общ органичен въглерод** (ВМИ 2/2007), **калций** (БДС ISO 6058:2002), **магнезий** (БДС 7211:1982/отменен без замяна), **сулфати**

(ВМИ 9/2004), **фосфати** (ВМИ 7/2003), **хлориди** (БДС 3414:1980), **желязо (тривалентно)**, (ВМИ 19/2002), **желязо общо** (ВМИ 19/2002), **хром (шествалентен)**, (ВМИ 26/2003), **флуориди** (ВМИ 11/2005), **селен** (БДС 7213:1978), **натрий** (ВМИ 17/2007);

- целеви показатели, невлизащи в Наредба 9/16.03.2001: **амоняк** (БДС 17.1.4.10:1979), **калий** (ВМИ 16/2008), **обща и съставна алкалност** (БДС EN ISO 9963-1:2003), **общ сух остатък** (БДС 17.1.4.04:1980), **разтворени сулфиди и свободен сероводород** (ВМИ 10/2004);

- избрани показатели са изследвани в динамика (първи ден; след едно денонощие, след 3 денонощия; след 7 денонощия): цвят, мирис, мътност, активна реакция, амониев йон, амоняк, нитрити, електропроводимост, обща и съставна алкалност, разтворени сулфиди и сероводород.

Температурата на изпитване на всички параметри е  $T 21 \pm 3^{\circ}\text{C}$  с изключение на общ сух остатък, анализиран при  $T 105^{\circ}\text{C}$ , а също активна реакция, електропроводимост и мирис, анализирани при  $T 20^{\circ}\text{C}$ .

Анализът на пробите от трите водоизточника (Естрей, Аквариума, Дом Младост) е започнал след temperиране на пробите на стайна температура ( $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), в 13.30 часа на 16.03.2017 г.

## **2. Провеждане на проучване със здрави доброволци**

Проучването на молекулните механизми на въздействие на Варненските минерални води върху човешкия метаболизъм е интервенционално и включва три етапа - преинтервенционален, интервенционален и постинтервенционален.

**В преинтервенционалния етап** чрез обяви са набирани и селектирани участниците. Планиран брой - 50. Обект на изследването са клинично здрави индивиди от двата пола, отговарящи на критериите за включване в изследването, а именно: европеидна раса, възраст между 40 и 65 г., жителство и месторабота в гр. Варна, които не са консумирали минерална вода от обществено достъпните чешми в града в предходните три месеца.

Сред критериите за изключване на участниците са: възраст под 40 г. и над 65 г., бременност, кърмене, хронични и остри възпалителни заболявания, извършени хирургични операции през последните 6 месеца, прием на лекарства (антидепресанти, стероидни противовъзпалителни средства, хормон-заместителна терапия със стероидни хормони, диуретици и др.), прием на хранителни добавки, съдържащи магнезий, калций, желязо, витамини, селен.

Всички доброволци са попълнили „Анкетна карта“ с въпроси относно здравословното им състояние, хранителни навици и начин на живот. Одобрените за участие доброволци са подписали “Информирано съгласие“, с което са информирани за вида на изследването, извършваните процедури и условията на съхранение на резултатите.

Работата с изследваните доброволци е одобрена от Комисията по етика на научните изследвания при МУ-Варна, Решение № 62 от 04.05.2017 г.

Одобрените и включени в изследването доброволци са поетапно настанявани (преди и след интервенцията) за 2 нощувки на пълен пансион в хотел "Естрей Резиденс", съгласно Договор Рег.№ ДУ-100/13.06.2017 г., където се намира Отделението по рехабилитация на Клиниката по физикална и рехабилитационна медицина към УМБАЛ „Св. Марина“.

В този етап доброволците са инструктирани относно организацията на вземането на проби венозна кръв след 12 часово гладуване, предоставяни им са контейнери за събиране на 24-часова урина със съответните инструкции и указания за водене на „Дневник за честотата на прием и количеството на приетата минерална вода“. Участниците са инструктирани да не променят хранителните си навици и начин на живот по време на целия интервенционен период.

**Интервенционният етап** се състои в прием на минерална вода в продължение на 8 седмици в количество, определено по литературни данни, 20 mL/kg, но не по-малко от 800 mL в рамките на 24 часа.

**В постинтервенционния етап** участниците са повторно настанявани в същия хотел за еднократно вземане на венозна кръв и събиране на 24-часова урина и финално верифициране на интервенцията чрез проследяване на „Дневника за прием на вода“, воден от участниците по време на интервенцията.

### ***Събиране на проби***

#### ***Вземане на кръв***

Във вакутейнери за плазма с хепарин е взета венозна кръв на гладно преди (T0) и след (T1) интервенцията от всеки доброволец с общ обем 16 mL. разпределена както следва:

- 4 mL за определяне на класически биохимични маркери
  - 4 mL се темперират за 15 мин. на стайна температура и се центрофугират 15 мин. на 3500 оборота за отделяне на серум, разпределен на аликвоти от 200  $\mu$ L и съхраняван на  $-80^{\circ}\text{C}$  за последващи специфични биохимични изследвания
  - 8 mL за отделяне на моноклеарни кръвни клетки (РВМС) и изолиране на РНК, съхранявана при  $T - 80^{\circ}\text{C}$  за последващи молекулярно генетични изследвания
- Венозната кръв е взета от квалифицирано медицинско лице.

#### ***Събиране на 24-часова урина***

24 часовата урина е събирана в контейнери от поливинилхлорид с обем 2,7 L по следния начин: сутрин при събуждане от сън, първата порция се извърля и след това всяка следваща порция се събира в съда до следващата сутрин. При всяко прибавяне на урина, съдът се разклаща добре, съхранява се на хладно. Събирането на урината приключва с добавянето на първата порция урина от следващата сутрин. Диурезата се отчита и записва. От всяка проба са отделяни малки количества в контейнери с обем 50 mL за класически биохимичен анализ.

### ***Антропометрични измервания***

Измервани са височина (m) и килограми (kg), изчисляван е индекс на телесна маса (ИТМ) в  $\text{kg}/\text{m}^2$ ; измервани са обиколки на талия и ханш и са изчислявани съотношенията им преди (T0) и след (T1) интервенцията.

### ***Кръвно налягане***

Измерено е в седнало и релаксирано положение преди (T0) и след (T1) интервенцията с автоматизирано устройство Tensoval comfort classic (Hartman group).

### ***Допълнителни анкетни карти***

В хода на изследването някои доброволци споделиха наблюдения по време на интервенцията, което наложи включване на две допълнителни анкети карти – една за проучване субективните ефекти от приема минерална вода на включени в изследването доброволци, и друга – за граждани на гр. Варна, невяклучени в изследването, но регулярно консумиращи минерални води от обществените чешми в града. Целта на втората анкетна карта бе да се събере възможно най-пълна информация от потребителите на минерална вода за вида на Варненската минерална вода, причините и/или заболяванията, поради които те я пият; честота и количество на наливане/пиене, условия за съхранение и др. Двете анкети са одобрени от Комисията по етика на научните изследвания при МУ-Варна, Решение № 73 от 29.03.2018 г.

## **3. Анализ на класически биохимични маркери**

### ***3.1. Класически клиничко-биохимични показатели в кръвен серум***

Анализът на класическите биохимични показатели в кръвен серум на доброволци преди (T0) и след (T1) интервенцията с минерална вода се извърши от СМДЛ „Лаборекспрес 2000“ ООД. Бяха изследвани показатели: оценяващи липидната обмяна: общ холестерол, LDL-холестерол, HDL-холестерол, ТАГ; показатели, оценяващи аминокиселинната обмяна: гама-глутамил трансфераза (ГГТ); показатели, оценяващи водноелектролитния баланс: алдостерон, калий, натрий, хлориди, калций, фосфор; показатели, оценяващи възпалителния отговор: високочувствителен С-реактивен протеин (hs-CRP)

### ***3.2. Класически клиничко-биохимични показатели в урина***

Анализът на биохимичните показатели в урина на доброволци преди (T0) и след (T1) интервенция с минерална вода се извърши от СМДЛ „Лаборекспрес 2000“ ООД. Изследвани бяха следните показатели: оценяващи филтрационната способност на бъбреците: диуреза, рН, белтък, глюкоза, кетониви тела, еритроцити, левкоцити, нитрити, билирубин, уробилиноген, кръв, седимент в 24-часова урина.

Всички изследвания в кръвен серум и урина са извършени в рамките на същия ден на вземане на пробите при спазени правила за качествен вътрешен и външен контрол в лабораторията.

### ***3.3. Изчисляване на индекс на гломерулна филтрация на бъбреците (ИГФ) мл/мин***

Индексът на гломерулна филтрация на бъбреците е изчислен по формулата на Кокрофт-Гаулт (Cockcroft and Gault, 1976). Формулата използва серумната концентрация на креатинина и измереното тегло на пациента, за да се предскаже отделеният креатинин.

## **4. Определяне на оксидативен статус и антиоксидантна защита чрез оценка на специфични биохимични маркери**

За оценка на оксидативния статус и антиоксидантната защита са използвани търговски китове. Изследвани са показатели, свързани с генерирането на активни кислородни форми и такива, които оценяват антиоксидантната защита на клетката и кръвната плазма/серум.

### ***4.1. Показатели в кръвна плазма, оценяващи генерирането на активни кислородни форми***

#### *Определяне концентрацията на малонов диалдехид (МДА)*

Определянето на МДА в серум е извършено спектрофотометрично, посредством търговски кит на Northwest Life Science Specialties, LLC, Vancouver, Canada, като лабораторният протокол следва напълно указанията на производителя. Принципът на метода се основава на реакция на МДА с тиобарбитурова киселина (ТК) и формиране на стабилни МДА-ТК<sub>2</sub> комплекси, които се измерват. Концентрацията на МДА е определено чрез калибровъчна крива, построена от стойностите на абсорбциите на стандартни разтвори на МДА и е представена в  $\mu\text{mol/L}$ . Измерванията са извършени при  $\lambda=532\text{ nm}$  на многофункционален четец Synergy 2 (BioTek).

#### *Определяне концентрацията на реактивни кислородни метаболити (РКМ)*

Реактивните кислородни метаболити, предимно хидропероксиди и органични радикали в плазма, са определяни с търговски кит на Diacon International (Grosseto, Italy), според указанията на производителя. В присъствието на желязо, освободено от плазмените протеини в ацетатен буфер, РКМ генерират алкоксилни ( $\text{R-O}\cdot$ ) и пероксилни ( $\text{ROO}\cdot$ ) радикали в реакцията на Fenton. Тези радикали окисляват алкилно-заместени ароматни амини ( $\text{A-NH}_2$ , присъстващи в хромогенна смес, като образуват оцветени в розово съединения ( $[\text{A-NH}_2\cdot]^+$ ). Абсорбцията на пробите е измерена спектрофотометрично (Synergy 2, BioTek) срещу празната на реагента при дължина на вълната  $\lambda=505\text{ nm}$ . Получените резултати в Caratelli Units (CARR U), са преизчислявани в  $\text{mg}$

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/dL, като 1 CARR U = 0.08 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/dL.

#### **4.2. Показатели в кръвен серум, оценяващи антиоксидантната защита: концентрация на общи тиоли, общ и редуциран глутатион**

##### *Определяне концентрацията на общи тиоли*

Нивата на общите тиоли са измерени с търговски кит на Diacron International (Grosseto, Italy), като лабораторният протокол следва напълно указанията на производителя. Методът се базира на способността на тиоловите групи в плазма в буфериран разтвор (Реагент 1) да реагират с 5,5 дитиобис-2-нитробензоена киселина (DTNB), образувайки фотометрично измерим цветен комплекс, разтворим в хромоген (Реагент 2). Абсорбцията се мери при дължина на вълната  $\lambda=405$ . Резултатите са представени в  $\mu\text{mol/L}$ .

##### *Определяне концентрацията на окислен и редуциран глутатион*

Концентрациите на окислен и редуциран глутатион в плазма са определени спектрофотометрично чрез търговски кит на Sigma-Aldrich Co (USA). Методът е ензимен, базиран на редукцията на окисления глутатион (GSSG) с глутатион редуктаза и последваща колориметрична реакция с DTNB или реактив на Елман до получаване на 5-меркапто-2 нитробензоена киселина (TNB), вещество с жълт цвят, чиято абсорбция се измерва при дължина на вълната  $\lambda=412$  nm. Определянето на GSSG е извършено след добавяне на маскиращ реагент за редуциран глутатион (GSH). Количеството на редуцирания глутатион е изчислено от разликата между общия глутатион и окисления. Като индекс на оксидативен стрес е изчислено съотношението окислен глутатион/редуциран глутатион (GSSG/GSH). Концентрациите на GSSG (проба А) и концентрациите на общия глутатион (GSH + GSSG) на проба В, преди и след интервенцията, се отчитат чрез стандартни криви, построени от стойностите на абсорбциите на стандартни разтвори на съответно за GSSH и общия глутатион. Нивата на общия глутатион, GSH и GSSG са представени в  $\mu\text{mol/L}$ .

#### **5. Анализ на специфични биохимични маркери за възпаление в кръвен серум**

##### *Определяне концентрацията на ICAM-1 и VCAM-1*

Нивата на междуклетъчна адхезионна молекула (ICAM-1) и нивата на съдова клетъчна адхезионна молекула (VCAM-1) са определени чрез ензимно-свързан имуносорбентен ELISA анализ посредством търговски китове "Human ICAM-1 ELISA Kit" на Sigma-Aldrich, USA и „Human VCAM-1 ELISA Kit“ на Sigma-Aldrich, USA, съответно, при напълно спазени инструкции на производителя. Методът използва специфично улавящо антитяло, имобилизирано върху 96 ямкова плака. Абсорбцията на пробите се мери при дължина на вълната  $\lambda=450$  nm. Всички проби са измервани в две повторения и са съотнесени към стандартна крива. Резултатите са представени в  $\text{ng/mL}$ .

## **6. Изследване на генна експресия на избрани гени в периферни мононуклеарни клетки (PBMC) във връзка с оценка на антиоксидантния статус и противовъзпалителния отговор**

Анализирана е степента на експресия на гени, свързани с антиоксидантната защита –глутамат-цистеин лигаза (GCL), възпалителния отговор - съдови адхезионни молекули (ICAM-1, VCAM-1).

### ***Изолиране на PBMC от пълна кръв***

Част от взетата пълна кръв от доброволците в интервенцията е използвана за изолиране на периферни мононуклеарни клетки (PBMC). За целта са използвани готови търговски сепарационни центрофужни епруветки LeucoSep™ (Greiner Bio-One GmbH, Germany), съдържащи пореста бариера, която осигурява разделяне на клетъчните фракции посредством плътностно-градиентно разпределение по центробежната сила. Спазени са всички инструкции за изолиране на PBMC и получената накрая фракция се разрежда с 200 mL PBS и се използва за изолиране на РНК.

### ***Изолиране на РНК***

Изолирането на РНК от мононуклеарни клетки от периферна кръв е извършено с помощта на Rn's FastTri reagent (Bioron, Germany), като лабораторният протокол по изолирането следва указанията на производителя.

### ***ДНКазно третиране на тотална РНК***

За пречистване на изолираната РНК от контаминация с геномна ДНК е приложено ДНКазно третиране с RQ1 RNase-Free DNase 10x кит (Promega, USA), като лабораторният протокол следва напълно указанията на производителя. Реакцията е осъществена на GeneAmp PCR 7500 thermal cycler (Applied Biosystem). Пречистената РНК се мери спектрофотометрично за определяне на окончателната ѝ концентрация.

### ***Обратна транскрипция – RT-PCR***

Първата стъпка при количествен Real-Time PCR анализ е осъществяване на обратна транскрипция на изолираната РНК и синтез на кДНК. РНК (100 ng) е обратно транскрибирана с помощта RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA), съдържащ всички необходими реагенти за работа – олиго (dT)<sub>18</sub> праймер, реакционен буфер, нуклеазно чиста вода, РНКазен инхибитор, микс от нуклеотиди (дНТФ) и RevertAid™ обратна транскриптаза. Реакцията се провежда според указанията на производителя на GeneAmp PCR 7500 thermal cycler (Applied Biosystem) при краен обем на реакционната смес 10 µL. Синтезираните кДНК се разреждат с 30 µL TE буфер и се съхраняват на - 80°C.

### ***Real Time qPCR***

Втората стъпка при количествен Real-Time PCR анализ е амплификация на кДНК в реално време с ген-специфични праймери. В хода на изследването бяха

извършени експерименти за установяване експресията на гените: цистатионин бета-синтаза (CBS), цистатионин гама-лиаза (CGL), глутатион пероксидаза (GPx), индуцируема азотен окис синтаза (iNOS), с различни ендогенни контроли RPL0, RPL37a и ACTB1, но бяха получени неспецифични амплификации и поради тази причина бяха изключени от докладваните резултати. Нуклеотидната последователност на праймерите е представена в таблицата 1. Амплификацията е извършена с помощта на търговски кит КАРА SYBR Fast Universal qRT-PCR kit (Кара Biosystems, USA). Анализът е извършен на апарат ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Стойностите на генната експресия на GCL и ICAM-1 са изчислени по 2- $\Delta\Delta C_t$  метода (Livak and Schmittgen, 2001) и са изразени в относителни единици иРНК.

*Таблица 1. Нуклеотидната последователност на праймерите, използвани за анализ на нивото на генната експресия*

<b>Гени</b>	<b>Нуклеотидна последователност</b>
RPLP0 (Sigma Aldrich, USA)	Forward 5'-AGCCCAGAACACTGGTCTC -3', Reverse 5'-ACTCAGGATTTCAATGGTGCC -3'
ACTB1(Bioneer, USA)	Forward 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGA -3' Reverse 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA -3'
RPL37A (Bioneer, USA)	Forward 5' -ATTGAAATCAGCCAGCACGC -3' Reverse 5'-AGGAACCACAGTGCCAGATCC -3'
ICAM-1 (Bioneer, USA)	Forward 5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT -3', Reverse 5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC -3'
VCAM-1 ((Sigma Aldrich, USA)	Forward 5'-GGGAAGATGGTCGTGATCCTT -3' Reverse 5'-TCTGGGGTGGTCTCGATTTTA -3'
GCLc (Bioneer, USA)	Forward 5'-GGAGGAAACCAAGCGCCAT -3', Reverse 5'-CTTGACGGCGTGGTAGATGT -3'
CBS (Sigma Aldrich, USA)	Forward 5'-GGCCAAGTGTGAGTTCTTCAA -3' Reverse 5'-GGCTCGATAATCGTGTCCCC -3'
CTH (Sigma Aldrich, USA)	Forward 5'-CATGAGTTGGTGAAGCGTCAG -3' Reverse 5'-AGCTCTCGGCCAGAGTAAATA -3'
iNOS (Sigma Aldrich, USA)	Forward 5'-TTCAGTATCACAACCTCAGCAAG -3' Reverse 5'-TGGACCTGCAAGTTAAAATCCC -3'

## **7. Статистическа обработка и графично представяне на данните**

Статистическата обработка на резултатите е извършена с помощта на статистическите пакети GraphPad Prism, версия 6 и IBM SPSS, версия 19. Бяха използвани следните методи:

- **Дескриптивен анализ** – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите фактори, разбити по групи на изследване;



- Вариационен анализ – за оценка на характеристиките на централната тенденция и разсейване на данните;
- t-тест на Student – за проверка на хипотези за различие между две зависими или независими извадки;
- Непараметричен корелационен анализ на Spearman - за търсене на зависимост между два количествени признака;
- Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.

Получените стойности са представяни като средна стойност от минимум две измервания  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност (Mean  $\pm$  SEM). За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, бе прието  $p < 0.05$

## IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Определяне на физико-химичен състав на минерална вода от Варненски басейн

#### Подбор на водоизточниците

Качеството на водите, включително съдържанието на макро и микроминерали в тях, както и тяхната стабилност по време на съхранение, е от първостепенно значение за потребителите. Що се касае до приема на минерална вода, от значение е най-вече нейният химичен състав - комбинацията между отделните компоненти, катионите и анионите, които варират в различните видове минерална вода. Към днешна дата не се изследва физико-химичният състав на минералните води от обществено достъпните чешми в гр. Варна, 4 броя („Дом Младост”, кв. „Аспарухово”, до Багра, „Аквариума”, Плувен комплекс „Приморски”). Техните води са от малмо-валанджинския водоносен хоризонт и поради общото геологично дъно очаквахме да имат сходни физико-химични характеристики. В регистрите на Министерството на здравеопазването - за издадените сертификати за бутилиране на натурална минерална вода и за издадените балнеологични оценки за минерални води, са налични данни за издадени сертификати за сондажите, захранващи две от чешмите (Аквариума и Дом Младост), както и на минералните води от при хотел „Естрей Резиденс“, к.к. „Св. св. Константин и Елена“, където е изнесе базата на Клиниката по физиотерапия, рехабилитация, морелечение при МБАЛ Св. Марина – Варна, МУ- Варна.

Имайки предвид гореизложеното беше взето решение да се анализират минералните води от три водоизточника: обществена чешма под Аквариума (сондаж Р-1х), обществена чешма до "Дом Младост" (сондаж Р-106х) и „Естрей Резиденс“(сондаж Р-6х).

#### Пробовземане

Пробовземането бе извършено на 16.03.2017 г. в следната последователност: *Проба 1* Естрей, *Проба 2* Аквариума и *Проба 3* Дом Младост.

**Резултати от анализ на класически физико-химичния състав на минерална вода по показатели, включени в Наредба 9/16.03.2001 г.**

Резултатите от анализите за физико-химичния състав на минералната вода от трите изследвани водоизточника са представени на таблица 2.

Таблица 2. Резултати от анализ на физико-химичния състав на минерална вода от Естрей, Аквариум и Дом Младост по показатели, включени в Наредба 9/16.03.2001 г.

