

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ ВАРНА**  
**ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ**  
**ФАКУЛТЕТ ФАРМАЦИЯ**  
**КАТЕДРА БИОХИМИЯ, МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА И НУТРИГЕНОМИКА**

**Деяна Георгиева Ванкова**

**ПРОУЧВАНЕ РОЛЯТА НА ГЕНЕТИЧНИ ФАКТОРИ И НАЧИН НА ЖИВОТ ЗА ИЗЯВАТА НА  
ЗАТЛЪСТЯВАНЕ И МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ В ИЗВАДКА ОТ БЪЛГАРСКАТА ПОПУЛАЦИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР”**

**по научна специалност Биохимия**

**Научен ръководител проф. Диана Иванова, дбн**

**Варна, 2015**

Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика при Медицински Университет Варна и е насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд обхваща 154 страници, 23 фигури и 34 таблици. Цитирани са 239 литературни източника.

Дисертантът е асистент в Катедрата по Биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика, както и в лабораторията по нутригеномика, функционални храни и нутрацевтици към същата катедра.

Експерименталната работа по дисертационния труд е финансирана в рамките на два научно изследователски проекта:

- „Проучване на зависимостта между наличието на някои полиморфизми във FTO, ADIPOQ и ADIPOR2 гените и риска от изявата на високостепенно затлъстяване и метаболитен синдром в представителна извадка от българската популация”. Проектът е финансиран от фонд „Медицинска наука” при Медицински Университет Варна.
- „BM0602 Adipose tissue - a key target for prevention of the Metabolic Syndrome”, финансиран по програма КОСТ на ЕК за сътрудничество в областта на науката и техниката, съфинансиран от МОН.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 24.03.2015 г. (вторник) от 14.00 ч. в III аудитория на Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов” – Варна.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ Варна.

## СЪДЪРЖАНИЕ

Често използвани съкращения	4
I Въведение	5
II Цел и задачи	7
III Материали и методи	8
IV Резултати и обсъждане	11
1.Обща характеристика на антропометрични и клинични показатели на изследваните лица.	11
1.1. Роля на образованието	12
1.2. Роля на икономическата заетост	13
2. Роля на стила на живот върху изявата на затлъстяване	13
2.1. Влияние на консумацията на алкохол	13
2.2. Влияние на тютюнопушенето	16
2.3. Влияние на храненето	17
2.4. Влияние на физическата активност	22
3. Влияние на подбрани пет единични еднонуклеотидни полиморфизми върху изявата на биохимични и клинични параметри на затлъстяването и метаболитния синдром	24
3.1. Определяне на алелните и генотипните честоти на петте единични нуклеотидни полиморфизма в извадка от 182 изследвани лица в българската популация	24
3.2. Определяне на алелните честоти на петте единични нуклеотидни полиморфизми в българската извадка от 182 изследвани лица, разделени в две групи според ИТМ	25
3.3. Влияние на еднонуклеотидните полиморфизми върху изявата на метаболитен синдром	38
4. Целеви интервенции	42
4.1. Изследване ефектите от приема на чай от <i>Agrimonia eupatoria</i> върху метаболитни и биохимични маркери, свързани със затлъстяване	42
V Обобщение	50
VI Заключение	52
Приноси	53
Списък на публикации и участия по темата на дисертацията	54

Често използвани съкращения

A	абсорбция
АКФ	активни кислородни форми
АЛАТ	аланин аминотрансфераза
АсАТ	аспартат аминотрансфераза
ИТМ	индекс телесна маса
ССЗ	сърдечно-съдови заболявания
ТАГ	триацилглицероли
ADIPOQ	ген за адипонектин
ADIPOR2	ген за 2- <sup>PM</sup> рецептор за адипонектин
ABTS	[2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина)] катион радикал
BMI	body mass index
CRP	C-reactive protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAM	6-carboxyfluorescein
FTO	fat mass and obesity-associated gene
FRAP	ferric reduction potential of plasma
HDL	high density lipoproteins
HRP	horse radish peroxidase
IL6	интерлевкин 6
MAB	monoclonal antibody
PCR	polymerase chain reaction)
SNP	single nucleotide polymorphism
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF alpha	tumor necrosis factor alpha

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните десетилетия затлъстяването се разраства с неимоверно бързи темпове. Епидемиологичните проучвания в последните години единодушно и недвусмислено показват лавинообразно нарастване честотата на затлъстяването, както при възрастни индивиди, така и сред децата и подрастващите. В последните двадесет години честотата на затлъстяването се е увеличила с до 40% в повечето европейски държави. Доскоро разглеждано основно като проблем предимно във високоразвитите държави, днес нивото на затлъстяване се повишава в световен мащаб, като засяга и развиващите се икономики.

За възникване на затлъстяването роля играят разнообразни ендогенни и екзогенни фактори.

**Молекулни фактори.** Различни циркулиращи нискомолекулни хормони с пептидна природа - лептин, адипонектин, грелин, висфатин и др. Те се секретират от клетките на мастната тъкан и повлияват както нейния метаболизъм, така и метаболизма на останалите тъкани.

**Метаболитни фактори.** Нарушенията в обмяната на мастната тъкан се свързват с нискостепенно хронично възпаление, лежащо в основата на нарушения, наблюдавани при затлъстяване и съпътстващите го състояния, като инсулинова резистентност, метаболитен синдром и диабет тип 2.

**Генетични фактори.** Смята се, че предразположението към затлъстяването има полигенен характер. Съвременните изследвания посочват над 50 генетични локуса, които могат да се асоциират със затлъстяването, такива като различни еднонуклеотидни полиморфизми или мутации.

**Хормонални промени.** Промени в центрите на мозъка, в частност в хипоталамуса, които контролират ситостта, са друг важен фактор, който се свързва с наднорменото тегло и високостепенното затлъстяване.