Показател	Единица	Естрей	Аквариум	Дом Младост	МДК*
Цвят	градус	0	0	0	Без значими колебания
Мирис (20°C)	бал	2	2	3	Без значими колебания
Мътност	FNU	0,24 ± 0,05	<0,05	1,26 ± 0,09	Без значими колебания
Активна реакция (20°C)	pH единици	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,18 ± 0,05	6,5-9,5
Амониев йон	mg/L	0,18 ± 0,02	0,29 ± 0,003	0,20 ± 0,02	0,50
Нитрити	mg/L	<0,05	<0,05	<0,05	0,50
Нитрати	mg/L	<3	<3	<3	50
Електропроводимост (20°)	µS/cm	677 ± 30	768 ± 34	743 ± 33	2000
Обща твърдост	mg eqv/L	4,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1	12
Калций	mg/L	44 ± 1	43 ± 1	42 ± 1	150
Магнезий	mg/L	27 ± 1	27 ± 1	24 ± 1	80
Сулфати	mg/L	54 ± 5	77 ± 7	50 ± 7	250
Фосфати	mg/L	<0,03	<0,03	0,040±0,004	0,50
Хлориди	mg/L	77 ± 3	104 ± 5	100 ± 4	250
<b>Желязо тривалентно</b>	<b>µg/L</b>	<b>44 ± 5</b>	<b>34 ± 4</b>	<b>17 ± 2</b>	<b>200</b>
Желязо общо	µg/L	70 ± 8	59 ± 7	37 ± 4	200
Хром шествалентен	µg/L	<10	<10	<10	50
Флуориди	mg/L	0,50 ± 0,07	0,71 ± 0,09	0,62 ± 0,08	1,5
Селен	µg/L	<1	<1	<1	10
<b>Натрий</b>	<b>mg/L</b>	<b>46 ± 6</b>	<b>39 ± 5</b>	<b>69 ± 8</b>	<b>200</b>
<b>Общ органичен въглерод</b>	<b>mg/L</b>	<b>9,3 ± 0,9</b>	<b>7,5 ± 0,8</b>	<b>12 ± 1</b>	<b>Без значими колебания</b>

Резултатите са представени като стойност и неопределеност ±U; „< ...“ – под границата на количествено определяне на метода; \* МДК - максимална

допустима концентрация по нормативен документ, Наредба 9/16.03.2001. Условието на изпитване за всички параметри са  $T 21 \pm 3^{\circ}\text{C}$  с изключение за параметрите електропроводимост, активна реакция и мирис, изследвани при  $T 20^{\circ}\text{C}$ .

### Резултати от анализ на целеви физико-химични параметри

Целта на настоящия дисертационен труд наложи изследване на допълнителни показатели (извън Наредба 9 и Наредба №14) с потенциален ефект върху човешкото здраве, като: разтворени сулфиди и свободен сероводород, калий, амоняк, обща и съставна алкалност и общ сух остатък в минералната вода. Резултатите са представени на таблица 3.

*Таблица 3. Резултати от анализ на целеви физико-химични параметри на минерална вода от Естрея, Аквариум и Дом Младост извън Наредба №9 и Наредба №14.*

Обект	Естрея	Аквариум а	Дом Младост	Условия на изследването
Амоняк [mg/L]	$0,24 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,10$	$(21 \pm 3)^{\circ}\text{C}$
Калий [mg/L]	<5	$7,0 \pm 0,8$	$7,8 \pm 0,9$	$(21 \pm 3)^{\circ}\text{C}$
Обща и съставна алкалност [mmol H <sup>+</sup> /L]	$4,6 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,2$	$(21 \pm 3)^{\circ}\text{C}$
Общ сух остатък [mg/L]	$400 \pm 19$	$445 \pm 21$	$377 \pm 18$	$(105 \pm 1)^{\circ}\text{C}$
Разтворени сулфиди и свободен сероводород [mg/L]	$1,2 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,3$	$(21 \pm 3)^{\circ}\text{C}$

Резултатите са представени като стойност и неопределеност  $\pm U$ ; „< ...“ – под границата на количествено определяне на метода.

В резултат от извършените *целеви анализи* са получени **нови данни за химичния състав** на минерална вода от Варненски басейн по показателите, оценяващи съдържанието на биологично активни съставки и имащи отношение към здравето на човека.

### Резултати от мониторинг на минерална вода

С цел да се проследят в динамика промените във физико-химичния състав на минералната вода, избрани показатели са изследвани през първия ден от вземане на пробата, след едно денонощие, след 3 и след 7 денонощия (лагеруване на водата), при стайна температура. Резултатите са представени в таблица 4.

Таблица 4. Резултати от изследване на избрани физико-химичния параметри в динамика (първи ден, след едно денонощие, след 3 денонощия, след 7 денонощия) на проба от обществена чешма до Аквариума.

Показател/единици	Първи ден	След 24 часа	След 3 дни	След 7 дни
Цвят [градус]	0	0	0	0
Мирис [бал]	2	1	0	0
Мътност [FNU]	<0,05	0,15±0,03	0,17±0,03	0,26±0,05
<b>Активна реакция [pH]</b>	<b>7,6±0,1</b>	<b>7,9±0,1</b>	<b>7,9±0,1</b>	<b>8,2±0,1</b>
Амониев йон [mg/L]	0,29±0,03	0,26±0,03	0,24±0,02	0,22±0,02
<b>Амоняк [mg/L]</b>	<b>0,38±0,04</b>	<b>0,085±0,009</b>	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,05</b>
Нитрити [mg/L]	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Електропроводимост [μS/cm]	768±34	764±34	765±34	762±34
Обща и съставна алкалност [mmol H+/L]	4,2±0,2	4,3±0,2	4,1±0,2	4,0±0,2
<b>Разтворени сулфиди и свободен сероводород [mg/L]</b>	<b>1,7±0,2</b>	<b>0,040±0,004</b>	<b>&lt;0,02</b>	<b>&lt;0,02</b>

Резултатите са представени като стойност и неопределеност ±U; „< ...“ – под границата на количествено определяне на метода. Всички стойности са в рамките в на максималните допустими концентрации по нормативен документ, Наредба 9/16.03.2001.

Съществена промяна в физикохимичния състав на минералната вода при лагериране не бе наблюдавана, следователно не се очакваха промени и в ефектите ѝ при пиене след престой на водата до 7 дни, което е обичаен срок на съхранение на минерална вода, налята от водоизточника за лечебно-питейни нужди. Единствените установени значими промени бяха в pH, което с времето на престой на водата нарастна от 7.6 до 8.2. Отчетено бе понижение на разтворените сулфиди и сероводород, както и на амоняка, който намалява след първия ден.

## **1.2. Дискусия на резултатите от физико-химичния анализ на минерална вода от Североизточен Черноморски басейнов район**

Минералните води са тези води, които чрез разтворените в тях соли, газове и топлина оказват благоприятен физиологичен ефект върху човешкото тяло. Разнообразието им се дължи на сложната геоложка структура, интензивна неотектонична активност и на зависимия от тях състав на циркулиращата метеорна вода (Shterev and Zagorchev, 1996). Основните параметри за класифициране на минералните води са физикохимични (температура, pH, радиоактивност и др.), химични (общ сух остатък, разтворени газове и сероводород), органолептични (цвят, вкус, прозрачност), общо съдържание на разтворените в тях вещества

(обща минерализация на водата) и др. Всички тествани показатели във минералните води от трите водоизточника са съгласно нормативните изискванията на българското и европейско законодателство за минерални води (Директива 2009/54 / ЕО; Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите, обнародвана на 10 август, 2004 г.).

### ***Физико-химични характеристики***

#### *Температура*

В зависимост от температурата на излива минералните води се класифицират като: студени ( $<20^{\circ}\text{C}$ ), хипотермални ( $20^{\circ} - 33^{\circ}\text{C}$ ), хомотермални ( $34^{\circ} - 36^{\circ}\text{C}$ ), термални ( $37^{\circ}-39^{\circ}\text{C}$ ), хипертермални ( $>40^{\circ}\text{C}$ ) (Караколев, 1990; Albertini et al., 2007). Съгласно тази класификация изследваните минерални води на гр. Варна са термални (Естрея -  $37^{\circ}\text{C}$  и Аквариум –  $37.5^{\circ}\text{C}$ ) и хипертермални (Дом Младост -  $45^{\circ}\text{C}$ ).

#### *Активна реакция рН*

рН на минералната вода се обуславя от минералния състав на земната кора, от наличието на въглероден диоксид и от специфичността на скалите, формиращи подземните резервоари и пътя на водата преди извирането ѝ на повърхността. Стойностите на рН на всички проби са в препоръчителни граници (6.5 - 9.5). Най-висока рН стойност има минералната вода от обществена чешма под Аквариума ( $7.6\pm 0.1$ ), следвана от минералната вода на Естрея ( $7.5\pm 0.1$ ). Съгласно получените резултати изследваните минерални води се класифицират като слабо алкални. Повече от 50% от българските минерални води са алкални - рН $>8$  (Владева и Бошев, 2011). Минералната вода с най-високо рН от обществена чешма под Аквариума е избрана за изследване на избрани показатели в динамика.

#### *Електропроводимост и обща твърдост*

**Електропроводимостта** и общата твърдост са индикатори за минерализацията на водите или за концентрацията на минералните соли, които съдържат. Твърдостта на водата се определя от разтворените в нея поливалентни метални йони предимно калциеви и магнезиеви, но също алуминиеви, бариеви, железни, магнезиеви, цинкови и др. Изследваните от нас минерални води са с електропроводимост под максимално допустимата граница ( $2000 \mu\text{S}/\text{cm}$ ), съгласно Наредба 9 за качеството на водите за питейно-битови цели. Най-висока електропроводимост бе отчетена в пробата от източник при Аквариума ( $768\pm 34 \mu\text{S}/\text{cm}$ ). Резултатите на трите водоизточника бяха под  $800 \mu\text{S}/\text{cm}$ . Счита се, че минерални води с електропроводимост от  $800 \mu\text{S}/\text{cm}$  до  $850 \mu\text{S}/\text{cm}$  са с ниско съдържание на минерални соли. Нашите резултати са в потвърждение на данните от литературата (Владева и Костадинов, 2007; Караколев, 1996), според които минералните води от Варненски басейн са слабоминерализирани с обща минерализация - Естрея  $565 \text{ mg}/\text{L}$ ; Дом Младост –  $568 \text{ mg}/\text{L}$ .

**Твърдостта** показва наличието на алкалоземни метали. Твърдостта на водата се формира в резултат на отмиване от подземните пластовете на калций и магнезий. Високата твърдост влошава органолептичните характеристики на водата и има негативно влияние върху храносмилателната и отделителната система. Общата твърдост в питейната вода не трябва да бъде по-висока от 12 mg eqv/L. По този показател водите се класифицират като много меки ( $\leq 1.4$  mg eq/L), меки (1.8-2.8 mg eq/L), средно твърди (3,2-4,2 mg eq/L), твърди (4,6 – 6,4 mg eq/L), много твърди (6.8-9.0 mg eq/L), изключително твърди ( $>11$  mg eq/L) (Albertini, 2007). Средната твърдост на изследваните от нас проби (4.13 mg eqv/L) бе под максимално допустимата стойност (12 mg eqv/L), което класифицира минералните води към групата със средна твърдост. Питейната вода във Варна от водопроводната мрежа е сред най-твърдите у нас. Според специалистите тя не трябва да се консумира постоянно от хора с бъбречни заболявания. В този смисъл натуралната минерална вода със слаба минерализация, каквато е Варненската, би била добра алтернатива в превенцията на тези заболявания.

### **Йонен състав**

#### *Аниони*

Количествата на изследваните аниони: нитрати ( $\text{NO}_3^-$ ), нитрити ( $\text{NO}_2^-$ ), сулфати ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), фосфати ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), хлориди ( $\text{Cl}^-$ ), флуориди ( $\text{F}^-$ ) са под максимално допустимите стойности. Сред тях преобладават сулфатите, хлоридите и флуоридите, които са с най-високи концентрации в пробата от Аквариума (Таблица 2).

Почти всички природни води съдържат **хлоридни йони**. Те са преобладаващ анион във води с минерализация над 5 g/L. Хлорният йон е широко разпространен електролит и главен анион на извънклетъчните течности и кръвта, съществен за солно-киселата стомашна секреция. Приемането на хлориди се препоръчва при загуба на соли от човешкия организъм. Концентрацията му в изследваните минерални води е без значими разлики при Аквариума и Дом Младост.

Източник на **сулфатите** е процесът на химично изветряне и разтваряне на сярна съдържащи минерали, основно гипс, на скалите, а също и окислението на сулфидите и сярата. Сулфатите отсъстват в минерални води с висока минерализация. Количеството им във водата се лимитира от количеството на калция, с който образуват малко разтворима сол - калциев сулфат (гипс). Сулфатите, заедно с хидрогенкарбонатите, са доминиращ анион в българските натурални минерални води от Хисаря, Велинград, Горна Баня, Банкя и др., като в ~ 85% от бутилираните минерални води концентрацията на сулфати е под 100 mg/L (Кънева и сътвори, 2012.). Сулфатите стимулират функциите на жлъчния мехур и улесняват храносмилането. Те дразнят леко лигавицата на стомашно-чревния тракт и имат умерено изразено слабително действие. Действат добре при наличие на магнезиеви йони (Владева и Костадинов, 2007). Във Варненските минерални води установихме наличие и на магнезиеви йони. Пиенето на

сулфатни минерални води, съдържащи магнезиев бикарбонат, е много популярно в европейските спа-центрове. Прилага се за лечение на чернодробни и гастроинтестинални заболявания. Под форма на инхалации се лекуват хронични заболявания на горните и долните дихателни пътища (Altman, 2000). Очакван е положителен ефект върху лигавицата на стомашно-чревния тракт. Сулфатните йони са сред преобладаващите аниони и във Варненската минерална вода. Нашите резултати са идентични с резултатите на Караколев, 1990; Владева и Костадинов, 1996 и съизмерими с концентрацията на сулфатите в бутилирани минерални води – „Банкя“ (107.20 mg/L), „Хисаря“ (28.39 mg/L), „Велинград“ (24.48 mg/L).

Съдържанието на **флуорид** е един от показателите, който трябва да се има предвид при подбор на минералната вода за ежедневна употреба. Според доклад на Европейската агенция по безопасност на храните (The EFSA Journal, 2005), съдържанието на флуор не се контролира физиологично от биологичните системи в човешкия организъм. Същевременно флуоридът присъства в храни, води, дентални продукти за устна хигиена и като добавка в готварска сол. Според Европейската агенция по безопасност на храните консумирането на води, съдържащи флуорни йони в концентрации над 2.0-3.0 mg/L, може да превиши допустимата дневна доза 5.0 mg/L, каквато е за бутилирани минерални води, и да стане причина за проява на токсичността на флуорида. Съществуват данни за канцерогенност вследствие хроничното излагане на повишени концентрации на флуориди (Maurer et al., 1990; Maurer et al., 1993). Съгласно действащите Европейски и национални нормативни документи регламентиращи бутилирането на минерална вода, когато в нея се със съдържа флуорид над 1,5 mg/L на етикета трябва да се постави текст, че минералната вода не е подходяща за всекидневна употреба от кърмачета и деца под 7-годишна възраст. В Националната програма за профилактика на оралните заболявания при деца от 0 до 18 годишна възраст в Република България 2015-2020 г. има данни от анализ на пуснатите на пазара национални минерални води, според които 1/2 от всички бутилирани български минерални води са със съдържание на флуорид над 1,5 mg/L. Нашите резултати показаха, че концентрацията на флуориди в изследваните минералните води на гр. Варна е под 1 mg/L. Подобни резултати са докладвани в предходни проучвания (Караколев, 1990; Владева и Костадинов, 1996), според които водите са подходящи за профилактика на зъбния кариес и могат да се приемат без ограничение от всички възрасти.



## **Катиони**

Сред катионите доминират йоните на натрия ( $\text{Na}^+$ ), калция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) и магнезия ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Трите елемента са сред макроминералите с важна функция в човешкия организъм.

**Натрият** е широко разпространен в минералните води. Той не образува неразтворими соли с хидрогенкарбонатите, карбонатите, сулфатите и хлоридите. В зависимост от това дали е под формата на натриев хлорид или натриев хидрогенкарбонат, може да доведе или не до повишаване на кръвното налягане (Владева и Костадинов, 2007). Когато концентрацията на натрий в минералната вода е под 20 mg/L, тя е подходяща за бедна на натрий диета и това се указва на етикета на бутилираните минерални води. Изследваните минерални води се различават по съдържание на натрий. Най-висока концентрация бе установена в минералната вода до Дом Младост, а най-висока при Аквариума (Таблица 2).

Концентрациите на **магнезиевите** и **калциевите** йони са почти идентични и в трите изследвани проби. **Калцият** е доминиращ катион в слабо минерализираните води. С увеличаване на минерализацията делът му намалява, тъй като калциевият карбонат и калциевият сулфат имат малка разтворимост (Беленький и колектив, 1982). Препоръчителният дневен прием на калций зависи от възрастта, при възрастни е 1000 mg/ден (НАРЕДБА № 1 на МЗ от 22 януари 2018 г. за физиологичните норми за хранене на населението). Нормата за съдържание на калций във води е 150 mg/L. В изследване на йонния състав на бутилираните минерални води в България е установено, че в ~ 65% от тях съдържанието на калций е под 50 mg/L (Кънева и съавтори, 2011). При възрастни нормата е 300 mg/ден за жени и 350 mg/ден за мъже. Калцият и магнезият изграждат костната тъкан. Калцият участва в мускулното съкращение, кръвосъсирването, изпълнява ролята на вторичен посредник в клетъчната сигнализация. В изследваните минерални води не се откриват значими разлики в концентрацията на калциеви йони. В сравнение с повечето български бутилирани минерални води те са многократно по-високи („Горна Баня“ – 1.40 mg/L ; „Банкя“ – 8.29 mg/L ; „Девин“ – 1 mg/L ; „Хисаря“ – 3.01 mg/L).

**Магнезият** рядко е доминиращ йон във водите независимо, че е разпространен в природата. Причината за това е, че магнезият се включва в кристални решетки на вторични силикати и доломити, като се отделя от водата (Беленький и колектив, 1982). Катионите на магнезия активират над 300 ензими, сред които са ензимите, свързани с преноса на фосфатни групи - синтез и разграждане на АТФ и ключови ензими от метаболизма в клетката. Особено важна е ролята на магнезия в състава на АТФ-азата, доставяща енергия за работата на  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -помпа и  $\text{Ca}^{2+}$ - помпа, както и в превръщането на витамини, като например В6, в активни коензими. Магнезиевите и калциевите йони принадлежат към минералните, които могат да се набавят с храната и водата. Дневните необходими дози от магнезий са 300-350 mg при възрастни (НАРЕДБА № 1 на МЗ от 22 януари 2018 г. за физиологичните норми за хранене на населението). Количеството на йоните на тези елементи в повечето български

минерални води е ограничено, защото те са слабо минерализирани. Макар и в пониски концентрации в изследваните проби минерална вода, макро минералите са напълно йонизирани и лесноусвоими и безопасни. Според наредбата за качеството на питейните води (Наредба №9) магнезият не трябва да надвишава 80 mg/L и ако неговото съдържание в минералната вода е над 50 mg/L, това се отбелязва с надпис на видно място в етикета (Кънева и съавтори, 2011). Във водата от Варненски минерален басейн концентрацията на магнезиеви йони в два от водоизточниците е  $27 \pm 1$  mg/L, а при Дом Младост е  $24 \pm 1$  mg/L. Тези резултати са в съответствие с по-рано публикуваните резултати (Владева и Костадинов, 1996; 2007).

Концентрациите на йоните на **общото желязо и фери йоните** ( $\text{Fe}^{3+}$ ) са най-високи в пробата на Естрея и най-ниски в пробата от Дом Младост (Таблица 2). Нашите резултати са идентични с данните от други проучвания на съдържанието на микроелементи в българските минерални води (Владева и Костадинов, 1996), както и с данните, докладвани от българското Министерство на здравеопазването.

**Нитратите, нитритите и амониевите йони** са нежелани компоненти на питейните води, тъй като оказват вредно влияние върху човешкото здраве. Така например, нитратите причинят метхемоглобиноемия и кръвта губи способността си да пренася кислород до клетките. Концентрацията на амониевите йони ( $\text{NH}_4^+$ ) е в границата на максимално допустимите концентрации за питейни води (0,50 mg/L). Най-високи стойности са отчетени в пробата от Аквариума ( $0.29 \pm 0.003$  mg/L). Източник на амониеви йони в природните води е газът амоняк ( $\text{NH}_3$ ). Той се образува от биохимичния разпад на азотсъдържащите органични съединения или в резултат на промишленото производство. В анализираните проби бе открита статистически значима разлика в концентрацията на амоняка, който е с най-висока концентрация във минералната вода до Дом Младост. Концентрацията на амониеви йони във водите обичайно не достига опасни за здравето на човека нива, но те могат да взаимодействат с други съединения и да образуват токсични вещества. Нивата на неорганичните съединения на азота (нитрити и нитрати) в изследваните проби бяха под границата на количествено определяне на метода. Тъй като количеството им е под максималното, може да се предположи, че амониевите йони са с геоложки произход (Владева и Костадинов, 1996).

### *Целеви анализи*

**Сярата** е типичен доминиращ елемент сред изследваните целеви микроелементи в минерални води на Варна. Във водна среда сярата е под формата на разтворими сулфиди (S), хидросулфиди ( $\text{SH}^-$ ) и сероводород ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Най-високи концентрации на разтворими сулфиди и свободен сероводород бяха установени в пробите от Дом Младост (2,8 mg/L) спрямо 1,2 mg/L в Естрея и 1,7 mg/L в пробите от Аквариума.

H<sub>2</sub>S е слаба киселина и при ниско рН е в протонирана форма, докато при алкално рН сероводородът се депротонира, образувайки хидросулфиден анион (HS<sup>-</sup>). Въпреки че е газ, около една трета от H<sub>2</sub>S остава в протонирано състояние във воден разтвор при рН 7.4, дори и при съхранение на водата в бутилки. H<sub>2</sub>S е липофилна молекула и преминава свободно през клетъчните мембрани и, подобно на азотния оксид (NO) и въглеродения оксид (CO), има сигнални функции в човешкото тяло. H<sub>2</sub>S е силно реактивна молекула, реагирайки с активни кислородни и азотни форми, ги обезврежда. Може да се предположи, че приемът на минерални води, съдържащи сероводород и разтворими сулфиди, ще има измерим ефект върху метаболизма, активирайки антиоксидантни процеси и сигнални пътища (Carbajo and Maraver, 2017).

В сравнение с останалите йони концентрациите на йоните на **калия, хрома и селена** (K<sup>+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Se<sup>+</sup>) са много по-ниски, като концентрациите на K<sup>+</sup> са най-високи в пробите от Дом Младост (7.8 ± 0.9 mg/L). Съдържанието на Cr<sup>6+</sup> и Se<sup>+</sup> бе изключително ниско във всички проби и бе под долната граница за количественото определяне на метода. Като цяло, калият се съдържа в много по-малки количества в природните води, тъй като се извлича от растителни и животински организми и лесно и се натрупва в кристалните решетки на глинестите минерали. Калият, заедно с натрия и хлора регулират вътреклетъчното и екстрацелуларното осмотично налягане, водния и електролитен баланс. Докато натриевите йони са извън клетката, калиевите катиони са основните катиони вътре в клетката (150 mmol/L). Концентрацията на калиевите йони в кръвта е строго регулирана (3.5 - 5.5 mmol/L), поради риск от тежка сърдечна асистолия, наблюдавана при хиперкалиемия. Приемът на калий чрез разнообразна диета, съдържаща плодове и зеленчуци, съчетана с рестрикция в приема на сол, намалява кръвното налягане и риска от инфаркт и инсулт при хипертоници (Weaver, 2013). Минералните води с ниско съдържание на Na<sup>+</sup> (<20 mg/L) и повишено на K<sup>+</sup> спомагат за засилване на диурезата и ускорено освобождаване на Na<sup>+</sup>. Приемът на минерална вода от Варненски басейн може да окаже влияние върху кръвното налягане, като го понижи.

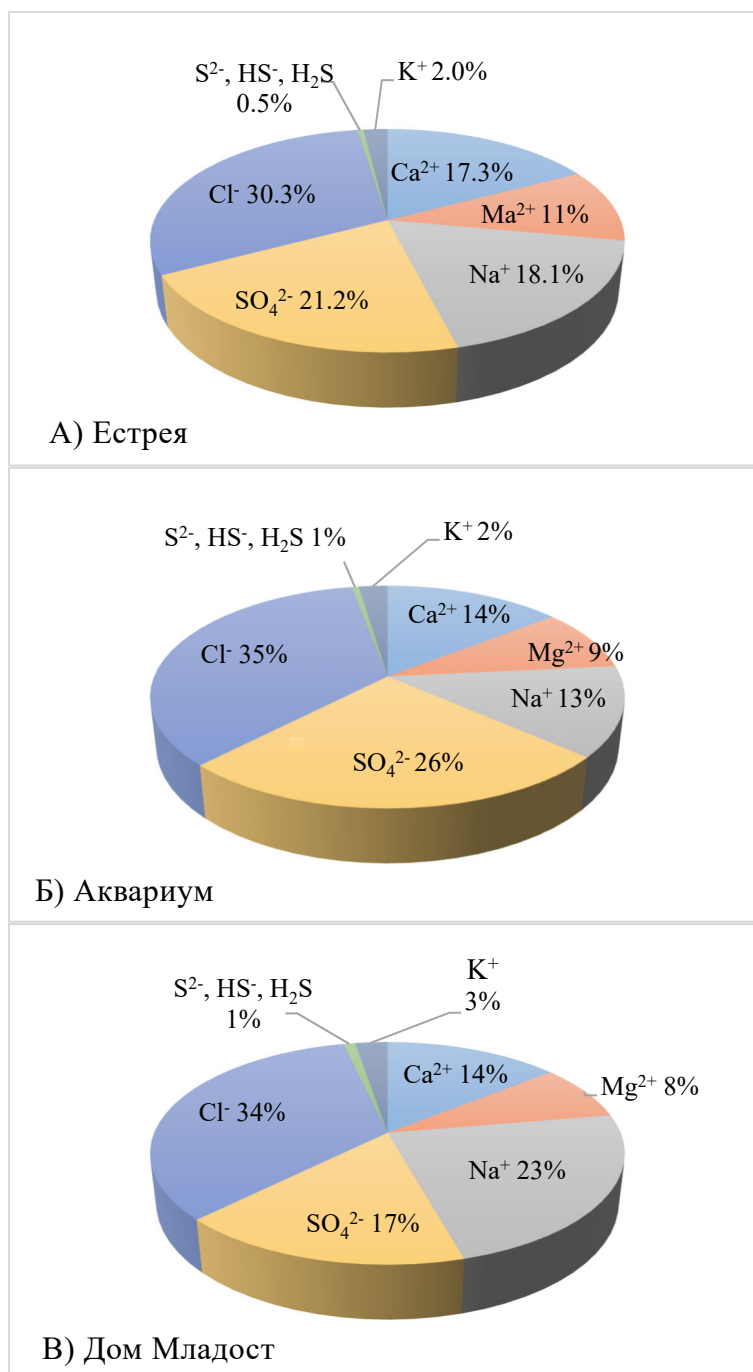
Процентните разпределения на изследваните йони в пробите от трите минерални водоизточника са представени на Фигура 1.

### Мониторинг

Извършеният анализ на десет избрани физико-химични параметъра в проба от обществена чешма под Аквариума в динамика показва слабо повишение в рН (от 7.6 до 8.2), понижение в концентрацията на амонияка (от 0.38 до <0.05 mg/L), както и понижение в нивата на разтворените сулфиди, хидросулфиди и сероводород (от 1.7 до <0.02 mg/L) във водата.

Възможно обяснение за увеличаването на рН на водата след седмия ден е присъствието на хидросулфидни йони (слаба основа), докато свободният сероводород (слаба киселина) е газообразен и се освобождава. Освен това,

хидролизата на калциевите и магнезиевите карбонати във водата също допринася за повишаването на рН.



Фигура 1. Процентно разпределение на преобладаващите йони в пробите от трите водоизточника

### Заклучение

В резултат на настоящото проучване са получени нови данни за химичния състав на Варненската минерална вода по показателите, оценяващи

съдържанието на биологично активни съставки и имащи отношение към здравето на човека. Получена е информацията относно промените, които настъпват в състава на водата и нейните органолептични характеристики при съхранение.

Съгласно изследваните физико-химични показатели Варненската минерална вода се категоризира като слабоминерализирана, средно твърда, без отклонения от допустимите норми. Сравнителният анализ на водата от три водоизточника в гр. Варна показва различия по отношение на съдържанието на разтворени сулфиди и свободен сероводород, амоняк, натрий и общ органичен въглерод в по-високи концентрации във водата от обществена чешма „Дом Младост“, и сулфати, и тривалентно желязо в по-високи концентрации във водоизточник „Аквариум“. Проследено в динамика, бе установено слабо повишаване на рН, понижаване на концентрацията на амоняк, както и на разтворените сулфиди и сероводород в минералната вода от водоизточник „Аквариум“.

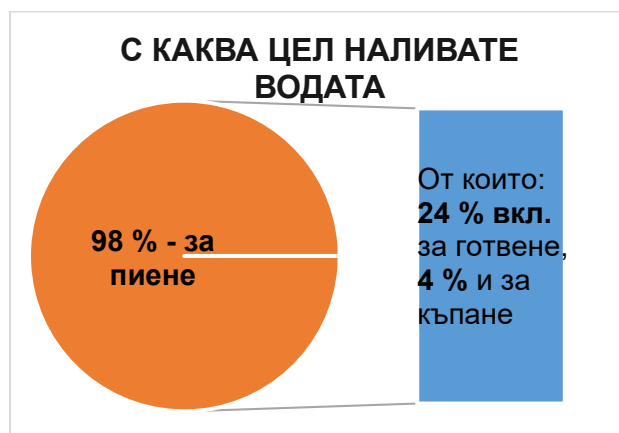
Получените резултати ще допринесат за по-доброто разбиране на ефекта от минералната вода на гр. Варна върху метаболизма на човека и механизмите на неговите лечебни свойства. Поради общия водоносен хоризонт – малмовалажинския, изследваните минерални води са със сходни физикохимични характеристики и биха имали сходни физиологични ефекти. Поради фактора „достъпност“ взето бе решение за интервенцията да се използват минералните води от обществените чешми под Аквариума и до Дом Младост.

## **2. Резултати от анонимно анкетно проучване, проведено сред жители на гр. Варна и резултати от анкетно проучване, проведено сред доброволците в изследването относно режима на наливане – честота, количество и съхранение на минералната вода, и установяващо причините за наливане на минерална вода**

Анкетното проучване сред жителите на гр. Варна бе проведено при обществените чешми, в момент на наливане на минерална вода. Анкетираните (50 души) не бяха подходящи по критериите за включване в изследването, тъй като регулярно приемаха минерална вода от достъпните обществени чешми. Проведената анкета имаше за цел да внесе яснота относно режима на наливане на минерална вода - честота, количество и съхранение, причини за наливане на минералната вода, а така също и да внесе яснота относно дневното количество на изпиваната минерална вода. Анкетата бе анонимна. Подобна анкета попълниха 30 от общо 50 доброволци, участници в изследването. Тяхната анкета съдържаеше освен въпросите, свързани с режима на наливане, но също и въпроси, свързани с ефектите, наблюдавани по време на интервенционалния период, чиито отговори са обобщени отделно в подточка 3.1.

## **Резултати от анкетно проучване за ефектите от приема на минерална вода**

Отговорите на 98% от анкетиранияте жители (49 от 50) показват, че целта им да наливат минерална вода е за да я консумират като ежедневно питейно средство. Дванадесет от тях (24%), използват водата включително за готвене, други двама (4%), включително за къпане. Само един не уточнява причините, поради които налива минерална вода (Фигура 2). Този въпрос не бе включен в анкетата на доброволците в изследването, целта на наливане на минералната вода при тях бе ясна.



*Фигура 2. Цел за наливане на минералната вода.*

Режимът на наливане на минерална вода, според отговорите на 80 анкетирани (50 жители и 30 доброволци), е показан в таблица 5.

Преобладаващото количество на налятата вода наведнъж при 47.5 % от общо 80 анкетирани жители и доброволци е 20 л и над 20 л. От тях 13.75 % отговарят, че наливат 50 л и над 50 л наведнъж.

Анкетата съдържа въпроси, свързани с вида на водата и специфичния мирис на сероводород. На въпроса „При какви условия и кога започвахте да пиете от налятата вода?“, 52.5% - след като водата е престояла едно денонощие в стаята с отворени капачки на бутилките.

Потребителите знаят какъв е видът на минералната вода - 88.75 % от тях посочват, че водата съдържа съединения на сярата, но не знаят за промените, които настъпват във физикохимичния ѝ състав при съхранение.

Имаше въпроси зададени само на жителите на гр. Варна, свързани с дневното количество на изпиваната минерална вода и въпроси, уточняващи причините за прием на минералната вода. Те не бяха включени в анкетата на участниците в проучването. Дневното количество на минералната вода на всеки участник бе индивидуално определено по литературни данни.

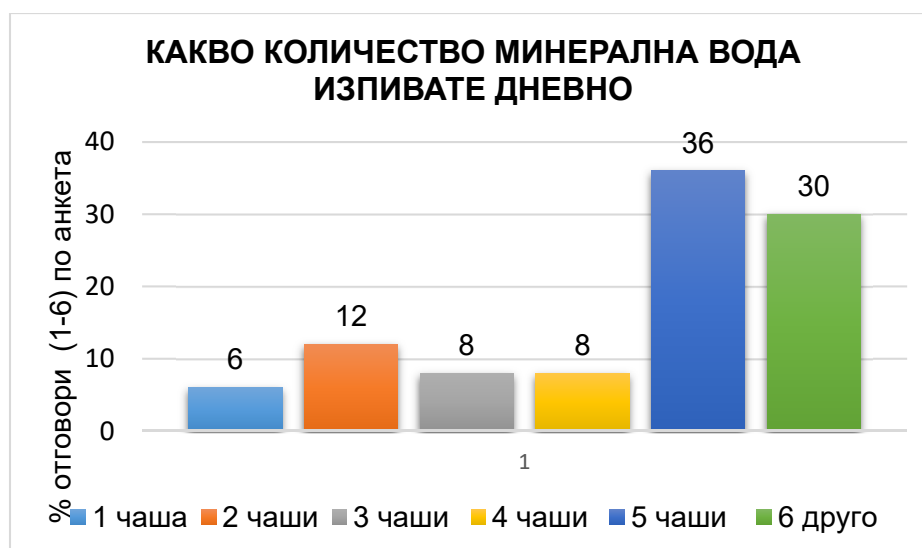
Количеството на изпиваната вода дневно според отговорите на гражданите на гр. Варна, регулярно консумиращи Варненска минерална вода е отразено на

Фигура 3. Петдесет и шест процента от анкетиранияте са отговорили, че изпиват между 1 л (~5 чаши) и 1.5 л/ден.

Таблица 5. Отговори на въпроси, свързани с режима на наливане на минерална вода – честота, количество, съхранение и прием на минералната вода, еднакви, както за жителите на гр. Варна, регулярно консумиращи минерална от обществените чешми и поради тази причина неподходящи за включване в изследването, така и за доброволците, включени в изследването.

Въпроси и отговори по анкета	Отговори жители	Отговори доброволци	Общ брой	%
<i>1. Колко често наливате/наливахте минерална вода?</i>				
• Един път на две седмици	18	9	27	33.75
• Един път седмично	13	15	28	<b>35</b>
• Един път на 3-4 дни	13	3	16	20
• Не мога да преценя	3	2	5	6.25
• Друго (моля, посочете)	3 - всеки ден	1 - през ден	4	5
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>2. Какво е приблизителното количество минерална вода, което наливате/наливахте наведнъж?</i>				
• 1,5 л	2	1	3	3.75
• 3 л	4	0	4	5
• 5 л	8	2	10	12.5
• 10 л	7	13	20	25
• Друго (моля, посочете)	0	0	0	0
○ Над 50 л	5	0	5	6.25
○ 50 л	3	3	6	7.5
○ 40 л	1	2	3	3.75
○ 30 л	1	2	3	3.75
○ 20 л	19	2	21	<b>26.25</b>
○ 12 л	0	3	3	3.75
○ 6 л	0	2	2	2.5
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>3. В какви съдове наливате/наливахте минералната вода?</i>				
• В пластмасови бутилки	45	27	72	<b>90</b>
• В стъклени бутилки	3	3	6	7.5
• В бидони	2	0	2	2.5
• Друго (моля, посочете)	0	0	0	0
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>4. При какви условия съхранявате/съхранявахте налятата минерална вода?</i>				
• В хладилник	9	0	9	11.25
• На студено на терасата	9	7	16	20
• При стайна температура	28	23	51	<b>63.75</b>
• Друго (моля, посочете)	4 - не посочват	0	4	5
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>5. При какви условия и кога започвате/започвахте да пиете от налятата вода?</i>				
• След като е престояла в бутилките с отворени	7	13	20	25

капачки на терасата едно денонощие				
• След като е престояла в бутилките с отворени капачки в стаята за едно денонощие	30	12	42	<b>52.5</b>
• След като е изстинала в бутилките, чиито капачки са затворени	7	2	9	11.25
• Веднага след наливане	5	3	8	10
• Друго (моля, посочете)	1 – не посочва	0	1	1.25
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>6. Знаете ли, че минералната водата се причислява към сярасъдържащите минерални води?</i>				
• Да	45	26	71	<b>88.75</b>
• Не	5	4	9	11.25
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>7. Известни ли са Ви препоръки и/или заболявания, при които се пие такъв вид вода?</i>				
• Да	21	12	33	41.25
• Не	29	18	47	<b>58.75</b>
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>8. Считате ли, че изпитата минерална вода е подобрила общото Ви здравословно състояние?</i>				
• Да	29	6	35	<b>43.75</b>
• Не	1	1	2	2.5
• Не мога да преценя	16	22	38	47.5
• Друго (моля, посочете)	4 – не посочват	1 – не посочва	5	6.25
Общо отговори/%	50	30	80	100



Фигура 3. Дневно количество на изпиваната от жители на гр. Варна налята минерална вода; в легендата са отговорите (1-6) по анкета. 30 % от анкетираните (15 души) посочват отговор 6 - „друго“ - количество, което е указано във Фигура 4.





Фигура 4. Дневно количество на изпиваната вода по отговорите на 30 % (15 анкетирани), посочили отговор б - „друго“.

На въпрос „*Пиете ли водата поради здравословни причини?*“, 15 души (30%) от 50 анкетирани жители отговарят утвърдително (Фигура 5).



Фигура 5. Отговори на въпрос „*Пиете ли водата поради здравословни причини?*“. Отговори по анкета 1. „ДА“ (15 души); 2. „НЕ“ (35 души). Здравословните причини за прием на отговорилите с „ДА“ също са показани на фигурата.

Сред здравословните причини, които потребители посочват, преобладават бъбречните заболявания. На следващия въпрос за граждани „*Назначаван ли Ви е прием на минерална вода от лекар?*“, 3-ма отговарят утвърдително, като двама от тях казват, че в момента изпълнявали такава препоръка, 42 отговарят с „НЕ“, 5 не отговарят.

В таблица 6 са обобщени отговорите на въпроса „*Известни ли са Ви препоръки и/или заболявания, при които се използва сярасъдържаща минерална вода?*“ на анкетираните граждани при чешмите (50 души) и на доброволците,

участващи в проучването (30 души). Отговорите са повече от 80 (101), защото някои от анкетираните са посочвали повече от един отговор.

*Таблица 6. Обобщени отговорите на въпроса „Известни ли са Ви препоръки и/или заболявания, при които се използва сярасъдържаща минерална вода?“. Отговорите са снети от общо 80 анкетиранани – 50 граждани при чешмите на гр. Варна и 30 доброволци, участващи в проучването.*

<b>Приложение на Варненската минералната според анкетираните</b>	<b>Брой</b>	<b>%</b>
Не знае	44	43.56
Бъбречни заболявания	21	20.79
Заболявания на гастроинтестиналния тракт	15	14.85
Заболявания на опорно двигателен апарат	6	5.94
Общо укрепващо средство	4	3.96
Болести на обмяната	4	3.96
Дерматологични заболявания	3	2.97
Заболявания на периферна нервна система	2	1.98
Сърдечно-съдови заболявания, хипотонично средство	2	1.98
Общо отговори	101	100

### ***2.1. Дискусия на резултатите от анкетните проучавания относно режима на наливане - честотата, количество и съхранение на минералната вода, както и на причините за наливане на минерална вода***

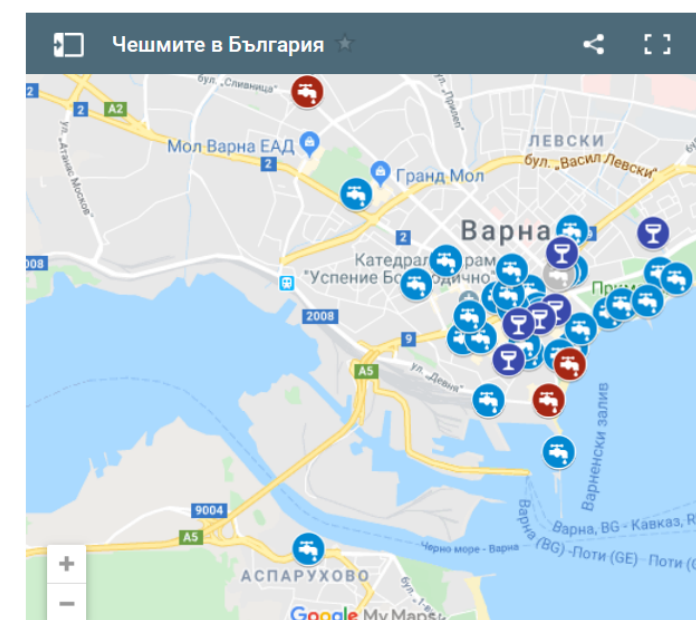
Хидрирането е от съществена важност за здравето на организма. От гледна точка на източниците за хидриране, безспорно първенството се пада на чистата питейна вода, която не натоварва организма с излишни калории. Основната разлика между водата, доставяна от водопреносната система, и минералната вода е, че в минералната се съдържат минерали в концентрации, които могат да окажат въздействие върху процесите в организма. Минерали се съдържат и в чешмяната вода, те варират според местоизточника. Проучване показва, че хората предпочитат минералната вода, заради нейната природна чистота и положителните ползи за здравето (Eske, 2019). Производството на минерална вода, обаче, се свързва с един от основните проблеми на съвременното - мащабното производство на пластмасови бутилки, имащо сериозни последици за околната среда.

Питейната вода в Европа е с високо качество (Ecorys SEE, 2015; Roberts, 2018), а в страни като Холандия и Белгия се счита, че чешмяната вода е с физико-химични характеристики, сходни с минералните води на тези страни (van der Aa, 2003). В Холандия питейната вода се доставя от различни обществени фирми и една от задачите им е да осигуряват обществено достъпни чешми - част от инициатива да се популяризира приема на вода от чешмата с цел ограничаване

на пластмасовите отпадъци. Тази инициатива („Refill your water bottle. Anywhere, anytime“) все повече набира популярност в страни, като Холандия, Германия, Великобритания, Италия.