Факторите на околната среда също оказват ефект върху телесното тегло. Сред тях по-важни са

- видът, количеството и качество на храната;
- нивото на физическа активност;
- социо – демографските фактори – пол, възраст, образование, семейно положение;
- поведенчески фактори – тютюнопушене, консумация на алкохол;
- психологически фактори (хранителни разстройства, прием на храна в отговор на стрес или депресия);
- хроничен стрес.

Днес затлъстяването се свързва с повишена честота на сърдечно-съдови заболявания, диабет тип 2, рак на дебелото черво и в резултат - повишена смъртност. Затлъстяването е водещ фактор за изявата и развитието на метаболитен синдром. Метаболитният синдром като пряко следствие от затлъстяването е описан за първи път още през 1988 г. от G. Reaven. В последните години това състояние се оформя като изключително значим клиничен и обществено-здравен проблем.

Все по-разрастващата се епидемия от затлъстяване в световен мащаб е резултат от сложните взаимодействия между генетичните фактори и факторите на околната среда. Днес се смята, че затлъстяването има генетична основа, но факторите на околната среда са тези, които опосредстват изявата на обезитетен фенотип. Въпросът дали ендегенните или екзогенните фактори са водещи за изявата на затлъстяване все още е недостатъчно изяснен. Разпространението на затлъстяването се увеличава с толкова бързи темове в различни видове популации, че промените не могат да се обяснят с промени в наследствеността. Вероятно тези фактори имат различна тежест в различните държави, и се повлияват както от генетичната хетерогенност, така и от културата на различните популации, а дори и от политическата среда.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Основна цел на настоящия дисертационен труд е да се изследва влиянието на отделни фактори, които играят роля за изявата на затлъстяване и свързаните с него метаболитни нарушения.**

За изпълнението на настоящата цел бяха формулирани следните задачи:

1. Изследване влиянието на генетичните фактори за изявата на затлъстяване чрез генотипиране на еднонуклеотидни полиморфизми в рисковите алели

- rs9939609 на FTO гена.
- rs1501299 и rs822391 в гена за адипонектин.
- rs16928662 в гена за рецептора за адипонектин.
- rs1800795 в гена за IL6.

2. Проучване връзката между начина на живот и изявата на затлъстяване както и на свързаните с него метаболитни нарушения, в т.ч.

- консумация на различни видове храни
- употреба на алкохол и тютюнопушене
- физическа активност

3. Проучване на социо-демографска характеристика на участниците и връзката ѝ със затлъстяването и свързаните с него метаболитни нарушения, в т.ч.

- пол
- възраст
- образование
- трудова заетост

4. Изследване влиянието на ефекта от приема на чай от *Agrimonia eupatoria* L. като добавка към ежедневната диета върху някои биохимични и метаболитни маркери, свързани със затлъстяването.

### **III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **1. Изследвани лица**

Работата с изследваните лица е одобрена от Комисията по етика на научните изследвания към МУ Варна с протокол №6/23.07.2009г.

В цялото изследване са включени 182 доброволци на възраст от 18 до 71 години. Съотношението мъже/жени е съответно 64/118. Доброволците са разделени в две групи 112 лица са с ИТМ <30 и 70 лица с ИТМ ≥30. Всички участници в изследването са попълнили и подписали „Карта за информирано съгласие“, чрез която подробно са информирани за вида на изследването, извършваните процедури и условията на съхранение на резултатите. Също така всички участници са попълнили и „Анкетна карта“, съдържаща социо-демографски данни, информация за здравния статус, хранителните навици и начин на живот. Тези документи са представени в приложения 1 и 2.

За изследванията свързани с консумация на воден извлек от камшик е получено разрешение от Комисията по етика на научните изследвания към МУ- Варна с протокол 13/24.03.2011г. В това проучване са включени 19 клинично здрави доброволци на възраст 18-55 години Съотношението мъже/жени е съответно 5/14.

*Вземане на кръв.* От всяко изследвано лице се вземат по 10 ml кръв от брахиална вена. Пробовземането се извършва в интервала 8.00-9.30 часа сутринта след 12 часово гладуване.

*Антропометрични измервания.* Измерват се височина (m) и килограми (kg), изчислява се индекс телесна маса (ИТМ) в kg/m<sup>2</sup>. Извършват се измервания на обиколките на талия и ханш и се изчислява съотношението им.

*Кръвно налягане.* Двукратно, през 5 минутен интервал от квалифициран медицински персонал се извършва измерване на систолното и диастолно кръвно налягане на пациентите в седнало положение.

#### **2. Растителен материал**

Билката камшик, използвана за приготвяне на извлека е от една партида и е закупена от аптеката. Производител е фирмата „Селибиум ЕООД“, Варна. Рецептата за приготвянето му беше заимствана от българската народна медицина: 1g растителен материал се залива с 200ml вряща вода и се оставя за 10 минути да се запари.

Всички доброволци в продължение на 30 дни консумираха като допълнение към ежедневната си диета 200 ml чай от камшик, разделен в два приема (в 9.00 и в 14.00 ч.). Вземат се кръвни проби от изследваните лица в ден 1 и ден 30 на интервенцията.

Освен че декларираха, че не приемат медикаменти и хранителни добавки, участниците бяха съветвани да не променят обичайния си начин на живот по време на изследването.

#### **3. Измерване на биохимични маркери**

За измерване нивата на плазмената глюкоза, триглицеридите (ТАГ), общия и HDL холестерол са прилагани ензимни колориметрични методи. Използвани са търговски китове (набор от реактиви) на фирмата Human, Wiesbaden, Germany, като всяко измерване беше осъществено в трикратно повторение. Съгласно указанията на производителя биохимичните маркери се измерваха в рамките на деня на пробовземането.