Подобна инициатива стартира и в България („Нулев Отпадък София“, 2019), чиято цел е да се редуцират отпадъците чрез промяна на навиците. Според Стоянова (2019), в България има достатъчно на брой достъпни обществени чешми, тъй като изграждането на чешми и фонтани е част от традициите на българина (“Best Practices: Zero Waste Sofia”, 2019). Само че, модерното общество, възприело т.нар. „култура на изхвърляне“, изпращало ~ 5 млн пластмасови бутилки за еднократна употреба на депото за отпадъци всеки ден. В световен мащаб тази цифра е огромна. В предаване на BBC през 2018 г. („Blue Planet II“) се съобщава, че всяка минута се купуват 1 млн. напитки, като само през 2016 г. са продадени 480 млрд. От тях по-малко от 50% са събрани за рециклиране, а 7% са превърнати отново в бутилки.

През 2019 г. е проведено национално проучване сред 600 участници („Нулев Отпадък София“, 2019), което разкрива три основни причини да не се използват обществените чешми в България. Според 89.4 % причината е липсата на информация относно качеството на водата; 64% смятат, че обществените чешми не се използват, защото са счупени и замърсени; 54% не знаят къде се намират тези чешми. Организаторите на инициативата заедно с местни общини и организации, започват маркиране на местонахожденията на чешмите в карта, а в рамките на проекта „Да изчистим България заедно, 2019“, част от чешмите са почистени. В карта „Чешмите в България“ са посочени и обществените чешми на гр. Варна, в това число и тези с минерална вода, (Снимка 1).



Снимка 1. Карта „Чешмите в България“, в която са включени и достъпните обществени чешми с минерални води в гр. Варна, обект на настоящото изследване. Източник <http://zerowastesofia.com/>

Настоящата анкета не целеше да се проучи мнението на потребителите относно екологичните проблеми, качеството на питейната чешмяна вода, или икономическия аспект като потенциална причина да се използват обществено достъпните минерални води, вместо да се закупуват бутилирани.

Проведеното анкетно проучване сред 50 граждани при чешмите на гр. Варна показва информираност на гражданите за местоположението на обществените чешми с минерална вода в града. Регулярно наливащите вода най-често посещават чешмите веднъж на две седмици (Таблица 5), като наливат в относително голямо количество минерална вода (над 20 литра). Някои от потребителите използват минералната вода за профилактика на конкретни заболявания, най-често бъбречни заболявания (Таблица 6).

Резултатите в таблица 5 показват, че 35 % от анкетираните са наливали необходимото количество вода наведнъж – един път в седмицата, 33.75 % - веднъж на две седмици, 20% – през 3-4 дни и само 5% (4 души от общо 80 анкетирани) - през ден или всеки ден. По литературни данни Варненската минерална вода запазва стабилен физикохимичен състав при лагериране на водата най-малко 2 месеца (Владева и Костадинов, 1996). Същите автори подчертават, че при бутилиране на минерални води, съдържащи сероводород, в бутилки от поливинилхлорид, неговата концентрация се запазва без значими промени повече от две седмици, а в стъклени бутилки - 4 дни. Те препоръчват съдовете да са плътно затворени, без досег до пряка слънчева светлина (Караколев, 1990). В нашето изследване бе установено, че 90 % от анкетираните са наливали минерална вода в пластмасови бутилки и 7.5 % в стъклени. По данни в литературата ССМВ трябва да се пият директно след наливане, (Albertini et al. 2007), както са проведени интервенциите с хора в някои изследвания (Benedetti et al. 2007, 2009, 2010). Други подчертават, че във воден разтвор при рН 7.4, около една трета от  $H_2S$  остава в недисоциирана форма (Wang, 2002), дори след като водата е била съхранявана. Резултатите от анкетата показват, че 52.5 % от анкетираните започват да консумират от налятата минерална вода след като е престояла едно денонощие с отворени капачки в стаята и само 10 % започват да пият от водата веднага след наливане.

При изследването в динамика бе установено, че количеството на разтворените сулфиди и сероводород намалява чувствително след третия ден. Изследването в динамика е осъществено само за водата от Аквариума, чието съдържание на сероводород е 1.7 mg/L, и не е извършено за водата от „Дом Младост“, която според резултатите е с по-високо съдържание на сероводород (2.8 mg/L), а от нея, според дневника с дневния прием на минерална вода са пили 33-ма доброволци. Имайки предвид различните начини на съхранение на налятата вода, е трудно да се прецени дори с приблизителна точност реалното съдържание на сероводород във водата, с която е проведена интервенцията. Въпреки че целта на настоящето изследване бе да се установят ефектите на минералната вода така, както я консумират варненци, интересно би било в бъдеще да се проучат и съпоставят данните, ако приемът на вода е планиран веднага след наливането или *in vitro* с човешки гастроинтестинални клетки.

Една от целите на анкетите бе да се събере възможно повече информация от потребителите на Варненската минерална вода за нейното лечебно приложение, които са допълващи настоящото изследване. От всички отговори (общо 101), получени от 80 анкетирани бе установено, че 44 души (43.56 %) не са информирани за препоръки или заболявания при които се пие Варненска минерална вода. Обобщените резултати на отговорителите, че знаят за приложението на Варненската минерална вода открояват бъбречните заболявания (20.79 %), заболяванията на гастроинтестиналния тракт (14.85 %) и на опорно двигателната система (5.94 %), виж таблица 6. Тези знания се припокриват с данните от литературния обзор за приложението на слабоминерализираните хипертермални акратотерми, които се прилагат най-вече за лечение на бъбреците (Караколев, 1990; Albertini et al., 2007; Petrasia et al., 2006). Посоченото количество на изпиваната минерална вода при повече от половината (56%) анкетирани граждани (Фигури 12 и 13) и определеното количество минерална вода на доброволците в интервенцията (20 mL/kg) също са в унисон с други проведени проучвания с прием на минерална вода, в които количествата на изпиваната слабоминерализирана минерална вода варират между 1.2 L – 2 L (Караколев, 1990; Petrasia et al., 2006; Zair et al., 2013).

### ***Заклучение***

Проведеното анонимно анкетно проучване сред жителите на гр. Варна, а също и сред доброволците в настоящото изследване, обогати научното изследване с информация относно приложението на Варненската минерална вода при различни заболявания, като открие бъбречните и стомашно-чревните заболявания заболяванията на опорно двигателната система. Събраните данни относно дневното количество на изпиваната от потребителите минерална вода, бе в унисон с определеното дневно количество на водата за доброволците в настоящото научно изследване. Въпреки че варненци са информирани за вида на минералната вода те не са наясно с промените, настъпващи във физикохимичния ѝ състав при съхранение. По време на проучването бе популяризирана научната разработка на Медицински университет сред потребителите на минерална вода и ползите от нея по литературни данни.

## **3. Интервенция с прием на минерална вода**

### ***3.1. Резултати от анкетно проучване за ефектите от приема на минерална вода***

Одобрените за участие доброволци бяха разделени на групи и от месец септември 2017 г. до месец май 2018 г. поэтапно проведеха интервенция с 8-седмичен прием на минерална вода. От стартирали 51 бр. доброволци, успешно приключили интервенцията бяха 50 души (Ж/М=43/7). Интервенционалното проучване включваше две анкети. Първата анкета определяше здравния статус на доброволците, приема на лекарства и добавки и разглеждаше навиците, свързани с начина на живот, които на по-късен етап бяха корелирани с резултатите от анализа на някои биохимични маркери, имащи отношение към

начина на живот (точка 5). Втората анкета бе въведена в хода на изследването и попълниха 30 от общо 50 доброволци след приключване на интервенцията. Тя съдържа въпроси за наблюдаваните от тях субективни ефекти по време на приема и въпроси относно режима на наливане и съхранение на минералната вода (обобщени с отговорите на анкетираните граждани при чешмите).

Въпросите, свързани със субективните ефекти на минералната вода, наблюдавани от доброволците по време на интервенция, бяха подбрани по литературни данни и съобразно възможните реакции на организма, наблюдавани по време на лечение с прием на минерална вода.

Така, на въпрос дали приемът на минерална вода е причинил дискомфорт в гастроинтестиналния тракт 27 от анкетираните отговарят с „НЕ“, 3-ма с „ДА“, като последните уточняват, че дискомфортът е свързан със запек, отделяне на песъчинки и кръв или газове. Според 29 души приемът на минерална вода не е причинил нито недобро настроение и/или раздразнителност, нито смущение в съня, 1 участник подчертава, че приемът на вода му е причинил гадене, а 1 участник е отбелязал, че не може с точност да прецени дали приемът на вода е причина за смущението в съня му. 26 доброволци не свързват приема на минерална вода със зачестило главоболие, 1 участник не счита, че главоболието му се дължи на приема на вода, а трима са отговорили, че не могат да преценят. Последният въпрос от тази група е свързан с влиянието на водата върху кръвното. Той гласи следното: *„Свързвате ли приема на минерална вода с понижаване на кръвното Ви налягане?“* и две трети от участниците в изследването (21 души) отговарят на въпроса отрицателно, 9-ма – посочват, че не могат да преценят, нито един не отговоря положително на поставения въпрос.

Събраната информация от въпрос №7 (таблица 5), относно знанията за препоръки и/или заболявания, при които се пие такъв вид вода са обобщени с отговорите на жителите, дискутирани в т.2.1.

### ***3.2. Дискусия на резултатите от проведеното анкетно проучване за ефектите от приема на минерална вода***

Резултатите от проведено анкетно проучване за субективните ефекти по време и след прием на минерална вода сред 30 доброволци показват, че 8-седмичният прием на минерална вода не е свързан с поява на значим дискомфорт в гастроинтестиналния тракт, зачестило главоболие, раздразнителност, лошо настроение, или смущения в съня. Отчетени са общо 4 субективни ефекта: отделяне на газове, отделяне на песъчинки и кръв с урината, запек и гадене.

Балнеореакцията не е често срещана при питейното лечение с минерална вода, ако се появи, обикновено е слабо изразена. Според литературни данни тя се появява между 5-10-тия ден и може да засили симптомите, присъщи на лекуваното заболяване. Свързана е с поява на болки, колики и общо неразположение - недобро настроение, смутен сън и апетит, астения (Караколев, 1990; Albertini et al., 2007). В настоящото изследване участниците са клинично

здрави, няма данни за бъбречни или други хронични заболявания сред анкетиранияте.

България е сред ендемичните области, в които хората по-често страдат от уролитиаза, която засяга както жени, така и мъже (Atanassova and Panchev, 2013). Има данни, че 60% от оплакванията на пациентите, посетили уролог в България, са свързани с уролитиаза („Как да опазим бъбреците от камъни“, интервю с проф. Петър Панчев). Според водещи специалисти в областта много хора имат камъни/песъчинки в бъбреците без да знаят и да усещат дискомфорт. Дискомфорт се появява, ако конкрементът започне да мигрира в отделителната система, което се съпровожда с болки, следи от кръв в урината, които оставя преминаващият през пикочните пътища конкремент, нараняващ лигавицата („Камъни в бъбреците, пясък в бъбреците (уролитиаза, нефролитиаза)“). Като превенция срещу заболяването на първо място е приемът на достатъчно количество вода („Как да опазим бъбреците от камъни, интервю с проф. Петър Панчев“).

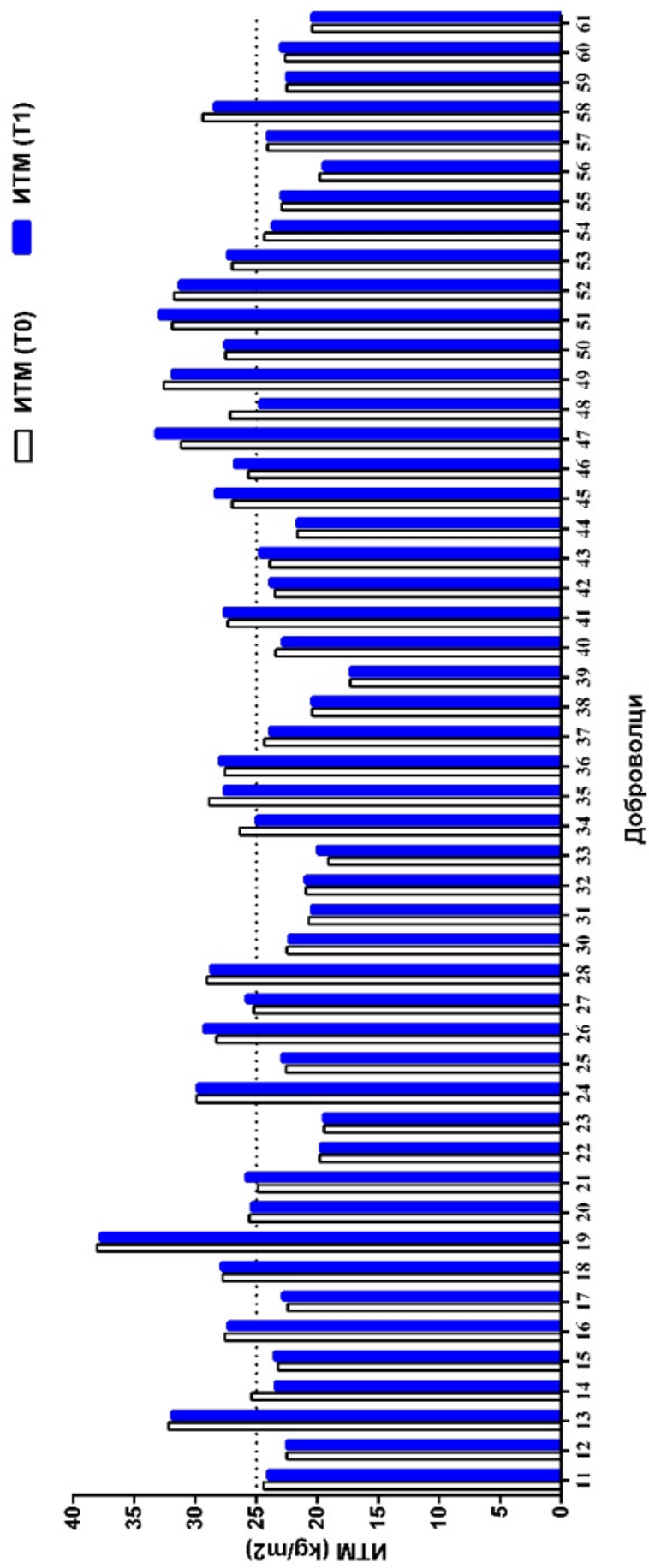
### ***Заключение***

Възможно е приемът на минерална вода да е причина за отделяне на песъчинки и кръв с урината (при 1 участник). Сред анкетиранияте не бе установена информация за поява на болки, типични при бъбречна криза. Останалите отбелязани ефекти (газове, гадене, запек) вероятно се дължат на слабо изразена балнеореакция, която не е попречила на доброволците (3-ма участници) да завършат успешно интервенцията.

### ***3.3. Ефект на минералната вода върху антропометричните показатели***

Данните за тегло и свързания с него показател индекс на телесната маса (ИТМ), както и средните стойности на систолично и диастолично кръвно налягане преди (T0) и след (T1) интервенцията са представени в Таблица 6. Изчисленият ИТМ преди интервенцията е <25 при 26 участници, а при останалите 24 участници е >25, 6 от които 6 са с ИТМ  $\geq 30$ . След интервенцията при 28 участниците ИТМ < 25 (Фигура 6).

След интервенцията статистически значимо повишаване бе установено в антропометричните показатели – средната обиколка на талията  $84.86 \pm 1.59$  см (T0) спрямо  $87.36 \pm 1.69$  см, (T1),  $p < 0.001$  и средното съотношение талия/ханш  $0.80 \pm 0.009$  (T0) спрямо  $0.83 \pm 0.011$ , (T1),  $p < 0.001$  (Таблица 6).



Фигура. 15. Индекс на телесна маса на доброволците преди (T0) и след (T1) интервенцията.



Таблица 6. Антропометрични данни на участниците преди (T0) и след (T1) интервенцията (n=50).

Показател	T(0) Средна ±SEM n=50	T(1) Средна ±SEM n=50	P стойност
Тегло [кг]	70.62±1.96	70.52±1.94	ns
ИТМ [кг/м <sup>2</sup> ]	25.29±0.59	25.26±0.59	ns
Талия [см]	84.86±1.59	87.36±1.69	***
Ханш [см]	105.50±1.32	104.64±1.17	ns
Талия/ханш	0.80±0.009	0.83±0.011	***
Кръвно налягане –систолично [mmHg]	121±2.23	118.8±2.14	ns
Кръвно налягане – диастолично [mmHg]	79±1.55	72.82±1.50	**

Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM). Статистическа значимост \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001 спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията; Легенда: ИТМ, индекс на телесната маса.

### 3.4. Ефект на минералната вода върху нивата на класически биохимични маркери в кръв

Резултатите от измерените класически биохимични маркери преди и след интервенцията с прием на минерална вода са представени в Таблица 7. Установено бе статистически значимо понижаване в плазмените концентрации на креатинина при 66% от доброволците, p<0.05, Фигура 7А. Високочувствителният С-реактивен протеин при 64 % от доброволците също се понижава значимо, p<0.05, Фигура 7Б. Всички показатели са в границата на референтните стойности. Не е открита статистически значима разлика в останалите анализирани биохимични маркери. В около половината от участниците (54%) се наблюдава леко повишаване в нивата на алдостерона след интервенцията (Таблица 7).

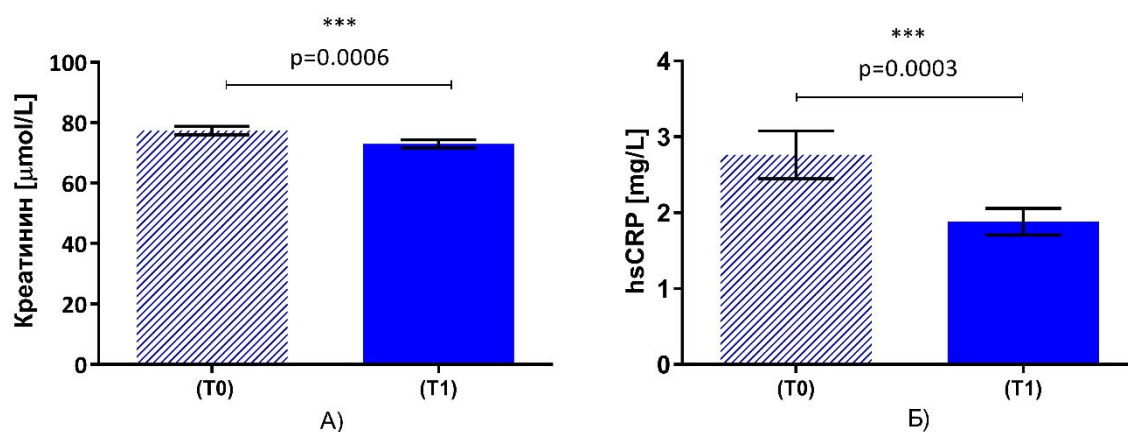
Таблица 7. Нива на класически биохимични маркери в проби от кръвен серум преди (T0) и след (T1) интервенцията с прием на минерална вода.

Показател, единици	T(0) Средна ±SEM n=50	T(1) Средна ±SEM, n=50	P	Референтни граници
ГГТ [U/L]	22.09 ± 2.85	20.80 ± 2.34	ns	М до 60 ; Ж до 39
Креатинин [μmol/L]	77.36 ± 1.41	72.94 ± 1.32	**	до 120
Холестерол общ [mmol/L]	5.57 ± 0.134	5.46 ± 0.127	ns	Нормални: до 5,2; Гранични: 5.2 – 6.2; Високи: > 6.2

LDL-холестерол [mmol/L]	2.63 ± 0.083	2.59 ± 0.070	ns	до 3,36 - нормален риск; > 4.14 - висок риск
HDL-холестерол [mmol/L]	1.64±0.055	1.58±0.060		М>1.0; Ж>1.2
Триглицериди [mmol/L]	1.09±0.074	1.14± 0.085	ns	до 1.7
Калий [mmol/L]	4.15±0.045	4.20±0.053	ns	3.5 – 5.6
Натрий [mmol/L]	140.6± 0.23	140.7± 0.24	ns	136 – 151
Хлориди [mmol/L]	104.3± 0.26	104.6± 0.32	ns	95.0 – 110
Калций [mmol/L]	2.31± 0.009	2.33± 0.013	ns	2.12 – 2.62
Фосфор [mmol/L]	1.12± 0.027	1.15± 0.027	ns	0.87 – 1.50
Алдостерон покой, [nmol/L]	0.34± 0.030	0.39± 0.036	ns	0.049 – 0.643
<b>hs-CRP [mg/L]</b>	<b>2.76± 0.314</b>	<b>1.88± 0.176</b>	<b>**</b>	до 6,0

Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM). Статистическа значимост \*\* $p < 0.01$  спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията.

Легенда: ГГТ – гама-глутамил трансфераза; hs-CRP – високочувствителен С-реактивен протеин; М – мъже; Ж – жени. ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.

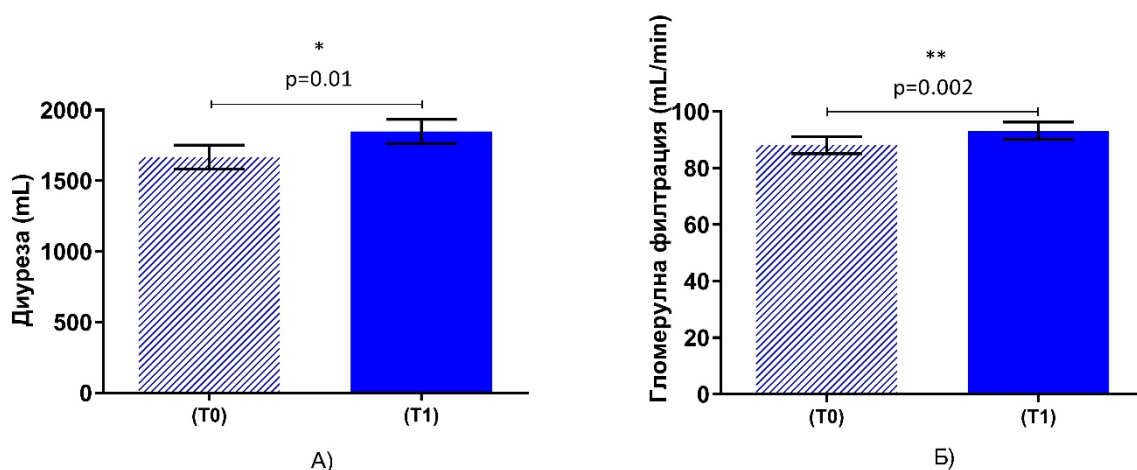


Фигура 7. А) Нива на креатинина преди (T0) и след (T1) интервенцията; Б) Нива на високочувствителния С-реактивен протеин преди (T0) и след (T1) интервенцията. Данните са представени като средни стойности ± SEM. Статистическа значимост \*\*\* $p < 0.001$  спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията.

### 3.5. Ефект на минералната вода върху нивата на класически биохимични показатели в урина

След приема на минерална вода бе установено статистическо значимо повишаване в средните нива на диурезата,  $p = 0.01$ , Фигура 8А. Понижаването на креатинина и едновременното повишаване на диурезата бяха индикация да се провери гломерулната филтрация на бъбреците, което бе извършено по

формулата на Cockcroft-Gault (Cockcroft and Gault, 1976). Статистически значимо повишаване в индексът на гломерулната филтрация на бъбреците (ИГФ) бе отчетено след интервенцията (T1) при 31 участници, или при 62% от тях,  $p=0.002$ , Фигура 8Б. За останалите маркери: рН, белтък, глюкоза, кетониви тела, билирубин, уробилиноген и относително тегло в 24-часова урина, не бяха установени статистически различия след 8-седмичния прием на минерална вода. На Таблица 8 са показани данните, чиито стойности са числен израз и са без значими промени.



Фигура. 8. А) Нива на диурезата преди (T0) и след (T1) интервенцията; Б) Нива на гломерулната филтрация на бъбреците преди (T0) и след (T1) интервенцията. Данните са представени като средни стойности  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията.

Таблица 8. Нива на биохимични маркери в урина преди (T0) и след (T1) интервенцията.

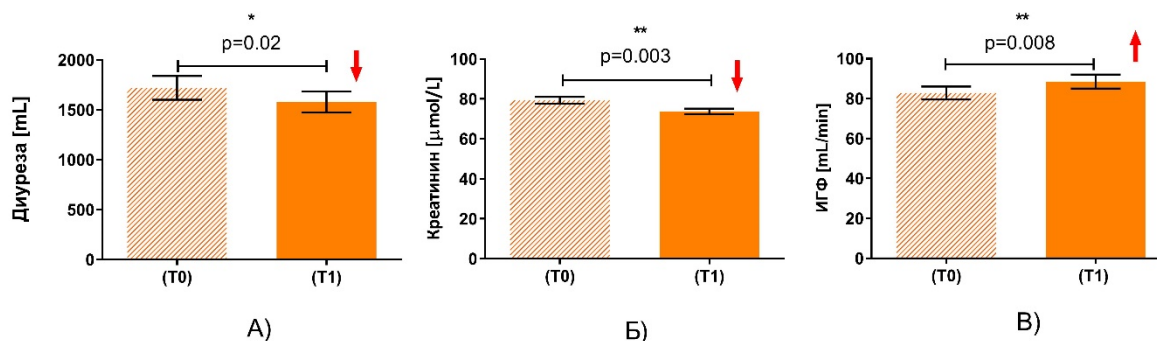
Показатели, единици	T(0) Средна $\pm$ SEM, n=50	T(1) Средна $\pm$ SEM, n=50	P	Референтни границы
Киселинност [pH]	5.980 $\pm$ 0.076	6.000 $\pm$ 0.084	ns	4.5 – 8.2
Относително тегло [g/L]	1.018 $\pm$ 0.001	1.016 $\pm$ 0.001	ns	1.001 – 1.028

Данните са представени като средна стойност  $\pm$  SEM. Статистическа значимост \* $p<0.05$  спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията. Легенда: ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.

### 3.6. Ефект на минералната вода върху функцията на бъбреците

За да установим дали подобрението в ефективността на бъбречната функция (понижено ниво на креатинин в плазма, съпроводено с повишена гломерулна филтрация), се дължи на увеличения обем диуреза след интервенцията, бяха анализирани данните на 28 участници (56%), чиито диурези

бяха завишени с не-повече от 200 mL, бяха без промяна, или с намалени обеми след приключване на интервенцията. В подгрупата от селектирани участници със статистически значимо понижаване в обема на диурезата в T1, бе установено значимо понижаване в средните нива на креатинина в плазма, съпроводено със завишаване на филтрационната способност на бъбреците в същата подгрупа (Фигура 9).



Фигура 9. А) Средни нива на диурезата преди (T0) и след (T1) интервенцията; Б) средни нива на креатинина преди (T0) и след (T1) интервенцията; В) средни нива на индекса на гломерулна филтрация на бъбреците преди (T0) и след (T1) интервенция при 28 селектирани участници.

### 3.7. Сравнение на резултатите по групи в зависимост от предпочитания източник на минерална вода

В зависимост от предпочитания източник, доброволците бяха разделени на две групи: група „Дом Младост“ (n=33) и група „Аквариум“ (n=13). Четирима доброволци не са класифицирани по групи, тъй като в индивидуалните си дневници за прием на вода са посочили, че са консумирали вода от двата водоизточника. Минералните води от двата водоизточника са със сходен физико-химичен състав, като съдържанието на сероводород и разтворени сулфиди, амоняк и натрий на излива е по-високо във водата при Дом Младост (Таблица 3). Статистически значимите разлики, установени в общата група доброволци след интервенцията, се откриват само в група „Дом Младост“: установени бяха статистически значими понижения в средните нива на hs-CRP, (p<0.0001), Фигура 10А и креатинина (p=0.0005), Фигура 10Б, докато в група „Аквариум“ не се установяват разлики. На границата на значимостта, с леко завишаване, са нивата на алдостерона в група „Дом Младост“ (Таблица 7). Нивата на калций в плазма се повишават статистически значимо в T1 при група „Дом Младост“ (p=0.04), Фигура 10В. Значими увеличения в средния обем на диурезата (p=0.04) и в ИГФ (p=0.04) се откриват отново само в група „Дом Младост“ след интервенцията, Фигура 10Г, Д. В група „Аквариум“ не се установяват статистически значими разлики, вероятно поради по-малкия брой на извадката, но тенденцията е същата, каквато е при „Дом Младост“. Долната граница на кръвното налягане намалява статистически значимо при участниците и в двете групи след интервенцията. В група „Аквариум“ прави впечатление, че разликата е по-значима (p=0.0002), Фигура 10Е. За всички останали маркери в двете групи

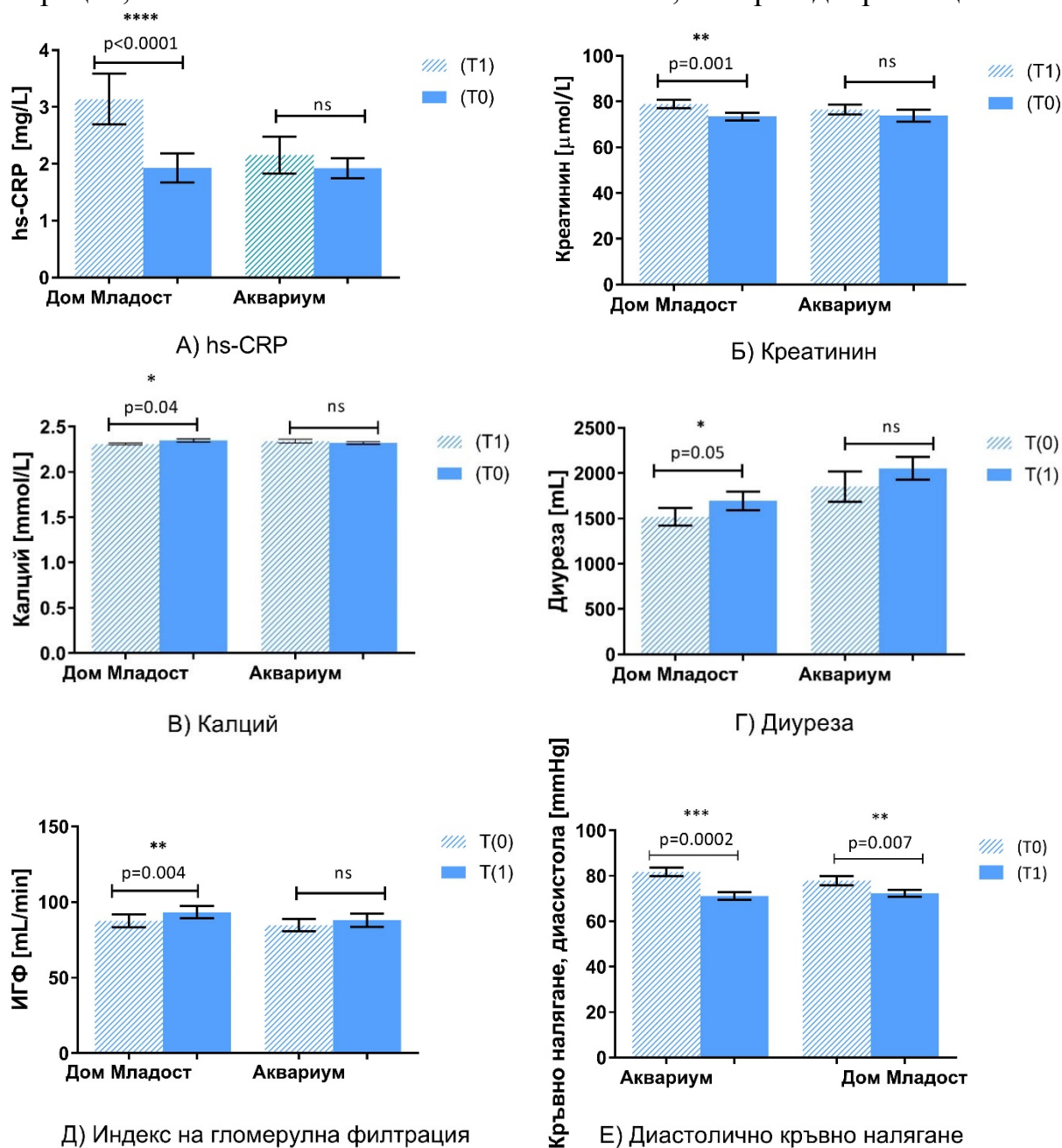
преди и след интервенцията не се наблюдават значими разлики. Данните са представени в Таблица 9.

Таблица 9. Промени в нивата на класически биохимични маркери в група „Дом Младост“ и група „Аквариум“ преди (T0) и след (T1) интервенцията.

Параметър	Дом Младост Средна ±SEM T0 (n=33)	Дом Младост Средна ±SEM T1 (n=33)	P стойност	Δ (T1-T0)
<b>Маркери в плазма</b>				
ГГТ [U/L]	24.02±4.09	22.3±3.186	ns	-1.72
Алдостерон [nmol/L]	0.30±0.02	0.36±0.03	0.06	0.06
Холестерол общ [mmol/L]	5.53±1.53	5.45±0.16	ns	0.08
LDL-холестерол [mmol/L]	2.64±0.08	2.59±0.087	ns	-0.05
HDL-холестерол [mmol/L]	1.60±0.06	1.54±0.06	ns	-0.6
Триглицериди [mmol/L]	1.14±0.09	1.19±0.11	ns	0.05
Калий [mmol/L]	4.09±0.05	4.17±0.07	ns	0.08
Натрий [mmol/L]	140.5±0.28	140.8±0.33	ns	0.3
Хлориди [mmol/L]	104.5±0.32	105.1±0.38	ns	0.6
Фосфор [mmol/L]	1.068±0.02	1.128±0.03	ns	0.06
<b>Маркери в урина</b>				
Киселинност [pH]	5.98±0.08	6±0.08	ns	0.02
Относително тегло [g/L]	1.019±0.001	1.018±0.001	ns	-0.001
<b>Параметър</b>	<b>Аквариум Средна ±SEM T0 (n=13)</b>	<b>Аквариум Средна ±SEM T1 (n=13)</b>		<b>Δ (T1-T0)</b>
ГГТ [U/L]	19.25±3.33	18.92±3.878	ns	-0.33
Креатинин [μmol/L]	76.45±2.19	73.85±2.64	ns	-2.6
Алдостерон [nmol/L]	0.42±0.08	0.42±0.07	ns	0
hs-CRP [mg/L]	2.15±0.32	1.92±0.17	ns	-0.23
Холестерол общ [mmol/L]	5.73±0.26	5.57±0.24	ns	-0.16
LDL-холестерол [mmol/L]	2.65±0.14	2.67±0.08	ns	0.02
HDL-холестерол [mmol/L]	1.70±0.11	1.64±0.13	ns	-0.06
Триглицериди [mmol/L]	1.06±0.13	1.12±0.12	ns	0.06
Калий [mmol/L]	4.26±0.08	4.3±0.07	ns	0.04
Натрий [mmol/L]	140.8±0.37	140.8±0.32	ns	0
Хлориди [mmol/L]	103.3±0.53	103.1±0.54	ns	-0.02
Калций [mmol/L]	2.34±0.02	2.32±0.01	ns	-0.02
Фосфор [mmol/L]	1.20±0.05	1.21±0.05	ns	0.01
<b>Маркери в урина</b>				
Киселинност [pH]	5.96±0.17	6.03±0.22	ns	0.07
Относително тегло [g/L]	1.014±0.002	1.011±0.0008	ns	-0.003
Диуреза [mL]	1852±165.5	2054±124.4	ns	202
ИГФ [mL/min]	84.75±4.01	88.02±4.40	ns	3.27

Данните в таблица 9 са представени като средна стойност ± SEM. Използван е чифтен t-test за оценка на статистическата значимост между групите (T1 спрямо T0). Δ (T1 - T0), делта - показва разликата между двете времеви точки на изследване. Легенда: ГГТ – гама-глутамил трансфераза; sh-CRP –

високочувствителен С-реактивен протеин; ИГФ - индекс на гломерулна филтрация; ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.



Фигура 10. Разлики в средните нива на класически биохимични маркери при доброволците в зависимост от предпочетения източник на минерална вода („Дом Младост“ или „Аквариум“). Стойностите са представени като средна стойност $\pm$ SEM. Статистическа значимост е отчитана при  $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$  спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията; ns – липса на статистическа значимост.

### 3.9. Дискусия на резултатите от анализа на класическите биохимични маркери в кръв и урина

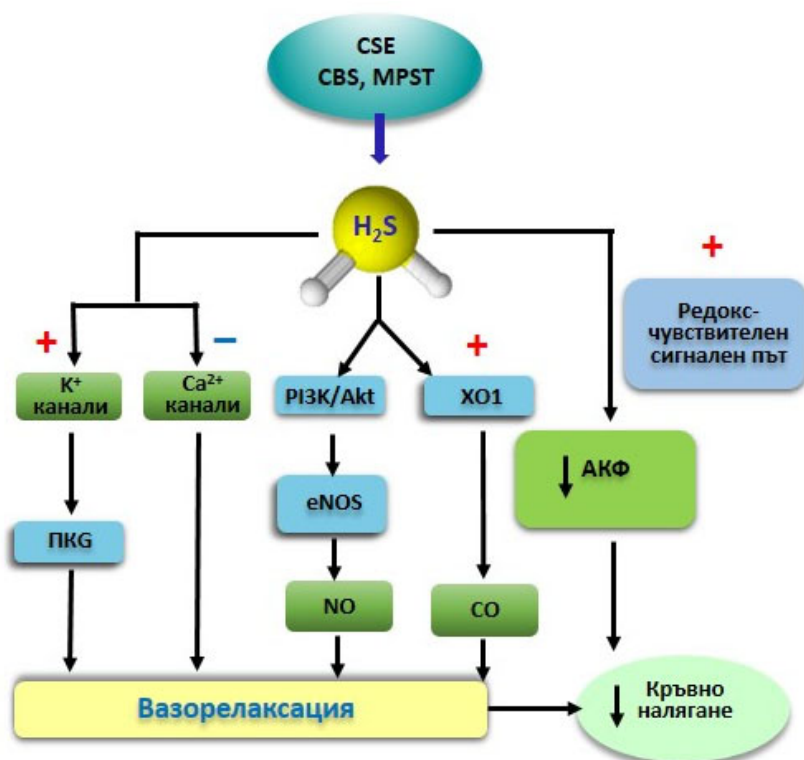
Завишеният прием на вода се свързва с по-голям обем диуреза и повишено ескретиране на креатинин с урината (Calomino, et al., 2010). По-големият обем диуреза може да наруши деликатния баланс на електролити и минерали в



организма, да причини хипонатриемия, промени в кръвното налягане и нивата на телесните флуиди, да доведе до хиперкалиемия или дори до дехидратация. В настоящото изследване след двумесечен прием на Варненска минерална вода установяваме статистически значимо повишаване в средния обем на диурезата (Фигура 8А). При анализа на съдържанието на натрий, калий, хлор, фосфор и калций в плазма не се отчитат промени в нивата им след интервенцията. Същевременно при 54% от участниците бе открито повишение в нивото на алдостерон, което не е статистически значимо. По отношение на кръвното налягане наблюдаваме значимо понижаване в диастолата (Таблица 6). Наблюдаваното увеличение на обема на диурезата вероятно е свързано с повишена екскреция на натрий с урината. Организмът се адаптира като повишава нивата на алдостерон в кръвта. Ролята на алдостерона е да регулира нивата на натрий и калий в кръвта и така да регулира кръвното налягане, баланса на течности, електролити и рН на кръвта. Свързвайки се със специфични клетъчни рецептори в дисталните тубули на бъбречните нефрони, той стимулира отварянето на йонни канали и повишаване реабсорбцията на натрий в кръвта и екскрецията на калий с урината. В отговор на понижените концентрации на натрий, завишените концентрации на калий и пониженото кръвно налягане се активира ензимът ренин. Ренинът стимулира секрецията на алдостерон, който пък активира обратната резорбция на натрий и това взаимодействие може да е причина за липса на разлики в концентрациите на йоните в кръвта. Повишени плазмени нива на алдостерон са идентифицирани при хора със затлъстяване (Tsuboi et al., 2017). Авторите обясняват завишаването на алдостерона със секрецията на адипоцитни фактори от мастната тъкан, които активират системата ренин-ангиотензин-алдостерон, повишавайки плазмените нива на алдостерона. В края на интервенцията на настоящото проучване не са отчетени статистически значими разлики в телесното тегло. Наблюдаваното значимо повишение в обиколката на талията, респективно и в съотношението талия/ханш считаме, че се дължи на регулярната консумация на вода, която е довела до по-голямата обиколка на талията. Във тази връзка тенденцията за повишаване на алдостерона най-вероятно е в следствие на описания компенсаторен механизъм на организма да регулира нивата на електролитите в кръвта.

От друга страна, Варненската минерална вода съдържа също калций, който също може да е причина за увеличаване на диурезата. Съдържа още сероводород и разтворени сулфиди. Макар да не сме наясно колко точно сяра са приели с минералната вода доброволците в хода на интервенцията, допускаме че някои от резултатите се дължат именно на сярасъдържащите компоненти и в частност на сероводорода, който влияе върху редица физиологични и патологични процеси, сред които най-изследвани са релаксацията на кръвоносните съдове, кардиопротекцията и атеросклерозата (Liu et al., 2011; Yang et al., 2013; Bos et al., 2014; King et al., 2014; Mani et al., 2014). Съобщават се ефекти свързани с понижаване на кръвното налягане по механизми, свързани с регулацията на различни йонни канали. Установено е, че високото кръвно налягане при хора, животни (в това число мишки с дефицит на цистатионин- $\gamma$ -лиаза), е съпроводено

със занижени нивата на ендогенно синтезирания  $H_2S$ . Авторите предполагат, че високото кръвно налягане се понижава по механизъм, свързан с регулиране на съдовия тонус посредством активиране на АТФ-зависимите калиеви канали ( $K_{ATP}$ ), предизвиквайки хиперполяризация, и/или инхибиране на  $Ca^{2+}$  инфлукс чрез съответните  $Ca^{2+}$  канали. Сероводородът и азотният оксид в кръстосано взаимодействие регулират вазорелаксацията чрез сигнален път PI3K/Akt-eNOS-NO (фосфатидил инозитол-3 киназа/Akt-катализирано фосфорилиране на ендотелна NO-синтаза), съпроводено с активиране на хем-оксигеназа, генерираща CO и инхибират генерирането на АКФ посредством редокс-чувствителен сигнален път (Фигура 11). Възможно е приемът на минерална вода да е увеличил нивата на сярсъдържащи съединения, които повлияват метаболизма така, че е постигнат хипотензивен ефект.



Фигура 11. Вероятни механизми по които сероводородът може би понижава кръвното налягане (Модифицирана от Meng et al., 2015).

Легенда: CSE, цистатионин- $\gamma$ -лиаза; цистатионин- $\beta$ -синтаза (CBS), MPST, 3-меркаптопируват сулфотрансфераза; PKG - протеин киназа G; XO1 – хем оксигеназа 1; eNOS ендотелна азотен оксид синтаза; PI3K/Akt- вътреклетъчен сигнален път, който в отговор на определени извънклетъчни сигнали, насърчава метаболизма, пролиферацията, клетъчното оцеляване, растежа и ангиогенезата.

Отчетено бе статистически значимо понижение в нивата на креатинина (Фигура 7А) и статистически значимо завишение на ИГФ след интервенцията (Фигура 8Б). Анализът на индивидуалните резултати показва, че ИГФ е завишен при 62% от участниците. Креатининът и ИГФ са показатели, отчитащи състоянието на бъбреците. Получените резултати показват, че приемът на минерална вода от Варненски басейн подобрява бъбречната функция.



Подобряването на бъбречната функция може да бъде обяснено с повишеното количество на изпитата вода по време на интервенцията, което води до по-обилна диуреза.