#### **4. Определяне на ензимни активности**

Аланин аминотрансфераза (АлАТ) и аспартат аминотрансфераза (АсАТ), както и  $\gamma$ -глутамил трансфераза ( $\gamma$ -ГТ) са измервани в плазма с помощта на търговски китове (производители Quimica Clínica Aplicada S.A., Amposta, Spain и Human, Wiesbaden, Germany). Съгласно указанията на производителите изследванията на ензимните активности са извършвани в рамките на деня на пробовземането.

#### **5. Ензимно свързан сорбентен анализ (ELISA)**

Извършен е ензимно-свързан сорбентен анализ (ELISA) за определяне нивата на циркулиращите плазмени протеини:

- адипонектин
- лептин
- IL6
- С-реактивен протеин
- TNF alpha

#### **6. Генотипиране**

Извършено е генотипиране, включващо изолиране на ДНК от кръв, определяне на еднонулеотини полиморфизми с помощта на “TaqMan” метод и RealTimePCR апарат. Генотипирани са еднонуклеотидните полиморфизми:

- rs9939609 във FTO гена
- rs1501299 и rs822391 в гена за адипонектин
- rs1692866 в гена за рецептора за адипонектин
- rs1800795 в гена за IL6.

#### **7. Спектрофотометрично определяне на антиоксидантния потенциал на плазма**

Извършено е спектрофотометрично определяне на антиоксидантния потенциал на плазма чрез:

- погасяване на преформиран ABTS радикал, показател за тотален антиоксидативен капацитет на плазмата.
- редукция на Fe<sup>3+</sup> до Fe<sup>2+</sup> - показател за антиоксидантен потенциал на плазмата.
- определяне на тотални тиоли

#### **8. Статистически анализи на резултатите:**

• Статистическата обработка на резултатите от анкетните карти е извършена с помощта на статистически софтуер SPSS (v. 17.0). За сравнение между групите на изследвани лица бяха използвани  $\chi^2$  тест на Pearson, t-тест на Student и корелация по Pearson.

• Статистическата обработка на SNP-та, изчисляването на генотипната и алелната честота и логистичния регресионен анализ са извършени онлайн със статистическа програма SNPStats (Catalan Institute of Oncology, Spain).

- Статистическата обработка на останалите резултати е проведена с помощта на статистически софтуер GraphPadPrism (v.5.00). Данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност. Използван е вариационен анализ ANOVA, последван от чифтен t-test.

При всички използвани анализи за статистически достоверни бяха приети различия при ниво на значимост  $p < 0.05$ .

#### IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

##### 1. Обща характеристика на изследваните антропометрични и клинични показатели на изследваните лица.

Таблица 1. Антропометрични характеристики на изследваните лица

Показател		ИТМ < 30 N=112	ИТМ ≥ 30 N=70
Възраст (години)		36,80 ± 13,31	43,15 ± 12,44*
Височина (m)		1,67±0,09	1.69±0,10
Пол	мъже	34	30
	жени	78	40
Тегло (kg)		66,47±13,59	103,40±15,40***
Талия (cm)		77,53±10,69	110,29±12,59***
Ханш (cm)		99,70±7,52	120,06±9,86***
Талия/ханш		0,78±0,09	1.69±0,10***

\*p<0,05; \*\*\*p<0,001

В групата с ИТМ ≥30 се наблюдават статистически по-високи антропометрични стойности. При сравняването на двете изследвани групи лица (ИТМ <30 и ИТМ ≥30) беше установена статистически значима разлика във възрастта -  $t = 3,21$  ( $p < 0,05$ ), като средната възраст в първата група е  $36,80 \pm 13,31$  г., а във втората  $43,16 \pm 12,43$  г. Установи се, че има статистически значима правопрпорционална зависимост между увеличаването на възрастта и нарастването на ИТМ при всички изследвани лица ( $r=0,342$ ,  $p<0.001$ ). В групата на студентите (възраст 18-25 години) 87.50% са с ИТМ <30. Тези резултати потвърждават данни от други проучвания - при популации от кавказки тип и при негроидни популации (Polikandrioti et al., 2009; Kasiam Lasi On'kin et al., 2007). Една от причините за увеличаване на теглото при жените е свързана с нарастване на възрастта, навлизане в менопауза и промяна на хормоналния баланс. Редица изследвания показват, че висцералната мастна тъкан, както и ИТМ се увеличава при жени в менопауза, когато концентрациите на естрогени намалееят, а тези на тестостерон се увеличат (Tchernof et al., 1998). Друга причина за увеличаване на теглото при жените с нарастване на възрастта са броя на бременностите и ражданията (Lahmann et al., 2000).

При сравняване на зависимостта на ИТМ от пола, също беше намерена съществена разлика:  $t = 1,90$  ( $p<0,05$ ), като при мъжете средната стойност на ИТМ е  $29,88 \pm 6,24$ , а при жените е  $27,66 \pm 7,68$ . Този резултат не е изненадващ и може да се обясни с факта, че жените полагат повече грижи за поддържане на теглото и външния си вид в сравнение с мъжете.

На всички 182 доброволци са изследвани нива на глюкоза, триацилглицероли, общ и HDL холестерол, измерени са систолно и диастолно кръвно налягане. Получените резултати са представени в таблица 2.

Таблица 2. Клинични показатели на двете изследвани групи лица.