За да се изключи факторът диуреза, бяха оценени нивата на креатинин и ИГФ в подгрупа от 28 участници, чиито средни нива на диуреза са занижени след интервенцията. Промените в средните нива на плазмения креатинин (намален) и ИГФ (повишен) потвърдиха очакванията за подобрена бъбречна функция, независимо от фактора диуреза (виж Фигури 9 Б и В). Можем да предположим, че подобряването на бъбречната дейност след интервенцията е по-скоро повлияно от наличието на специфични съединения във Варненската минерална вода.

В модел на бъбречна недостатъчност е установено, че третиране със  $H_2S$  значително понижава нивата на креатинин и урея в серум (Feliers, et al., 2016; Wu et al., 2017). В друго проучване (Xia, et al., 2009) се докладва, че интравеналната артериална инфузия със  $H_2S$  увеличава скоростта на гломерулната филтрация при плъхове, съпроводено с увеличаване на фракционната филтрация. Като се има предвид, че минералната вода на гр. Варна е със сравнително високо съдържание на  $H_2S$  и други съединения на сярата и че нашите резултати са в съответствие на резултатите, получени в други изследвания, може да се предположи, че именно сяра-съдържащите съединения в минералната вода имат благоприятна роля за подобряване на бъбречната функция.

При разделянето на участниците в подгрупи в зависимост от предпочитания източник на минерална вода се установи по-значимо понижение в нивата на креатинина, както и по-значимо повишение в нивата на ИГФ в подгрупа Дом Младост (ДМ) спрямо подгрупата на Аквариум (А). Във водата на ДМ бяха установени по-високи концентрации на сярасъдържащи съединения (ССС) и калий и това би могло да е вероятна причина за отчетените резултати.

Функционирането на бъбреците зависи от възпалителните процеси в организма и високите нива на hs-CRP се свързват с високи нива на креатинин и с нарушена бъбречна функция (Nirwan et al., 2017; Stuvelling et al., 2003). Нашите резултати показват, че плазмената концентрация на hs-CRP значително намалява след интервенцията с прием на минерална вода (виж Фигура 7Б). Известно е, че CRP има важна роля във възпалителния отговор чрез няколко механизма, включващи стимулиране на транскрипционен фактор NF- $\kappa$ B (Chang, et al., 2005; Sproston and Ashworth, 2018). По литературни данни във Варненската минерална вода се съдържа метасилициева киселина, а има данни, че минералните води, съдържащи метасилициева киселина оказват противовъзпалително действие (Владева и Бошев, 2011; Стоянова, 2012). От друга страна, счита се, че органичните съединения на сярата, постъпили в организма чрез храненето, са причина за много биологични ефекти, включително противовъзпалителни (Guo, et al., 2013a). В *in vitro* изследване с клетъчни култури, Lee и съавтори (Lee, et al., 2012) установяват, че сярасъдържащите съединения от чесъна инхибират производството на азотен оксид, простагландин  $E_2$  и експресията на про-

възпалителни цитокини, намалявайки възпалителния процес. Нутриенти, съдържащи серни съединения, могат да са донори на субстрати за синтез на ендогенен  $H_2S$ , за който се съобщава, че има противовъзпалителен ефект в организма чрез инхибиране на NF- $\kappa$ B (Benavides et al., 2007; Jin et al., 2015). Вероятно има значение концентрацията на ССС в минералната вода, тъй като анализът на резултатите по отношение на hs-CRP в подгрупите показва изразено понижение на про-възпалителния маркер в групата на ДМ спрямо тази на А. Може да се предположи, че сярата, приета с минералната вода, консумирана като ежедневна питейна вода, ще бъде утилизирана по подобен начин. Това е първото проучване, при което се установява, че прием на сярасъдържаща минерална вода води до значимо намаляване на hs-CRP.

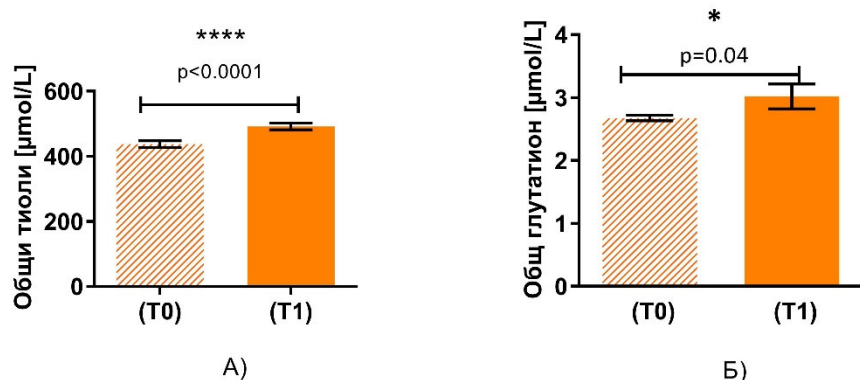
### ***Заключение***

На база на получените резултати достигаме до извод, че Варненската минерална вода подобрява ефективността на бъбречната функция. Лечебните ефекти на водата се проявяват най-вече в противовъзпалителния потенциал, а именно да понижава нивата на високочувствителния С-реактивен протеин в кръвта. Настоящите резултати са първите научни доказателства в подкрепа на традиционните знания относно благоприятните ефекти на минералната вода от Варненски басейн върху човешкия метаболизъм. Тези данни биха били интересни за всички специалисти в сферата на медицината и общественото здравеопазване.

## **4. Ефект на минералната вода върху специфични биохимични и молекулярно генетични маркери от оксидативен статус и възпаление в кръвен серум**

### ***4.1. Ефект на минералната вода върху маркери на оксидативен статус в кръвен серум***

Като маркери на оксидативен статус в кръвен серум бяха анализирани нивата на общи тиоли, общ глутатион, редуциран и окислен глутатион, съотношението GSH/GSSG, малонов диалдехид и реактивни кислородни метаболити. След интервенцията бе установено статистически значимо увеличение на общите тиоли,  $p < 0.0001$  (Фигура 12А). Общият глутатион също бе значително повишен след интервенция,  $p < 0.05$ , (Фигура 12Б). Не са установени значими разлики в нивата на останалите анализирани маркери в двете времеви точки на изследване (Таблица 10).



Фигура 12. А) Нива на общите тиоли преди (T0) и след (T1) интервенцията (n=50); Б) Нива на общия глутатион преди (T0) и след (T1) интервенцията (n=45). Стойностите са представени като средна стойност±SEM. За сравнение на маркерите в двете времеви точки на изследване е използван чифтен t-test на Стюдънт. Статистическа значимост е отчитана при  $p < 0.05$ .

Таблица 10. Нива на биохимични параметри на оксидативен статус в плазма в двете времеви точки на изследване: преди (T0) и след (T1) интервенцията.

Параметри	Средна ±SEM T0	Средна ±SEM T1	P стойност
МДА [μmol/L] (n=50)	3.34±0.25	3.36±0.25	ns
PKM [mg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /L] (n=50)	305.5±6.28	306.2±6.00	ns
GSH [μmol/L] (n=24)	1.64±0.10	2.09±0.35	ns
GSSG [μmol/L](n=24)	1.10±0.12	1.17±0.06	ns
GSH/GSSG (n=23)	1.71±0.20	1.97±0.31	ns

Данните са представени като средна стойност ± SEM. За сравнение на маркерите в двете времеви точки на изследване е използван чифтен t-test на Стюдънт. Статистическа значимост е отчитана при  $p < 0.05$ . ; ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.

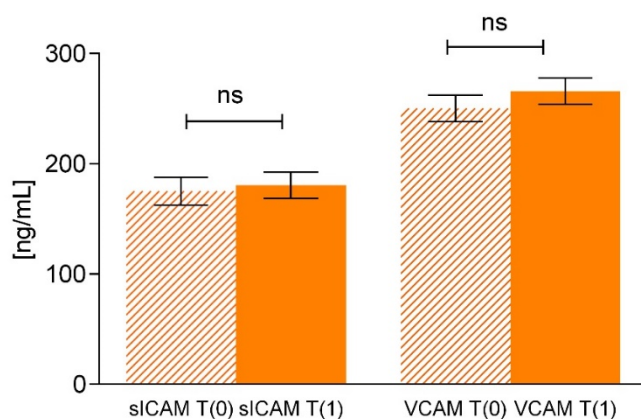
Легенда: МДА, малонов диалдехид; PKM, реактивни кислородни метаболити; GSH (редуциран глутатион); GSSG (окислен глутатион); GSH/GSSG (редуциран глутатион/окислен глутатион); ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци;

След интервенцията бе наблюдавана тенденция към леко увеличение (с 15.2%) в съотношението на редуцирания към окисления глутатион, както и тенденция към увеличаване на редуцирания глутатион (с 27.43%). При 83% от участниците приемът на минерална вода води до покачване на редуцирания глутатион, докато при останалите 17% той намалява.

#### 4.2. Ефект на минералната вода върху маркери на възпалението

Като маркери на възпалението, наред с hs-CRP (виж Фигура 7Б), бяха анализирани и нивата на разтворима междуклетъчна адхезионна молекула sICAM-1 и съдова клетъчна адхезионна молекула VCAM-1 в плазма.

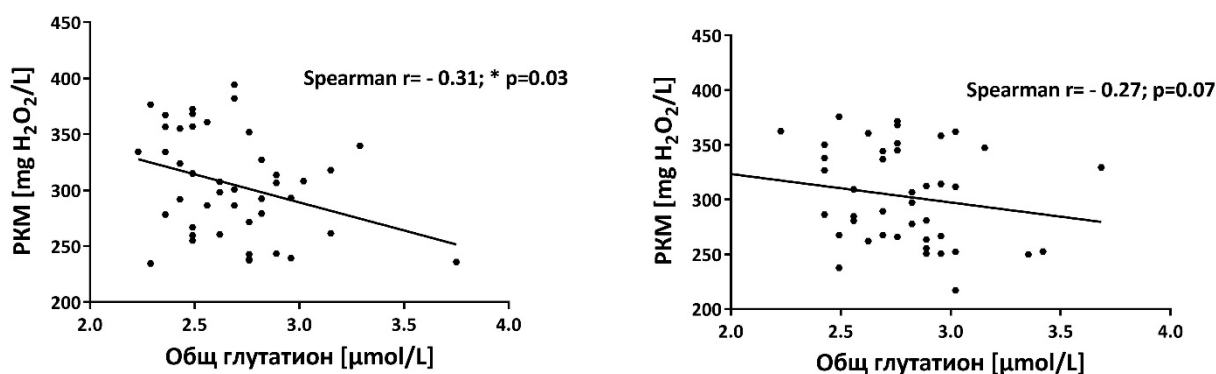
Концентрациите на sICAM-1 и VCAM-1 не се променят статистически значимо след интервенцията (Фигура 13).



Фигура 13. Нива на разтворима междуклетъчна адхезионна молекула sICAM-1 и съдова клетъчна адхезионна молекула VCAM-1 в плазма преди (T0) и след (T1) интервенцията, (n=44). Всички стойности са представени като средна стойност $\pm$ SEM. За сравнение на маркерите в двете времеви точки на изследване е използван чифтен t-test на Стюдънт. Статистическа значимост е отчитана при  $p < 0.05$ .

#### 4.3. Корелация между маркери на антиоксидантен статус и маркери за оксидативен стрес в плазма

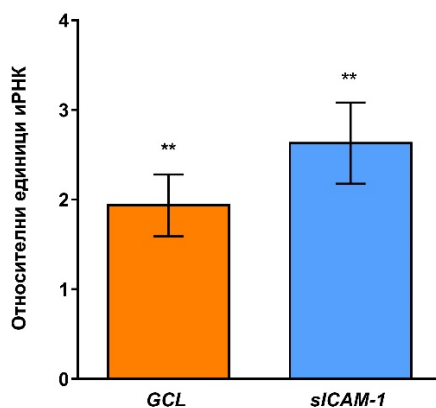
Статистически значима отрицателна корелация бе открита между нивата на РКМ и общия глутатион в T0 (Spearman  $r = -0.31$ ;  $p < 0.05$ ), представена на Фигура 14А. Тази взаимовръзка в T1 бе по-слаба, на границата на статистическата значимост (Spearman  $r = -0.27$ ;  $p = 0.07$ ), представена е на Фигура 14Б.



Фигура 14. Отрицателна корелация между общия глутатион и РКМ преди и след 8-седмичен прием на минерална вода; А) преди интервенция (T0); Б) след интервенция (T1); Използван е непараметричен Spearman t-test. Статистическа значимост е отчитана при  $p < 0.05$ . Легенда: РКМ - реактивни кислородни метаболити.

#### **4.4. Ефект на минералната вода върху експресията на гени, свързани с възпалението и редокс баланса в изолирани РВМС клетки**

Нивата на генна експресия на *GCL* и *ICAM-1*, анализирани в двете времеви точки на изследване показаха нарастване след 8-седмичната интервенция с прием на минерална вода. Средните нива на генна експресия нарастват до  $1.935 \pm 0.34$  относителни единици иРНК за *GCL* ( $p=0.009$ ) и до  $2.63 \pm 0.45$  единици иРНК за *ICAM-1* ( $p=0.001$ ). Резултатите са представени на Фигура 15.



Фигура 15. Нива на генна експресия на *GCL* и *ICAM-1* в изолирани РВМС след интервенцията. Нивата на иРНК са представени като средна стойност на относителните единици иРНК  $\pm$  SEM за групата, сравнени с нивата преди интервенция, където експресията на всеки един ген при всеки доброволец е приета за равна на 1.

Неспецифична или липса на амплификация бе установена в експресията на: цистатионин бета-синтаза (CBS), цистатионин гама-лиаза (CGL), глутатион пероксидаза (GPx), индуцируема азотен окис синтаза (iNOS), *VCAM-1* с различни ендогенни контроли RPL0, RPL37a и ACTB1.

#### **4.5. Сравнение на резултатите от анализирани специфични маркери в зависимост от предпочитания източник на минерална вода**

Статистическо повишаване на нивата на общите тиоли бе установено и в двете групи – в група Дом Младост и в група Аквариум. Въпреки че не е статистически значимо, леко увеличение бе открито в нивата на общия глутатион, но само в група Дом Младост. Нивата на глутатионовите фракции (GSH, GSSG) и съотношението GSH/GSSG, в двете групи, бяха с подобни нива като тези на общата група, като тенденцията към увеличение на GSH и съотношението GSH/GSSG в T1 се наблюдаваше и в подгрупите. При останалите анализирани маркери не бяха установени статистически значими разлики в двете времеви точки на изследване. Единствено отчетена бе тенденция към увеличение на нивата на протеина VCAM-1 в двете групи (Таблица 11).

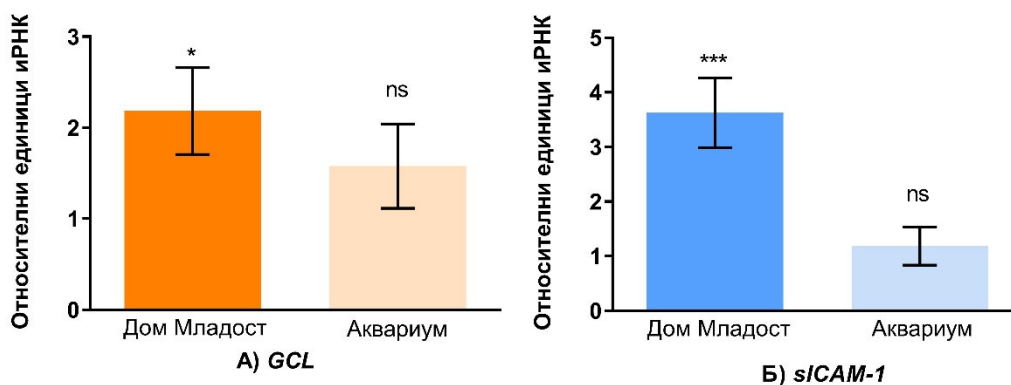
Таблица 11. Промени в серумните нива на биохимичните маркери, свързани с редокс статуса, за групите “Дом Младост” и “Аквариум” преди (T0) и след (T1) интервенцията.

Параметри	Младост Средна ±SEM T0 (n=33)	Младост Средна±SEM T0 (n=33)	Р стойност	Δ (T1- T0)
МДА [ $\mu\text{mol/L}$ ]	3.32±0.32	3.38±0.33	ns	0.06
РКМ [ $\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{dL}$ ]	31.56±0.72	31.21±0.78	ns	-0.35
ICAM-1 [ $\text{ng/mL}$ ]	162.7±15.31	177.9±14.67	ns	15.20
VCAM-1 [ $\text{ng/mL}$ ]	253.9±15.50	269.4±17.63	ns	15.50
Общи тиоли [ $\mu\text{mol/L}$ ]	441.1±14.23	497.6±13.97	***	56.50
Общ глутатион [ $\mu\text{mol/L}$ ]	2.66± 0.049	3.10± 0.292	0.07	0.44
Маркери	Аквариум Средна±SEM T0 (n=13)	Аквариум Средна±SEM T1 (n=13)	Р стойност	Δ (T1- T0)
МДА [ $\mu\text{mol/L}$ ]	3.51±0.470	3.31± 0355	ns	-0.20
РКМ [ $\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{dL}$ ]	28.94±1.33	29.42±1.02	ns	0.48
ICAM-1 [ $\text{ng/mL}$ ]	178.2±15.76	179.5±18.17	ns	1.3
VCAM-1 [ $\text{ng/mL}$ ]	239.0±19.43	267.5±11.95	ns	28.5
Общи тиоли [ $\mu\text{mol/L}$ ]	422.8±12.46	471.7±11.07	*	48.9
Общ глутатион [ $\mu\text{mol/L}$ ]	2.76± 0.118	2.81±0.104	ns	0.05

Данните са представени като средна стойност ± SEM. За сравнение на маркерите в двете времеви точки на изследване е използван чифтен t-test на Стюдънт. Статистическа значимост \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията.; Легенда: МДА, малонов диалдехид; РКМ, реактивни кислородни метаболити; ICAM-1, intracellular adhesion molecules, от английски междуклетъчна адхезионна молекула; VCAM-1, vascular cell adhesion molecules, от английски съдова клетъчна адхезионна молекула; ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.; Δ (T1 - T0), делта - показва разликата между двете времеви точки на изследване.

Отчетени бяха увеличени нива на общия глутатион и леко понижени нива на РКМ в плазма при група „Дом Младост“ след интервенцията. Тези резултати не бяха отчетени при група „Аквариум“.

Експресията на *GCL* и *sICAM-1* бяха статистически значимо по-високи за група „Дом Младост“ в T1 (Фигура 16). След интервенцията не бяха установени значими разлики в нивата на иРНК на изследваните гени в група „Аквариум“.



Фигура 16. Сравнение между нивата на генна експресия на GCL и sICAM-1 в РВМС след интервенцията между групи „Дом Младост“ и „Аквариум“; А) нива на генна експресия на GCL; Б) нива на генна експресия на sICAM-1. Нивата на иРНК са представени като средна стойност на относителните единици иРНК±SEM за групата, сравнени с нивата преди интервенцията, където експресията на всеки ген при всеки доброволец е приета за равна на 1.

#### 4.6. Дискусия на резултатите от изследваните специфични биохимични и молекулярно-генетични маркери

Сярасъдържащата минерална вода, която е разпространена в изобилие в България, се използва основно при спа-процедури, базирани на познанията от традиционната медицина за лечебните свойства на водата. Счита се, че активната молекула в ССМВ е, сероводородът, който може лесно да преминава през кожата. Като повишава активността на супероксид дисмутаза (СОД) и редуцирания глутатион, сероводородът понижава продукцията на АКФ и проявява антиоксидантни свойства. Чрез способността да инхибира NF-κB-сигнален път, митоген-активирана протеин киназа p38 (MARK p38), C-Jun N-терминална киназа (JNK), Bcl-2-асоциираните X протеини (BAX) и каспаза-3 и да активира Bcl може да прояви анти-апоптотични свойства (Shen et al., 2013; Guo, et al. 2013b). Анти-апоптотичните, противовъзпалителни и антиоксидантни ефекти на сероводорода се проучват в детайли като се използват синтетични донори на сероводород; като се потискат ензими от ендогения му синтез най-често в *in vitro* условия с човешки и животински клетъчни култури, а също и в експериментални модели с животни при индуцирани патологични състояния.. Тези нови знания неминуемо насочват вниманието на изследователите и към минералните води, като природен ресурс на сероводород.

Нашите резултати показват, че двумесечен прием на ССМВ води до статистически значимо повишение на нивата на общите тиоли – маркер за антиоксидантния капацитет в плазма. Глутатионът е трипептид, който участва в регулацията на редокс-статуса, метаболизма на лекарства и е субстрат на ензими, като глутатион пероксидаза, глутатион-S-трансфераза, тиолови трансферази и др. Глутатионът обичайно е в редуцирана форма (GSH), но се окислява (GSSG)

при условия на оксидативен стрес и съотношението GSH/GSSG се използва като индекс за редокс баланса. Независимо от факта, че не бе установена статистически значима разлика в съотношенията GSH/GSSG преди и след интервенцията, тенденция към повишаване бе отчетена при 83% от участниците в изследването в T1. Тези резултати са основание да предположим, че регулярният прием на минерална вода от Варненски басейн повлиява метаболизма и утилизацията на сяра в човешкото тяло. Подобни резултати са получени в други интервенционални изследвания с хора и животни, свързани с прием на ССМВ. Докладвани са значими повишения в нивата на общите тиоли в серия от проучвания на италиански колектив изследователи с прием на ССМВ от клинично здрави или страдащи от остеоартрит доброволци (Benedetti et al. 2007, 2009, 2010). През 2007 год. при 15 доброволци с остеоартрит (М=5, Ж=10, възраст 65-80 год.), учените установяват, че дванадесет дневни балнеопроцедури и прием на 300 mL/ден ССМВ (Термален център Pitium, Macerata Feltria, Italy) със съдържание на сулфиди (53.4 mg/L), подобряват антиоксидантната защита на организма, чрез значимо повишаване на общите тиоли и биологичната антиоксидантна сила (ВАР) и намаляване на нивата на окислителните маркери – МДА и продукти от окислението на протеините. В проучване със здрави доброволци (възраст 41–55 год.), двуседмичният прием на ССМВ (n=20), в количество 500 mL/ден и съдържание на сяра 14.5 mg/L (Термален център Saturnia, Grosseto, Italy), изпивана до час след отваряне на бутилката, води до значимо повишаване на нивата на общите тиоли в сравнение с контролната група (n=20), приемащи същото количество бутилирана минерална вода, без сероводород (Benedetti et al. 2009). В същото изследване е установено и значимо понижение в маркерите за липидно и протеиново окисление в плазма (МДА, карбонили и продукти от окислението на протеините), но само в групата, приемащи ССМВ. В последващо проучване на Benedetti и съавтори (2010) се установява повишаване на общите тиоли; намаляване на окислението (МДА и карбонили); възпалението (TNF- $\alpha$ ) и разграждането на хрущяла, отчетено чрез хрущялен олигомерен матричен протеин (СОМР) след 12-дневен прием на 400 mL/ден от Saturnia, Grosseto, Italy, в комбинация с калолечение и спа-процедури, приложени при пациенти с остеоартрит (n=15). Един месец след тази терапия, резултатите се запазват в групата, консумираща ССМВ, в сравнение с групата, чиято интервенция не включва консумация на ССМВ вода. В настоящото изследване, след интервенцията бе отчетена повишена експресия на *GCL*, скорост-определящият ензим за синтеза на глутатион (Фигура 15). Може да се предположи, че приемът на ССМВ повлиява нивата на глутатиона чрез ускоряване на гама-глутамиловия цикъл. Резултатите в настоящото изследване са в унисон с резултатите в други проучвания (Kimura 2004, 2010), и вероятно установеният ефект се дължи на разтворените в минералната вода на гр. Варна сярасъдържащи съединения. Те повишават активността на  $\gamma$ -глутамил-цистеин синтетаза и на глутамат цистеин лигаза (скорост-определящ за производството на GSH), като повишава активността на цистеин/глутаматния антипортер и на транспортера на цистеин, който е субстрат в синтеза глутатион (Kimura, 2010).



Малоновият диалдеhid е един от крайните продукти от липидното окисление и е маркер за компрометиран редокс статус (de Zwart et. al. 1999). По отношение на МДА и РКМ, не бяха установени статистически значими разлики в двете времеви точки на изследване и може да се предположи, че приемът на минерална вода от Варненски басейн не води до повишаване на нивата на окисление при здрави доброволци. Вероятно оксидантите се неутрализират своевременно от подобрената антиоксидантна защита на организма.

Пероксидите са постоянно образуващи се в тялото. Главна роля за противодействие на този процес има глутатионът и свързаните с неговия синтез и редукция ензими. Глутатион редуктазата използва за донори на електрони йодид, витамин С, витамин Е, и съединения със сулхидрилни групи. В нашето изследване бе открита статистически значима отрицателна корелация в Т0 между нивата на глутатиона и нивата на РКМ в плазма. Този резултат би могъл да се обясни с повишената експресия на *GCL*, което води до увеличаване на нивата на глутатиона, отговорен за редукцията на пероксиди. От биохимична гледна точка увеличената експресия на *GCL* може да се асоциира с изчерпването на глутатиона по време на интервенцията. Освен това, корелацията между РКМ и глутатиона в Т1 остава отрицателна, макар и без статистическа значимост.

Сравнението между участниците, в зависимост от предпочитания обществен водоизточник, показва повишение в нивата на общите тиоли в двете групи в Т1, като ефектът е по-голям в групата, консумирала вода от „Дом Младост“. Това може да се дължи на по-високите концентрации на серодоводород и разтворени сулфиди в тази вода. Подобрене в антиоксидантния капацитет чрез повишаване на общия глутатион и леко понижаване на РКМ бе установено в група „Дом Младост“ в сравнение с група „Аквариум“. Тези резултати бяха последвани от статистически значимо повишаване в експресията на *GCL* само в група „Дом Младост“. Може да се предположи, че по-високите нива на сярасъдържащи съединения в слабоминерализирани води водят до подобряване на антиоксидантната защита на организма и може да има по-благоприятни ефекти върху антиоксидантния статус на здрави доброволци. Увеличените нива на общия глутатион и лекото понижение в нивата на РКМ при група „Дом Младост“ в Т1 са индикация за подобрене на антиоксидантния капацитет в кръвен серум при групата. Същото не бе отчетено при групата „Аквариум“.

В настоящото изследване проучихме възможните ефекти на минералната вода на гр. Варна върху процесите на възпаление. Освен изследвания *hs-CRP* фокусирахме интереса си върху две адхезионни молекули *ICAM-1* и *VCAM-1*. Причината да се спрем на тях е, че и двете молекули, като специфични провъзпалителни маркери, се формират по време на процесите на възпаление като биологични таргети на нуклеарен фактор  $\kappa\text{B}$  (*NF- $\kappa\text{B}$* ) сигналния път, провокиран от тумор некрозиращ фактор-алфа (*TNF- $\alpha$* ).

ICAM-1 е гликопротеин и про-възпалителен маркер, основно експресиран по повърхността на ендотелни клетки или клетки от имунната система в ниски концентрации при нормални физиологични условия. При човек адхезионната молекула е кодирана от ген *ICAM-1*, чийто промотор/усилвател има свързващо място за редица транскрипционни фактори, в това число нуклеарен фактор –кВ (NF-кВ). Стимулацията от страна на цитокини води до бурно увеличение в концентрацията на ICAM-1.

ICAM-1, както и VCAM-1, позволява прикрепването на левкоцити към ендотелиума и способства тяхната трансмиграция в периферни тъкани, провокирайки възпалителен процес (Frank and Lisanti, 2008). Нашата хипотеза бе, че увеличение в нивата на двете адхезионни молекули най-вероятно би било вследствие от предшествано активиране на TNF- $\alpha$ .

Липсват данни за влиянието на ССМВ върху адхезионни молекули. В настоящото проучване двумесечният прием на Варненска минерална вода значително стимулира експресията на *ICAM-1*, въпреки че не бяха отчетени промени в концентрациите на протеина както в общата група, така и в подгрупите („Дом Младост“ и „Аквариум“). Повишената експресия на *ICAM-1* може да се обясни с отговора на тялото към предизвикателството регулярен двумесечен прием на микронутриенти чрез Варненската минерална вода. Както беше отбелязано, минералната вода съдържа малки количества сероводород, амониак, амониеви йони, флуорид др., което може да възпроизведе първоначален отговор чрез стимулиране на имунната система. Стимулирането на имунната система е вследствие на активирането на TNF- $\alpha$  и експресията на *ICAM-1*, феномен, наречен хормезис (Galvez et al. 2018). Това се възприема като адаптационен механизъм, чрез който, след първоначалното смущение в хомеостазата, организъмът се подготвя да преодолее по-тежък стрес (Galvez et al. 2018).

Нашите резултати са в съответствие с резултатите на Bhatia и съавтори (2012), които обясняват индуцирането на експресията на *ICAM-1* с ролята на сероводорода или на негови донори, да мобилизират имунната система при различни патологични състояния. Така например, сероводородът индуцира експресия на *ICAM-1* и неутрофилна адхезия при третиран с церулеин ацинарни клетки на панкреаса посредством активиране на NF-кВ и Src-киназни сигнални пътища (Tamizhselvi et al. 2010). Повишена експресия на про-възпалителни гени са наблюдавани и при фибробласто-подобни синовиоцити, получени от пациенти с ревматоиден и остеоартрит, третиран с натриев хидросулфид - донор на сероводород (Kloesch et al. 2012).

## Заклучение

Получените резултати ни довеждат до извода, че консумацията на ССМВ би могла да подобри редокс статуса на организма. Това се потвърждава от подобрените антиоксидантни маркери в кръвта и увеличената експресия на гени, участващи в антиоксидантната защита и възпалителния отговор. Предполагаме, че тези благоприятни ефекти се дължат на съдържанието на сярна-съдържащи съединения във Варненската минерална вода.

### 5. Ефекти на минералната вода в зависимост от начина на живот

Въз основа на данните от първата „Анкетна карта“, участниците бяха разделени на групи в зависимост от навиците, определящи техния начин на живот, такива като: индекс на телесната маса (ИТМ), физическа активност, тютюнопушене и прием на високоалкохолни напитки. Нивата на някои биохимични маркери, измерени в двете времеви точки на изследване, които се влияят от навиците, като липиден профил и окисление на липиди, редокс статус и възпаление, бяха сравнени между групите.

#### 5.1. Влияние на ИТМ върху ефектите от приема на минерална вода

Разпределението на участниците в зависимост от ИТМ е както следва: 26 доброволци са в група ИТМ<25 и 24 доброволци са в група ИТМ≥25 (виж. Фигура 6) . Не бяха установени статистически значими промени в ИТМ след интервенцията.

Както е представено в Таблица 12, базовите нива на общия холестерол, ТАГ, LDL-холестерола, МДА, hs-CRP преди интервенцията (Т0) бяха значимо по-високи в групата с ИТМ≥25, в сравнение с групата с нормално телесно тегло и ИТМ<25. След интервенцията (Т1), средните нива на LDL-холестерола в плазма намаляват статистически значимо в група с ИТМ≥25,  $p=0.04$ . При това, значимите разлики в стойностите на LDL-холестерола между групите отчетени в Т0 не бяха запазени в Т1. След интервенцията бе открита тенденция към намаляване на нивата на общия холестерол в групата с ИТМ≥25,  $p=0.055$ . Не бяха установени статистически значими разлики в нивата на HDL-холестерола между доброволците с нормално и наднормено тегло и този маркер остана непроменен до края на проучването.

Интервенцията с прием на минерална вода понижи статистически значимо нивата на hs-CRP и в двете групи, доброволци с нормално и доброволци с наднормено тегло ( $p=0.032$  и  $p=0.001$ , респективно). Въпреки че не бяха открити съществени разлики в базовите нива на общите тиоли между групите в Т0, след интервенцията те бяха значимо повишени и в двете групи: ИТМ<25,  $p<0.0001$ ; ИТМ≥25,  $p=0.006$ . Нивата на МДА бяха със значими разлики между участниците в групите с нормално и наднормено тегло в Т0,  $p=0.008$  и в Т1,  $p=0.001$ . Не бяха отчетени статистически значими разлики в този маркер след интервенцията в нито една от групите (Таблица 12).

Таблица 12. Ефекти на минералната вода от гр. Варна върху биохимични маркери в зависимост от фактори, свързани с начина на живот.

Индекс на телесната маса								
Параметри	<25 (T0), n=26	<25 (T1), n=26	≥25 (T0), n=24	≥25 (T1), n=24	P <sup>a</sup> (T0)	P <sup>b</sup> (T1)	P <sup>c</sup> <25	P <sup>c</sup> ≥25
Хол [mmol/L]	5.29±0.01	5.33±0.19	5.88±0.18	5.60±0.15	0.027	ns	ns	0.055
ТАГ [mmol/L]	0.88±0.06	0.85±0.04	1.32±0.12	1.45±0.14	0.002	<0.0001	ns	ns
LDL [mmol/L]	2.40±0.09	2.49±0.10	2.87±0.12	2.70±0.09	0.004	ns	ns	0.04
HDL [mmol/L]	1.72±0.06	1.67±0.07	1.56±0.08	1.48±0.09	ns	ns	ns	ns
МДА [μmol/L]	2.70±0.17	2.59±0.15	4.02±0.45	4.19±0.44	0.008	0.001	ns	ns
hs-CRP [mg/L]	2.24±0.33	1.48±0.10	3.33±0.52	2.31±0.33	0.008	0.017	0.032	0.001
Тиоли [μmol/L]	431±15.56	491±11.86	444±13.83	492±16.96	ns	ns	<0.0001	0.006
Физическа активност								
	ВФА (T0), n=24	ВФА (T1), n=24	НФА (T0), n=26	НФА (T1), n=26	P <sup>a</sup> (T0)	P <sup>b</sup> (T1)	P <sup>c</sup> ВФА	P <sup>c</sup> НФА
Хол [mmol/L]	5.55±0.18	5.48±0.19	5.60±0.2	5.44±0.17	ns	ns	ns	ns
ТАГ [mmol/L]	1.08±0.11	1.09±0.13	1.09±0.09	1.19±0.10	ns	ns	ns	ns
LDL [mmol/L]	2.58±0.10	2.63±0.11	2.67±0.13	2.55±0.09	ns	ns	ns	ns
HDL [mmol/L]	1.63±0.08	1.54±0.09	1.66±0.07	1.62±0.07	ns	ns	ns	ns
МДА [μmol/L]	3.28±0.28	3.18±0.28	3.38±0.40	3.52±0.41	ns	ns	ns	ns
hs-CRP [mg/L]	2.02±0.17	1.58±0.12	3.44±0.55	2.16±0.31	0.022	ns	0.022	0.002
Тиоли [μmol/L]	453±13.00	515±12.70	423±15.74	471±14.5	ns	0.028	0.001	0.001
Тютюнопушене								
	НП (T0), n=33	НП (T1), n=33	П (T0), n=17	П (T1), n=17	P <sup>a</sup> (T0)	P <sup>b</sup> (T1)	P <sup>c</sup> НП	P <sup>c</sup> П
Хол [mmol/L]	5.39±0.14	5.27±0.12	5.93±0.26	5.82±0.27	0.056	0.039	ns	ns
ТАГ [mmol/L]	0.99±0.07	0.95±0.05	1.28±0.15	1.50±0.20	0.063	0.002	ns	0.096
LDL [mmol/L]	1.69±0.06	1.61±0.06	1.56±0.11	1.52±0.11	0.018	0.043	ns	ns
HDL [mmol/L]	2.49±0.08	2.48±0.07	2.90±0.15	2.81±0.13	ns	ns	ns	ns
МДА [μmol/L]	3.03±0.24	2.84±0.18	3.91±0.55	4.35±0.58	0.097	0.004	ns	ns
hs-CRP [mg/L]	2.28±0.20	1.86±0.14	3.69±0.79	1.91±0.44	0.033	ns	0.021	0.003
Тиоли [μmol/L]	435±12.42	497±9.48	440±19.35	481±23.68	ns	ns	<0.0001	0.076
Прием на високоалкохолни напитки								
	НА (T0), n=37	НА (T1), n=37	А (T0), n=13	А (T1), n=13	P <sup>a</sup> (T0)	P <sup>b</sup> (T1)	P <sup>c</sup> НА	P <sup>c</sup> А
Хол [mmol/L]	5.52±0.15	5.32±0.78	5.72±0.25	5.87±0.30	ns	0.054	0.059	ns
ТАГ [mmol/L]	1.09±0.09	1.10±0.08	1.09±0.13	1.26±0.23	ns	ns	ns	ns
LDL [mmol/L]	2.62±0.10	2.52±0.07	2.66±0.11	2.78±0.14	ns	ns	ns	ns
HDL [mmol/L]	1.63±0.05	1.55±0.65	1.69±0.13	1.68±0.13	ns	ns	ns	ns
МДА [μmol/L]	3.39±0.32	3.26±0.30	3.18±0.30	3.63±0.45	ns	ns	ns	ns
hs-CRP [mg/L]	2.94±0.41	2.02±0.22	2.25±0.28	1.46±0.14	ns	ns	0.003	0.019
Тиоли [μmol/L]	419±11.28	480±11.26	487±18.11	525±19.87	0.003	0.048	<0.0001	ns

Легенда: Хол (Холестерол общ); ТАГ (триацилглицероли); LDL (LDL холестерол); HDL (HDL холестерол); МДА (малонов диалдехид); hs-CRP (високочувствителен С-реактивен протеин); ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци; ВФА (висока физическа активност); НФА (ниска физическа активност); НП (непушачи); П (пушачи); НА (неконсумиращи и рядко консумиращи високоалкохолни напитки); А (консумиращи високоалкохолни напитки); ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.

Данните в таблица 12 са представени като средна стойност ± SEM. Статистическа значимост \*p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001 спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията. а – p стойност при сравнение на две независими групи преди интервенцията (T0), Student's t test; b – p стойност при

сравнение на две независими групи след интервенцията (T1), Student's *t* test; *s* – *p* стойност при сравняване на променливите преди (T0) и след (T1) интервенцията между субгрупите, Paired-samples *t*-test.

## 5.2. Влияние на физическата активност върху ефектите от приема на минерална вода

Разпределението на участниците в зависимост от тяхната физическа активност беше както следва: 26 бяха с ниска физическа активност (НФА) и 24 с висока физическа активност (ВФА). Това разпределение беше направено въз основа на няколко въпроса за самооценка, представени на Фигура 17.



Фигура 17. Разпределение на участниците в зависимост от тяхната физическа активност. В оранжево – групата с висока физическа активност (ВФА,  $n=24$ ); в синьо – групата с ниска физическа активност (НФА,  $n=26$ ). В скоби – брой участници според посочената активност по анкета.

Както е видно от Таблица 12, физическата активност като фактор, определящ начина на живот, не доведе до значими разлики в нивата на липидите и МДА между групите в двете времеви точки на изследване, T0 и T1. Освен това, интервенцията с прием на минерална вода не промени значимо изследваните параметри между групите с ниска и висока физическа активност.

От друга страна, статистически значимо понижаване в нивата на hs-CRP бе отчетено след интервенцията и в двете групи. Този ефект бе по-значим в групата с НФА. След интервенцията стойностите на hs-CRP в тази група бяха близки до тези на групата с ВФА (Таблица 12). Въпреки че не бяха открити разлики между групите в нивата на общите тиоли в T0, след интервенцията този маркер бе повишен значимо и в двете групи ( $p=0.001$ , ВФА и НФА), а също между групите в T1. По-високи нива бяха измерени в групата с ВФА в сравнение с групата с НФА след интервенцията ( $p=0.028$ ).

### 5.3. Влияние на тютюнопушенето върху ефектите от приема на минерална вода

На база данните от анкетата, половината от участниците (n=25) не са пушили никога цигари. Заедно със 7 непушачи от повече от 5 год. и 1 непушач от по-малко от 5 год. те сформираха групата на непушачите (НП), n=33. Останалите участници (n=17) бяха разпределени в групата на пушачите (П). Дневното количество на изпушваните цигари при пушачи е показано на Фигура 18.



Фигура 18. Разпределение на участниците в зависимост от пристрастността им към тютюнопушене. В оранжево – група непушачи (НП), n=37; в синьо - група пушачи (П), n=13. Посочен е брой изпушени цигари/ден; В скоби – брой участници според анкета.

Средните нива на общия холестерол и ТАГ бяха статистически значимо по-високи в групата на пушачите в двете времеви точки на изследване (Таблица 12). Интересно е, че средните стойности на LDL-холестерола бяха значимо пониски в същата група, в сравнение с група НП:  $p=0.018$  (T0) и  $p=0.043$  (T1). HDL-холестеролът остана без промени, както между групите, така и в групите след интервенцията.

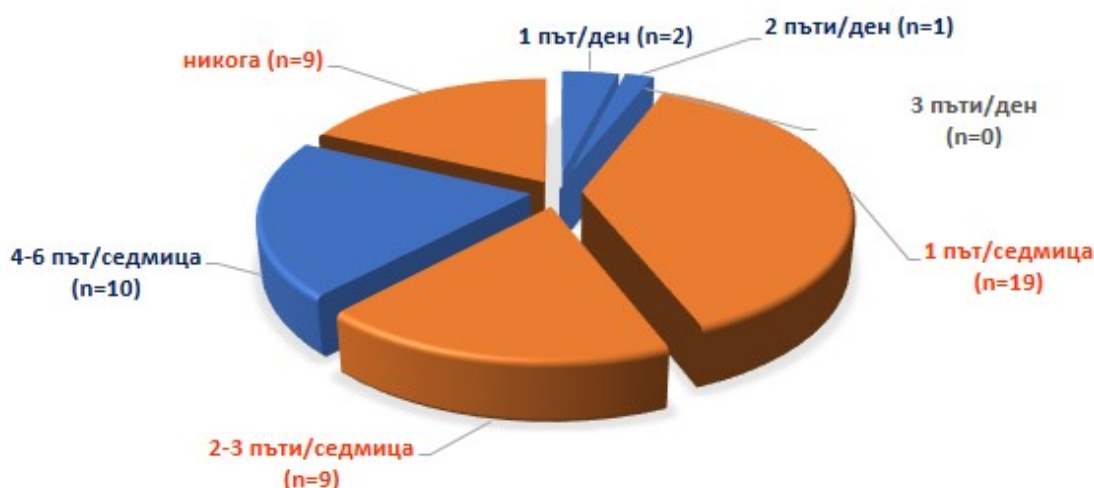
Както се очакваше, средните нива на МДА бяха по-високи при пушачи, отколкото при непушачи, както в T0, така и в T1. След интервенцията нивата на МДА се понижиха при непушачи и се повишиха при пушачи, но тези промени не бяха статистически значими (Таблица 12).

Много интересен резултат е получен по отношение на hs-CRP. Преди интервенцията средните нива на маркера при пушачи бе значимо по-висок, в сравнение с група НП ( $p=0.033$ ). След интервенцията бе установено значимо понижение в двете групи, но ефектът е по-значим при пушачи. Така, в T1 нивата на hs-CRP бяха почти равни между групите.

Не отчетохме разлики в нивата на общите тиоли между групите в T1 и T0. След интервенцията техните концентрации в плазма се повишиха значимо единствено в група НП ( $p < 0.0001$ ).

#### **5.4. Влияние на алкохолната консумация върху ефектите от приема на минерална вода**

Групата на неконсумиращи и рядко консумиращи алкохол (НА) включва 37 участници, а останалите 13 формират групата на често консумиращи алкохол (А). Групите бяха формирани въз основа на честотата на прием на високоалкохолни напитки, Фигура 19.



Фигура 19. Разпределение на участниците в зависимост от консумацията на високоалкохолни напитки. В оранжево – група неконсумиращи алкохол (НА),  $n=37$ ; в синьо - група консумиращи алкохол (А),  $n=13$ . Посочен е броят на консумациите; В скоби – брой участници според анкета.