Показател	Лица с ИТМ<30 (N=112)	Лица с ИТМ $\geq$ 30 (N=70)
Глюкоза (mmol/l)	4,51 $\pm$ 0,63	5,67 $\pm$ 2,00***
Триглицериди (mmol/l)	1,13 $\pm$ 1,33	1,79 $\pm$ 0,99***
Общ холестерол (mmol/l)	4,79 $\pm$ 1,15	5,21 $\pm$ 1,18*
HDL холестерол (mmol/l)	1,40 $\pm$ 0,39	1,23 $\pm$ 0,32**
Систолно кръвно налягане (mm Hg)	111,28 $\pm$ 13,55	131,56 $\pm$ 18,87***
Диастолно кръвно налягане (mm Hg)	77,53 $\pm$ 10,69	90,07 $\pm$ 14,19 ***

Данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001,

При всички лица със затлъстяване са установени статистически значими различия в клиничните показатели. При лицата със затлъстяване се наблюдават по-високи стойности на глюкозата, триацилглицероли и общия холестерол, като разликите са статистически значими. Систолното и диастолно кръвно налягане също са значимо по-високи в групата със затлъстяване. Нивата на HDL холестерола, очаквано са по-ниски в групата на лицата с ИТМ >30. Тези резултати са в потвърждение на литературни данни, за ролята на затлъстяването за понижаване нивата на HDL холестерола (Rashid & Genest, 2007).

### 1.1. Роля на образованието.

Всички 182 респонденти са посочили в анкетните карти своето образование. Резултатите са показани в таблица 3.

Таблица 3. Образование на изследваните лица

Образование	Общо N=182 % от всички лица	ИТМ < 30 N=112 % от всички лица	ИТМ < 30 N=112 % в групата	ИТМ $\geq$ 30 N=70 % от всички лица	ИТМ $\geq$ 30 N=70 % в групата
Основно	5/ 2,70 %	2/1,10 %	1.79%	3/ 4,30 %	1,65 %
Средно	55/ 30,10 %	24/13,19 %	21.43%	30/ 42,90 %	16,48%
Студент	24/ 13,10 %	21/11,54 %	18.75%	3/ 4,30 %	1,65%
Висше	98/ 53,60 %	65/35,71 %	58.04%	33/ 47,10 %	18,13%

Нивото на образование на изследваните лица е свързано с ИТМ, като броя на хората с ИТМ <30 е по-висока в групата на висшистите в сравнение с групата на тези с основно и средно образование ( $\chi^2=15.47$ , p<0.001). Тези резултати са в потвърждение на редица сходни изследвания, показващи, че нивото на образование корелира обратнопропорционално с изявата на затлъстяване сред различни популации - европейски, северноамерикански, азиатски, (Martikainen 1999; Halkjer 2003). Тази зависимост е особено характерна за развитите държави (Cohen et al., 2013; McLaren 2007).

Едно възможно обяснение е, че лицата с висше образование имат по-добро общо разбиране относно здравословния начин на живот, а от там и по-пълноценното прилагане на здравословни практики в ежедневието им (Jeffery 1997). Тези фактори им помагат да поддържат нормално тегло и по-рядко да страдат от затлъстяване в сравнение с хората с по-ниска степен на образование. В групата на студентите на възраст 18-25 години 87,50 % са с ИТМ <30. Този факт може да се обясни, както с придобиване на висше образование, така и с младата им възраст.

## 1.2. Роля на икономическата заетост

Всички 182 респонденти са посочили в анкетните карти своята икономическа заетост. Резултатите са показани в таблица 4

Таблица 4. Икономическа заетост на изследваните лица

Икономическа заетост	Общо N=182 % от всички лица	ИТМ < 30 N=112 % от всички лица	ИТМ ≥ 30 N=70 % в групата от N=70	ИТМ ≥ 30 N=70 % общото (182)
Работещ/а	73,80 %	45,60 %	28,60 %	74,30 %
Безработен/а	2,70 %	0,00 %	2,75 %	7,10 %
Пенсионер/ка	3,30 %	1,10 %	2,20 %	5,70%
Друга*	19,78 %	15,38 %	4,40 %	11,40 %

\* под друга заетост се разбира учащи, домакини.

Трудовата заетост е друг социално-икономически фактор, свързан със затлъстяването. Това се доказва както от резултати от други изследвания (Ball 2002), така и от резултатите от настоящото изследване - всички доброволци, които са посочили, че са били безработни са с ИТМ ≥ 30 ( $\chi^2 = 14.07$ ,  $p < 0.01$ ). При работещите хора, особено на високи позиции работата определя начина на живот, диетата и физическата активност. В настоящето проучване не може еднозначно да се определи дали затлъстяването е първичен фактор, водещ до по-нисък социално-икономически статус или е следствие от отрицателните нагласи на обществото към хората с наднормено тегло.

## 2. Роля на стила на живот върху изявата на затлъстяване

### 2.1. Влияние на консумацията на алкохол

Един от факторите на храненето е консумацията на различен вид и количество алкохол. Резултатите са получени от анкетните карти от всички 182 респонденти и са представени в таблици 5-10.

Таблица 5. Консумация на алкохол.

Употреба на алкохол	Общо N=182	ИТМ<30 N=112	ИТМ≥30 N=72
Да	155/ 85.20%	97/ 53.30%	58/ 31.90%
Не	27/ 14.80%	15/ 8.20%	12/ 6.60%

Данните са представени като % от броя на всички изследвани лица

По-голямата част от всички изследваните лица са посочили, че консумират алкохолни напитки (таблица 5). Не се наблюдава статистически значима разлика при консумацията на алкохол  $\chi^2=0.48$ ,  $p>0.05$  между двете изследвани групи лица.

Таблица 6. Консумация на бира

Консумация на бира (брой бутилки)	Общо N=113	ИТМ<30 N=67	ИТМ≥30 N=46
1	92 / 81,42%	52 / 77,61%	40 / 86,96%
2	15 / 13,27%	9 / 13,43%	6 / 13,04%
3	5 / 4,42%	5 / 7,46%	0 / 0%
10	1 / 0,89%	1 / 1,49%	0 / 0%

Данните са представени като % от броя на лица, посочили, че консумират бира

По-голяма част от лицата, консумиращи алкохол посочват обичайна консумация до две бутилки бира. Само едно анкетирано лице посочва екстремна обичайна консумация от 10 бутилки бира дневно. В нашето изследване не се установи статистически значима разлика при консумацията на бира  $\chi^2=4.40$ ,  $p>0.05$  между двете групи лица (таблица 6).

Таблица 7. Консумация на бяло вино

Консумация на бяло вино (брой чаши)	Общо N=116	ИТМ<30 N=79	ИТМ≥30 N=37
1	73 / 62,93%	47 / 59,49%	26 / 70,27%
2	32 / 27,59%	26 / 32,91%	6 / 16,22%
3	9 / 7,76%	4 / 5,06%	5 / 13,51%
8	1 / 0,86%	1 / 1,27%	0 / 0%
10	1 / 0,86%	1 / 1,27%	0 / 0%

Данните са представени като % от броя на лица, посочили, че консумират бяло вино

В настоящето изследване 90% от лицата, употребяващи алкохол, посочват обичайна консумация от 1-2 чаши бяло вино дневно. Две от лицата отбелязват необичайно висока консумация от 8-10 чаши вино (таблица 7). При направения анализ не се установява статистически значима разлика при консумацията на бяло вино  $\chi^2=6.26$ ,  $p>0.05$  между двете изследвани групи лица.

Таблица 8. Консумация на червено вино

Консумация на червено вино (брой чаши)	Общо N=117	ИТМ<30 N=79	ИТМ≥30 N=38
1	77 / 65,81%	49 / 62,03%	28 / 73,68%
2	33 / 28,21%	26 / 32,91%	7 / 18,42%
3	5 / 4,27%	3 / 3,80%	2 / 5,26%
4	1 / 0,85%	0 / 0%	1 / 2,63%
16	1 / 0,85%	1 / 1,27%	0 / 0%

Данните са представени като % от броя на лица, посочили, че консумират червено вино

Равен брой лица посочват консумация на бяло и на червено вино, съответно 116 и 117 човека (таблица 7 и таблица 8). Нашето изследване показва, че 94% от посочилите, че консумират червено вино, употребяват обичайно до две чаши дневно (таблица 8). Едно лице посочва необичайно висока консумация от 16 чаши. Не се установи статистически значима разлика при консумацията на червено вино  $\chi^2=5.13$ ,  $p>0.05$  между двете изследвани групи лица.

Таблица 9. Консумация на ликьори

Консумация на ликьори (ml)	Общо N=41	ИТМ<30 N=29	ИТМ≥30 N=12
20	1 / 2,44%	1 / 3,45%	0 / 0%
50	23 / 56,10%	15 / 51,72%	8 / 66,67%
100	14 / 34,15%	11 / 37,93%	3 / 25,00%
200	2 / 4,88%	2 / 6,90%	0 / 0%
1000	1 / 2,44%	0 / 0%	1 / 8,33%

Данните са представени като % от броя на лица, посочили, че консумират ликьори

Само 22.53% от всички анкетираните лица посочват употребата на ликьори. Единственото лице, което посочва необичайно висока консумация от 1000 ml ликьор дневно е с ИТМ >30 (таблица 9). Не се установява статистически значима разлика при консумацията на ликьори  $\chi^2=4.40$ ,  $p>0.05$  между двете групи лица.

Таблица 10. Консумация на концентрати

Консумация на концентрати (ракия, уиски, водка, джин) (ml)	Общо N=122	ИТМ<30 N=75	ИТМ≥30 N=47
до 50	68 / 55,74%	41 / 54,67%	27 / 57,45%
до 100	30 / 24,59%	20 / 26,67%	10 / 21,28%
до 200	16 / 13,11%	9 / 12,00%	7 / 14,89%
до 500	5 / 4,10%	4 / 5,33%	1 / 2,13%
1000	3 / 2,46%	1 / 1,33%	2 / 4,26%

Данните са представени като % от броя на лица, посочили, че консумират концентрати

В нашето изследване се установи, че 67% от всички анкетираните лица консумират концентрати. По-голяма част (80.33%) от лицата, консумиращи концентрати посочват обичайна употреба до 100 ml алкохол дневно. Прави впечатление, че 3 лица посочват обичайна консумация от 1000 ml концентрат (таблица 10). Не се установи статистически значима разлика при обичайната консумацията на концентрати между двете изследвани групи лица,  $\chi^2=7.20$ ,  $p>0.05$ .

Част от калорийния прием при възрастните индивиди е за сметка на алкохолната консумация. Алкохолът съдържа средно 29 kJ/g (7.1 kcal/g), а някои видове алкохол (ликьори) съдържат и въглехидрати. Много проучвания показват обратна връзка между консумацията на алкохол и ИТМ и съотношението талия/ханш. Леката до умерена употреба на червено вино има благоприятен ефект за редукция и контрол на теглото (Frankel et al., 1993). Същевременно прекомерната употреба на алкохол, съчетана и с повишен хранителен калориен прием, води до увеличение на ИТМ. При нашето изследване не се установява статистически значима разлика при обичайната консумацията на различни видове и количества алкохол в групата на лицата със затлъстяване и в контролната група. Проучването на навиците на доброволците, участващи в това изследване се основава на анкетни карти. Вероятно не всички респонденти са преценявали точно количеството консумиран алкохол. Възможно е употребата на алкохол да е съпроводена с консумация на различно количество храна заедно с алкохола.

## 2.2. Влияние на тютюнопушенето

Един от въпросите в анкетните карти, адресирани към навиците на живот на изследваните лица, е относно тютюнопушенето. Резултатите са представени в таблица 11.

Таблица 11. Тютюнопушене при изследваните лица

Тютюнопушене	ИТМ	Общо N=182	ИТМ<30 N=112	ИТМ≥30 N=70
Настоящи пушачи	29,93±7,96*	67/ 36,80%	34/30,4%**	33/ 47,1%
Бивши пушачи	28,90±6,33	35/ 19,2%	21/18,8%	14/ 20,0%
Непушачи	27,00±6,84	80/ 43,70 %	57/50,9%	23/ 32,9%

\*Данните са представени като средна стойност ± стандартното отклонение на средната стойност; \*\* данните са представени като % в съответната група.