Според резултатите в Таблица 12, консумацията на високоалкохолни напитки (ВАН) не повлиява липидния профил с изключение на леко, статистически незначимо повишение на нивата на общия холестерол след интервенцията в двете групи.

Не бяха установени значими разлики в нивата на hs-CRP между двете групи, нито в в T0, нито в T1 (Таблица 12). След интервенцията с прием на минерална вода, обаче, този маркер бе понижен в T1 за двете групи:  $p=0.003$  за групата на НА;  $p=0.019$  за група А.

Базовите нива на общите тиоли бяха значимо по-високи в група А, в сравнение с група НА ( $p=0.003$ ). След интервенцията само в група НА бяха идентифицирани значими повишения в плазмените нива на общите тиоли. По този начин в T1 разликата между групите изчезна.

## 5.5. Дискусия

Целта на проучването бе да се изследва дали някои фактори, свързани с начина на живот, ще повлияят върху отговора на организма спрямо 8-седмичен прием на ССМВ. Нашата хипотеза, че навиците биха повлияли оздравителните ефекти на минералната вода, бе базирана на факта, че успешният контрол на много болести зависи от начина на живот и това е важно не само в превенцията, но и за успешната терапия (de Lemos et al., 2012; Dean and Söderlund, 2015).

В настоящото проучване базовите нива на маркери от липидния профил, някои про-възпалителни маркери, както и маркери за оксидативен статус, бяха статистически значимо по-ниски в групите, чиито навици определят начина им на живот като здравословен (подгрупи с нормално телесно тегло, регулярна физическа активност, непушачи, неконсумиращи, или рядко консумиращи алкохол).

Разликите в маркерите от липидния профил бяха по-ясно изразени между групите, разделени в зависимост от ИТМ. Значимо по-високи бяха базовите средни нива на общия холестерол, LDL-хол и ТАГ в групата с наднормено тегло ИТМ $\geq$ 25 преди интервенция (T0), в сравнение с групата с ИТМ $<$ 25 (Таблица 12). Подобни бяха резултатите за маркера за липидно окисление – МДА, както и за про-възпалителния маркер hs-CRP. Тези резултати не бяха изнедаващи. Храненето е един от най-важните фактори от начина на живот, директно повлияващ човешкото здраве (Gorski and Roberto, 2015). Вредните хранителни навици се асоциират със затлъстяването, което в наши дни е един от най-сериозните здравословни проблеми в световен мащаб (Mozaffarian et al., 2011). Излишъкът от мастна тъкан корелира с дислипидемия, повишени нива на про-възпалителни цитокини, а също и с драстично променен редокс статус (Fernández-Sánchez et al. 2011; Marseglia et al., 2014). В настоящото проучване 6 участници бяха със затлъстяване според критериите на СЗО (ИТМ $\geq$ 30), а за 24 изчисления ИТМ бе в границите 25 - 29,9 кг/м<sup>2</sup>, което се определя като пред-обезидно състояние (с наднормено тегло) (WHO). Въпреки че не е толкова сериозно като затлъстяването, пред-обезидно състояние се възприема за прогностичен фактор за бъдещо развитие на хронични патологични състояния (Hou et al., 2008).

Анализирайки промените, настъпили в нивата на изследваните маркери след интервенцията, установихме, че липидният профил е частично подобрен в групата с наднормено тегло. Това се проявява чрез значително намаляване в нивата на LDL-хол ( $p=0,04$ ) и леко, макар и не значително намаляване в нивата на общия холестерол ( $p=0,055$ ).

След интервенцията значимо намаление в нивата на про-възпалителния маркер hs-CRP и повишение в концентрацията на общите тиоли бяха открити при всички участници, независимо от ИТМ. Предполагаме, че активните вещества, разтворени в ССМВ може би са причина за подобрения противовъзпалителен и редокс статус. На този етап можем да предположим, че подобреният редокс



статус след приема на минерална вода вероятно е причина за подобрения липиден профил. Поради техния специфичен метаболизъм и по-дългата продължителност на живот, LDL липопротеиновите частици са много почувствителни към окислителите в кръвта и са с ключова роля в развитието на атерогенеза и сърдечно-съдовата патология.

Използваната в проучването минерална вода от Варненски басейн е със слаба минерализация и сложен химичен състав – хидрогенкарбонатна, магнезиево, калциево, силициева със съдържание на сероводород и разтворени сулфиди (Караколев, 1990; Владева и Костадинов, 1996, 2007; Sokrateva, 2018). Минерални води с подобен състав проявяват антиоксидантни, противовъзпалителни, кардиопротективни, свойства (Carbajo and Maraver, 2017).

Физическата активност бе друг жизнен фактор във фокуса на нашето изследване. Редовната физическа активност се счита за полезен навик, свързан с намален риск от метаболитни и сърдечносъдови заболявания (Pérez-Martínez et al., 2017). Както се вижда от Таблица 12, не бяха установени значими разлики в базовите нива на маркерите от липиден профил и МДА между групите с ВФА и с НФА. Също така, интервенцията не доведе до съществени промени в техните нива. От друга страна, базовите нива на hs-CRP в плазма бяха значимо по-високи в група с НФА, в сравнение с участниците с ВФА ( $p=0.022$ ). Тези резултати са в унисон с други проучвания, в които се докладва, че концентрацията на плазмения hs-CRP и физическата активност, като жизнен фактор, са в обратна взаимовръзка (Kasapis and Thompson, 2005; Hamer and Stamatakis, 2009). Интригуващо, след интервенцията с прием на ССМВ нивата на hs-CRP бяха подчертано понижени, нещо повече, статистическата разлика между групите, установена в Т0 се загуби.

Не бяха установени разлики в базовите нива на общите тиоли между групите с НФА и ВФА. Въпреки че след интервенцията плазмените концентрации бяха значимо повишени при всички участници, в групата с ВФА стойностите бяха статистически значимо по-високи ( $p=0.028$ ). Тези различия в ефектите на ССМВ биха могли да се обяснят с предположението, че участниците, които са физически активни имат по-добър редокс статус. Дълготрайните ефекти от физическата активност са асоциирани с подобрена антиоксидантна защита и логично по-ниски нива на про-възпалителните цитокини (Kasapis and Thompson, 2005; Simioni, et al., 2018).

Тютюнопушенето се счита за рисков навик, който влияе негативно върху цялостното здравословно състояние (Hamer et al., 2019; Fiorito et al., 2019). Сравнявайки липидно-профилните маркери между групите на пушачи и непушачи, в настоящото проучване не бяха открити разлики в базовите стойности на общия холестерол, ТАГ и HDL-хол между двете групи. След интервенцията с прием на ССМВ, намаление в нивата на общия холестерол бе отчетено и в двете групи, но този ефект беше по-ясно изразен в групата на пушачите. Същевременно, повишени нива на ТАГ бяха установени в същата група в Т1. Друг интересен резултат бе по-ниските нива на LDL-хол, както преди, така и след интервенцията ( $p=0.018$  и  $p=0.043$ , респективно) в групата на

пушачите, сравнени с нивата на LDL-хол в групата на непушачите. Нивата на LDL-хол, измерени при пушачите в двете времеви точки на изследване могат да бъдат обяснени с факта, че всички участници в това проучване бяха с добър здравен статус, без оплаквания по време на проучването, или с история на някакво предшестващо сърдечносъдово заболяване. От друга страна, повишените нива на ТАГ в Т1 в същата група е резултат най-вероятно породен от обратния ефект на съединенията, съдържащи се в цигарения дим. Има данни, че дори умерено тютюнопушене за кратък период от време води до промени в липидния профил. Например в проучвания, анализиращи влиянието на рисковия начин на живот върху здравето, се съобщава, че нивата на ТАГ, LDL-хол и HDL-хол са неблагоприятно повлияни при пушачи, в сравнение с непушачи (Pérez-Martínez, et al., 2017; Mammias et al., 2003; Jain and Ducatman, 2018).

Отчитайки нивата на МДА, не са наблюдавани разлики между П и НП в началото на проучването. Интервенцията със ССМВ доведе до понижени нива на МДА само в групата на НП и в Т1 разликите в стойностите между двете групи бяха статистически значими ( $p=0.004$ ). Ниската чувствителност на пушачите към антиоксидантния ефект на ССМВ може да се обясни с по-голямата предекспозиция на пушачите на окислителни, съдържащи се в цигарения дим.

Логично, плазмените нива на hs-CRP, като маркер за нискостепенно възпаление преди интервенцията, бяха статистически значимо по-високи при пушачите, в сравнение с непушачите. Въпреки това след интервенцията бе установено значимо понижение в нивата на hs-CRP и в двете групи, но съществени разлики между групите не бяха открити. Най-вероятно, посредством разтворените биологично активни съставки, ССМВ оказва противовъзпалителен ефект (понижава hs-CRP), и този ефект не зависи от променливата тютюнопушене, като жизнен навик.

Интервенцията с прием на ССМВ повишава нивата на общите тиоли и в двете групи, но този ефект е значителен само за група НП. Възможна причина за тази разлика във въздействието на минералната вода може да бъде промененият редокс статус на пушачите. Протеините, богати на сулфхидрилни групи, известни като тиоли, играят централна роля в антиоксидантната защита на организма. От резултатите можем да съдим, че ССМВ е с потенциал да подобрява редокс статуса, благодарение на разтворените в тях активни съединения. Повишените нива на общите тиоли могат да повишат устойчивостта на организма спрямо оксидативни предизвикателства и така да подпомогнат превенцията срещу социално значими заболявания, като метаболитен синдром, атеросклероза и много други. От друга страна, антиоксидантната сила на водата може да не е достатъчна, за да отговори на повишената нужда на пушачите от антиоксиданти (Ayaori, et al., 2000).

Подобно на физическата активност, консумацията на алкохол не променя липидните маркери и липидното окисление. Не бяха открити разлики в нивата на hs-CRP между групите консумиращи редовно (А) и неконсумиращи и/или рядко консумиращи високоалкохолни напитки (НА) преди и след интервенцията. В

рамките на двете групи, обаче, бяха установени значително намалени нива на маркера след интервенцията. Подобно на предишните анализи, можем да приемем, че и този ефект се дължи на потенциала на ССМВ, въпреки че евентуалният принос на алкохола за получените резултати в група А не трябва да се изключва. Има научни доклади, в които се съобщава, че умерената консумация на алкохол допринася за подобряване на системните маркери на възпалението, включително hs-CRP (Imhof et al., 2001; Wang et al., 2008).

Както може да се види в Таблица 12, базовите нива на общите тиоли за група А са значително по-високи в сравнение с група НА ( $p=0.03$ ). Това е интригуващ резултат, тъй като не е установен за никоя от другите променливи. Може да се предположи, че хората от тази група имат стимулирана антиоксидантната защита. Консумацията на алкохол обикновено се свързва с токсичните му ефекти върху организма поради увеличените РКФ и изчерпването на ендогенните антиоксиданти. Въпреки това в проучване от 2009 г. Chan et al. съобщават, че редовната умерена консумация на алкохол може да допринесе за подобряване на биохимичните маркери и на качеството на живот, според самооценката на участниците в проучването (Chan et al., 2009). След интервенцията общите тиоли се увеличават и в двете групи, но този резултат е значителен само за група А.

### *Заклучение*

Ежедневната консумация на ССМВ от Варненски басейн може да допринесе за по-доброто здравословно състояние на хора с различни навици. Потенциалът на тази вода да подобрява липидния профил бе по-ясно изразен при лица с наднормено тегло. Според нашите резултати тютюнопушенето може да има отрицателно въздействие върху благоприятното въздействие на водата, особено по отношение на липидите и тяхното окисление. Наблюдаваното значимо понижение в нивата на hs-CRP, както и значимото повишаване на общите тиоли след интервенцията във всички анализирани групи разкрива потенциалните противовъзпалителни и антиоксидантни свойства на минералната вода от Варненски басейн, които, изглежда, са независими от навиците, свързани с начина на живот. И, за да свържем тези резултати със здравето, от гледна точка на потребителите, когато говорим за прецизна медицина и персонализирано хранене, трябва да се предвиди не само подходящата за индивида терапия и храна, но и водата в кръстосана връзка с начина на живот, който от своя страна влияе на всички метаболитни процеси.

## V. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

### 1. Изводи

#### *Физико-химичен анализ на минерална вода*

1. Съгласно изследваните физико-химични показатели Варненската минерална вода се категоризира като слабоминерализирана, средно твърда, без отклонения от допустимите норми.
2. Сравнителният анализ на водата от три водоизточника в гр. Варна показва различия по отношение на съдържанието на разтворени сулфиди и свободен  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{Na}^+$  и общ органичен въглерод в по-високи концентрации във водата от обществена чешма „Дом Младост“, и  $\text{SO}_4^{2-}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  в по-високи концентрации във водоизточник „Аквариум“.
3. Проследено в динамика, бе установено слабо повишаване на рН, понижаване на концентрацията на  $\text{NH}_3$ , както и на разтворените сулфиди и  $\text{H}_2\text{S}$  в минералната вода от водоизточник „Аквариум“.

#### *Анкетни проучвания*

1. Анкетното проучване сред населението на гр. Варна относно причините и режима на употреба на минералната вода установи:
  - липса на информираност за промените във физикохимичния състав и свойства на водата при съхранението ѝ
  - употреба основно за превенция на заболявания на отделителната, храносмилателната и опорно-двигателната системи.
2. Проучване на ефекта от 8-седмичен прием на минералната вода установи липса на субективни промени в общото физиологично състояние на участниците в интервенцията.

#### *Влияние на приема на минерална вода върху човешкия метаболизъм*

Осем-седмичният прием на минерална вода от обществено достъпните чешми на гр. Варна при клинично здрави доброволци установи:

1. Промени в кръвното налягане: значимо понижаване в диастолата и тенденция към понижаване в систолата при общата група доброволци, като в подгрупата, пили вода от Аквариума, промяната е по-силно изразена.
2. Подобрене на бъбречната функция, изразено в значимо намалени нива на креатинина в кръвта, увеличени нива на диурезата и на ИГФ в общата група, при значимост на промените само в подгрупа Дом Младост.
3. Повишеният ИГФ и пониженият креатинин, като маркери за подобрена бъбречната функция, не са резултат от повишената диуреза и могат да бъдат отдадени на съставките в минералната вода.
4. Подобен оксидативен статус, изразен в значимо увеличени серумни нива на тотални тиоли в общата група доброволци, по-ясно изразени в подгрупа Дом Младост, увеличени нива на общия глутатион и на експресията на *GCL* в РВМС в общата група и само в подгрупа Дом Младост.

5. Значимо понижението на нивата на hs-CRP в кръв в общата група доброволци след интервенцията и само в подгрупа Дом Младост показват противовъзпалително действие на Варненската минералната вода, дължащо се вероятно на съдържанието на сярсъдържащи се съединения. Установената значимо повишена експресия на *sICAM-1* в РВМС при всички участници и само в подгрупа Дом Младост не корелира с повишение на нивата на белтъка в серума, като маркер за про-възпалителен статус.
6. Двумесечният прием на минерална вода от Варненски басейн може да допринесе за по-доброто здравословно състояние на хора с различни навици, изразено в:
  - подобряване на липидния профил на хора с наднормено тегло чрез намаляване в нивата на LDL-хол и незначимо намаляване на нивата на общия холестерол;
  - повишен противовъзпалителен потенциал изразено в значимо понижено нивата на hs-CRP в подгрупите с наднормено тегло, ниска физическа активност, пушачи, и по-слабо изразено в групата, приемаща алкохол;
  - подобрен редокс баланс изразен в повишаване нивата на общите тиоли, по-силно изразено в подгрупите със здравословен начин на живот: нормално тегло, непушачи и неприемащи алкохол.

## 2. Приноси

### *Приноси с оригинален характер*

1. Получени са нови данни, оценяващи съдържанието на биологично активни вещества във Варненската минерална вода. Направено е сравнително проучване на физикохимичния състав на минерални води от обществено достъпни чешми и е извършен мониторинг на промените в състава на минералната вода при лагеруване.
2. Проведено е първо анкетно проучване и е обобщена информация, касаеща употребата на Варненската минерална вода.
3. Получени са първите научни доказателства, че минералната вода от обществените чешми на гр. Варна подобрява бъбречната функция.
4. Получени са научни доказателства, че минералната вода от обществените чешми на гр. Варна има противовъзпалително действие.
5. Доказан е потенциалът на Варненската минерална вода да повишава антиоксидантната защита на организма.
6. Получени са данни за благоприятно влияние на Варненската минерална вода върху кръвното налягане.
7. Благоприятното въздействие на Варненската минерална вода се влияе от начина на живот (тютюнопушене, прием на алкохол и др.)

### ***Приноси с потвърдителен характер***

1. Потвърдени са данните в литературата относно физикохимичния състав на сярасъдържащата минерална вода от Варненски басейн.
2. Потвърдено е лечебното влияние на слабоминерализираните сярасъдържащи минерални води върху функциите на бъбреците.
3. Потвърдени са данните от литературата, че сярасъдържащите минерални води имат антиоксидантен и противовъзпалителен потенциал.
4. Получени са потвърдителни данни, че начинът на живот оказва влияние върху метаболитния профил (липиден профил, провъзпалителни маркери и оксидативен статус).

### ***Приноси с приложен характер***

1. Генерираните нови научни данни за състава и свойствата на минералните води на гр. Варна като достъпен ресурс за профилактика и лечение на възпалителни и бъбречни заболявания ще допринесат за по-рационално използване на водите и подобряване на здравния статус на населението на региона.

## VI. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Публикации във връзка с дисертационния труд

1. **Sokrateva T, Ivanova D, Galunska B, Todorova M, Ivanov D, (2018).** Physicochemical analysis of Varna basin mineral water. 18 International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018, Conference proceedings Vol. 18, Book number 3.1. Water resources. Forest, marine and ocean ecosystems., page 555-564. 10.5593/sgem2018/3.1/S12.072. (Реферирана в Web of Knowledge)
2. Roussev B, **Sokrateva T**, Nashar M, Radanova M, Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Potoroko I, Olczyk K and Ivanova D, **(2019)**. Effect of sulfur-containing mineral water on renal function. C R Acad Bulg Sci, 72 (11), 1577-84. DOI:10.7546/CRABS.2019.11.16. (IF 0.321, Q2)
3. **Sokrateva T**, Roussev B, Nashar M, Kiselova-Kaneva Y, Mihaylova G, Todorova M, Pasheva M, Tasinov O, Nazifova-Tasinova N, Vankova D, Ivanova P, Radanova M, Galunska B, Vlaykova T, and Ivanova, D, **(2019)**. Effects of sulfur-containing mineral water intake on oxidative status and markers for inflammation in healthy subjects. Archives of Physiology and Biochemistry <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1638416>. (IF 2.110, Q2)
4. **Sokrateva T**, Nashar M, Salim A, Tatyana V, Ivanova D, **(2019)**. Health effects of sulfurous mineral water may vary depending on lifestyle. J of IMAB. 2019 Oct-Dec;25(4), p 2828-37. <https://doi.org/10.5272/jimab.2019254.2828>, (IF 0.230, Q4)

### Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд

1. **Sokrateva T**, Roussev B, Nashar M, Vlaykova T, Ivanova D, **(2019)**. The impact of Varna basin mineral water intake on blood pressure in healthy volunteers. 16th NuGOweek 9-12 September, Agroscope, Bern, Switzerland; From Foodomics to Nutrigenomics: Translating food composition data into healthy diets, Book of abstracts, page 72.
2. **Sokrateva T**, Nashar M, Kiselova-Kaneva Y, Ivanova D, **(2019)**. Sulfurous mineral water as a potential donor of H<sub>2</sub>S with implications to human health. 21 st ISANH Redox Congress & 4<sup>th</sup> ISANH Middle East world congress Redox, Waste, Microbiota. Sultan Qaboos Iniversity 4-5 March, 2019-Muscat, Oman. Abstracts book, page 51.
3. Русев Б, **Сократева Т**, Нашар М, Раданова М, Иванова Д, **(2019)**. Влияние на сяра-съдържащите минерални води от Варненски басейн върху функцията на бъбреците и възпалението. VI Национална научна среща по биохимия на

Асоциация на биохимичните катедри в България, 1 – 3 ноември 2019 г., Спа Хотел Терма, с. Ягода, Стара Загора.

4. **Sokrateva T**, Radanova M, Nashar M, Todorova M, Roussev B, Galunska, B, Ivanova D, (2018). Effect of sulfur-containing mineral water intake on blood oxidative status in healthy subjects. 15th NuGOweek Mitochondria, Nutrition and Health, 3-6 September 2018 International Centre for Life, Newcastle upon Tyne, UK; Book of Abstract, page 72.
5. **Sokrateva T**, Nachar M, Radanova M, Hadjiev B, Ivanova D, (2018). Effects of sulphur-containing mineral water on classical biochemical markers in human interventional study. Selected abstract from the 3rd European Summer School on Nutrigenomics “Modeluation of the epigenome by nutrition and xenobiotics during early life and across the life span: the key role of life style”, 25-26 June, Jesi, Italy, page 14.
6. **Sokrateva T**, Nashar M, Ivanova D, (2017). Research on the molecular mechanisms of sulfur-containing mineral waters from the varna basin on human metabolism in regards to their usage as a drinking remedy. NuGO Week, Molecular nutrition – Understanding how food influences health, Varna 28-31 august, 2017, Book of Abstracts, Scripta Scientifica Pharmaceutica, Vol. 4, 2017, suppl. 1, p.47.

## VII. ФИНАНСИРАНЕ

Изследването е извършено благодарение на проект “Проучване на молекулните механизми на действие на сярсъдържащите минерални води от Варненския басейн върху човешкия метаболизъм с оглед използването им като лечебно-питейно средство”, Договор №1/12, 16.12.2016 г., финансиран от Фонд научни изследвания – МОН. Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания, 2016 г., ръководител проф. Диана Иванова, дбн.