В настоящето изследване най-висок е процентът на доброволците, посочили че никога не са пушили. Бе установено, че лицата в групата на непушачите са с най-нисък ИТМ, за разлика както от настоящите, така и от бившите пушачи. Това е в противоречие с повечето намерени сходни изследвания (Ferrara et al., 2001; Grunberg, 1986). Същевременно, за гръцката популация, която е близка като култура до населението у нас, има докладвани данни, че по-големият брой цигари в групата на пушачите показва тенденция да корелира положително с ИТМ, особено при мъжете (Vamía et al., 2004). В групата на изследваните от нас лица с ИТМ <30 половината са непушачи, а настоящите пушачи са едва 30%. В групата с ИТМ ≥30 почти половината са настоящи пушачи, а никога не пушилите - едва 33%. Тази разлика между двете групи изследвани лица е статистически значима:  $\chi^2= 6.52$ ,  $p<0.05$ .

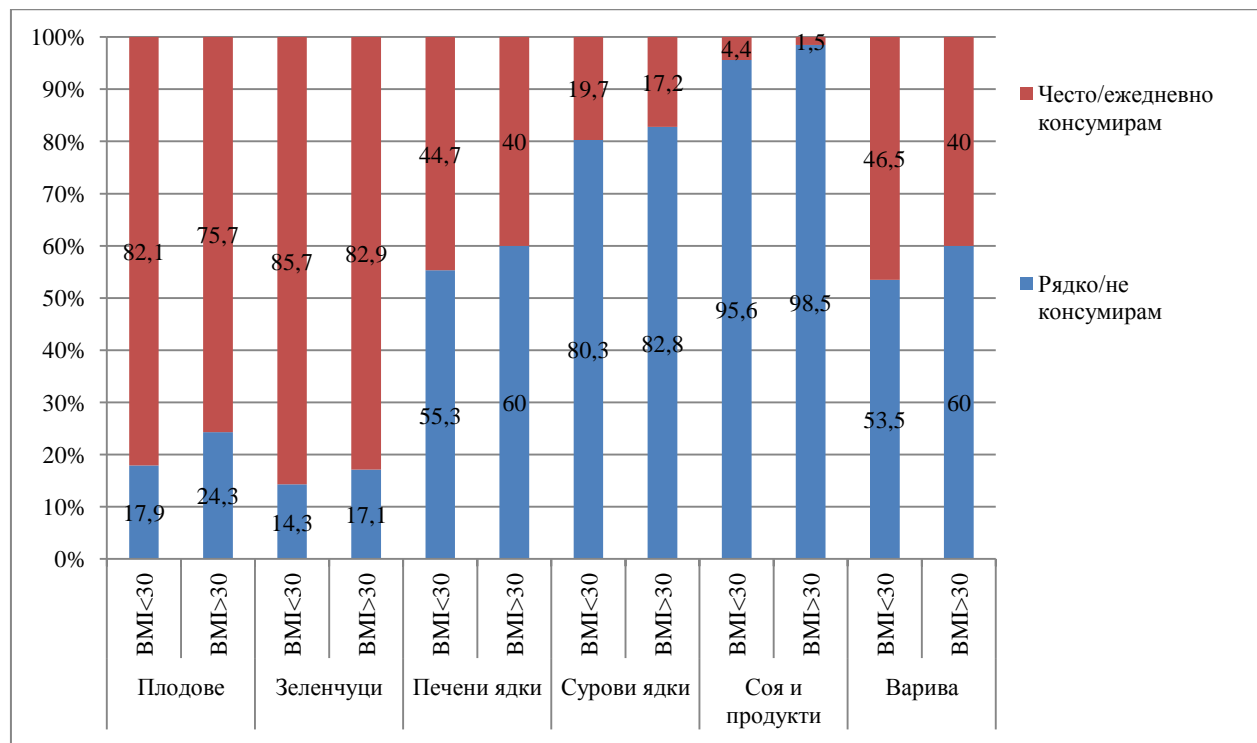
Увеличената абдоминална и висцерална мастна тъкан е един от факторите, обуславящи развитието на метаболитен синдром. Обиколката на талията е свързана с натрупване на висцерална адипозна тъкан, която се влияе от концентрацията на кортизола. Сходни проучвания показват, че пушачите имат по-високи плазмени нива на кортизол на гладно в сравнение с непушачите (Chiolo et al., 2008). По-високите концентрации на кортизол е възможно да са резултат от стимулацията на активността на симпатиковата нервна система, индуцирана от тютюнопушенето. Половите хормони също могат да играят роля, т.к. висцералната мастна тъкан при жените се увеличава, когато концентрациите на естроген намалее, а тези на тестостерон се увеличат. Сходни проучвания показват, че при жените пушачки, за разлика от непушачките, се наблюдават по-високи стойности на андрогени и понижени бионаличности на естрогени (Michnovicz et al., 1986). Изследванията показват увеличаване на висцералната мастна тъкан при мъжете при намаляване нивата на тестостерон. Тютюнопушенето при мъжете води до понижаване концентрациите на тестостерон. Като цяло, излишъкът на кортизол, както и дисбалансът между мъжки и женски полови хормони при жените и намаляването на тестостерона при мъжете могат да опосредстват увеличаването на висцералната мастна тъкан при пушачите в сравнение с непушачите (Chiolo et al., 2008).

Друго възможно обяснение за по-ниския ИТМ при непушачите в настоящето изследване е тяхната по-добрата физическа активност и по-здравословният начин на живот, които водят, в сравнение с пушачите.



### 2.3. Влияние на храненето

Всички изследвани лица са попълнили данни в анкетни карти за честотата и вида на различни хранителни продукти, консумирани ежедневно



Фигура 1. Връзка между честота на консумация на растителни храни и ИТМ (данните са представени като процент в съответната група).

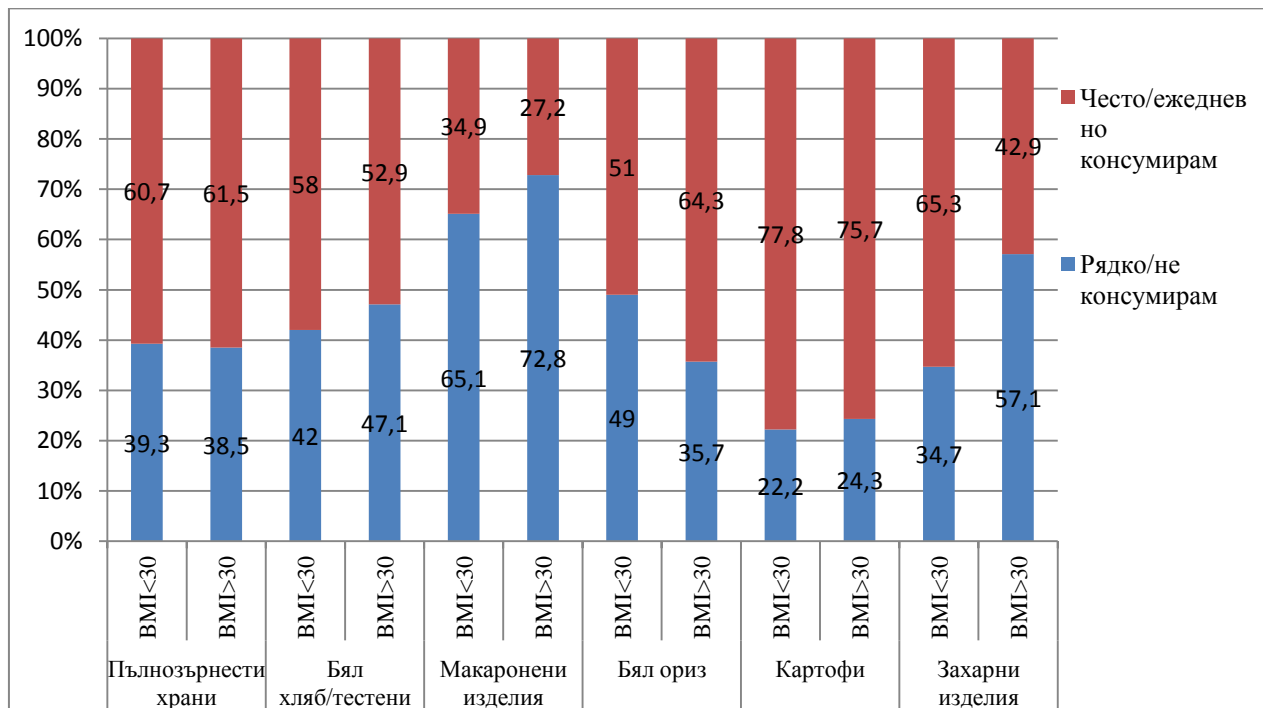
Ежедневната консумация на пресни плодове и зеленчуците е много важна характеристика на здравословното хранене. В нашето изследване се установи, че в групата с ИТМ <30 лицата консумират по-често пресни плодове (82.1%) и зеленчуци (85.7%) в сравнение с тези в групата с наднормено тегло (75.7% и 82.9 съответно). Липсва статистически значима разлика ( $\chi^2=1.71$ ,  $\chi^2=0.02$ ,  $p>0.05$ ). При направения мултирегресионен анализ се установи, че консумацията на сурови зеленчуци има най-голямо отношение към ИТМ (Beta = -0.605,  $p = 0.001$ ). Това доказва, че честата употреба на пресни зеленчуци определя значително по-нисък ИТМ. Този резултат е в съответствие с множество данни от литературата за ролята на плодовете и зеленчуците за поддържане на здравословно тегло. Широката употреба на растителна храна корелира с ниска степен на абдоминално затлъстяване (Romaguera, 2009). Както е известно, богатото съдържание на антиоксиданти и полифеноли в пресните плодове и зеленчуци могат да понижат фактори на възпалението, свързани със затлъстяването. Също така е доказано, че консумацията на пресни плодове и зеленчуци увеличава антиоксидантния потенциал на плазма (Cao et al., 1998).

В последните години има засилен научен и обществен интерес върху консумацията на соя, която е богата на белтъци, фитоестрогени, омега-3 и омега-6 ненаситени мастни киселини. Соевият белтък спомага за намаляването на концентрациите на LDL-холестерола и намаляване на риска от сърдечно-съдови заболявания. Съдържащите се в соята фитоестрогени спомагат за намаляване костната загуба и понижават риска от остеопороза при жени в менопауза (Messina, 2014). Въпреки това, ние установихме, че употребата на соя и соеви продукти все още не е популярна сред представената извадка от българската популация (фиг.

1). Над 95% от лицата и в двете изследвани групи рядко или изобщо не консумират соя, като няма статистически значима разлика между тях ( $\chi^2=1.25$ ,  $p>0.05$ ).

Суровите ядки са богати на белтъци, ненаситени мастни киселини, фибри, калий, магнезий, витамин Е, фитостероли. Същевременно те са висококалорийна храна (500 - 700 kkal/100 g продукт) и следва да се консумират в умерени количества. Печените и пържени ядки обикновено са богати на сол и добавени мазнини и не се препоръчват при здравословно хранене. Не беше установена значима разлика при употребата както на печени ( $\chi^2=0.48$ ,  $p>0.05$ ), така и на сурови ( $\chi^2=0.40$ ,  $p>0.05$ ) ядки (фиг. 1).

Традиционно високата консумация на варива както в българската популация, така и при различни народи от средиземноморския регион, се свързва с нормален ИТМ (Romaguera, 2009). Бобовите култури са източник както на растителни белтъчини, така и на фибри. В съответствие с тези данни в нашата извадка се установи, че лицата с ИТМ <30 консумират по-често варива, но разликата не е статистически значима ( $\chi^2=0.72$ ,  $p>0.05$ ) (фиг. 1).



Фигура 2. Връзка между честота на консумация на храни, богати на въглехидрати и ИТМ (данните са представени като процент в съответната група).

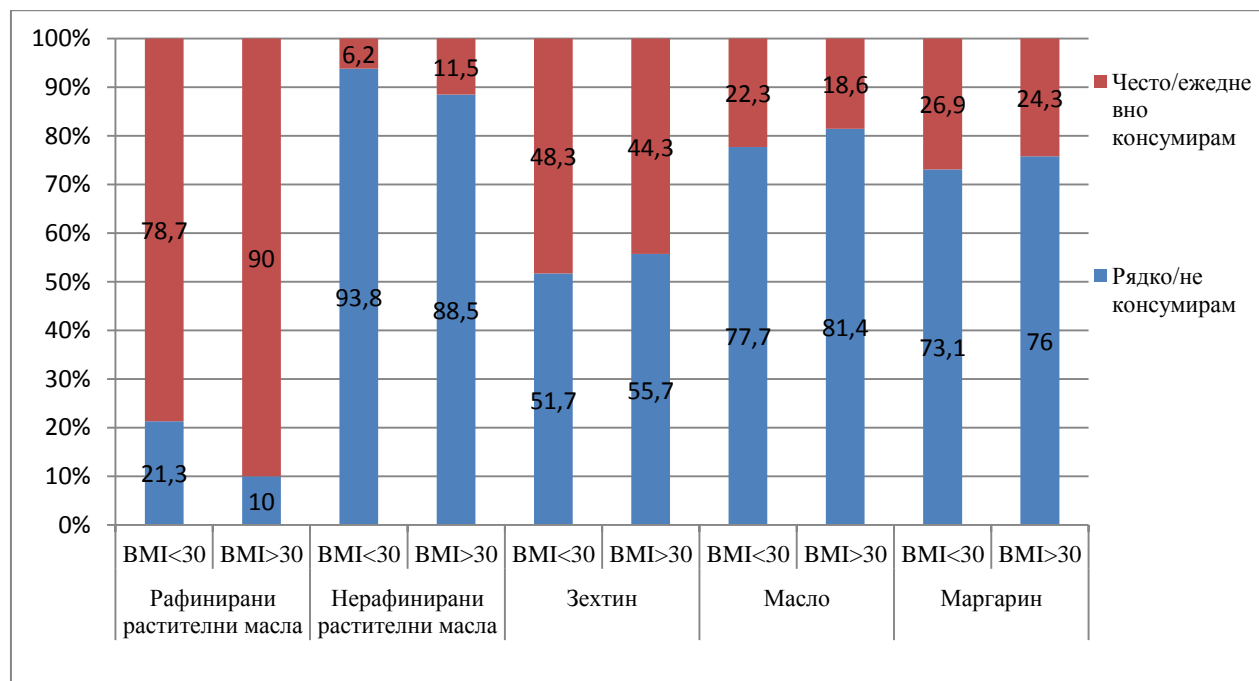
Известно е, че консумацията на пълнозърнести храни и фибри, които са богати на фибри, витамин Е и витамини от В групата и стимулират чревната перисталтика, намалява риска от развитие на затлъстяване, диабет тип 2, метаболитни синдроми (Giugliano et al., 2008; Buckland et al., 2008). Също така, консумацията на пълнозърнести храни увеличава чувството за ситост и се препоръчва за поддържане на здравословно тегло (Liu et al., 2003). По-голямата част от изследваните от нас лица отбелязват честа консумацията на пълнозърнести храни, но не се установи статистически значима разлика ( $\chi^2=0.1$ ,  $p>0.05$ ) между двете изследвани групи. В нашата популация има традиционно висока консумацията на хляб и тестени изделия. Прави впечатление, че бял хляб и тестени изделия се консумират по-често в групата на лицата с ИТМ<30, но разликата не е статистически достоверна ( $\chi^2=0.32$ ,  $p>0.05$ ). В нашето изследване над 75% от всички

изследвани лица посочват честа консумация на картофи, но не се наблюдават статистически значими разлики в двете групи ( $\chi^2=1.17$ ,  $p>0.05$ ).

Консумацията на бял ориз (фиг. 2) води до увеличаване на постпрандиална кръвна глюкоза в сравнение с кафявия ориз. Също така, белият ориз има по-висок гликемичен индекс и консумацията му се асоциира със затлъстяване в различни популации (Kim et al., 2012). В нашето изследване 64.3% от лицата със затлъстяване консумират бял ориз, докато в групата на лицата с ИТМ <30, те са 51% и разликата между двете групи е статистически значима ( $\chi^2=1.92$ ,  $p<0.05$ ).

Установи се интересна зависимост в разрез с масовото разбиране, че консумацията на разнообразни захарни изделия вкл. торти, вафли, пасти е много по-честа в групата с ИТМ <30 ( $\chi^2=6.71$ ,  $p<0.01$ ) (фиг.2). Това може да се обясни с факта, че хората със затлъстяване не са склонни да признават зависимостта си към сладки изделия, дори и при попълване на анонимни анкети. От друга страна, хората, за които не е проблем поддържането на нормално тегло, по-малко се притесняват от употребата на сладки изделия. Подобно наблюдение е установено сред европейски деца и от други изследователи. Авторите посочват, че честотата на приема на сладкиши е по-малка в групата със затлъстяване (Lobstein et al., 2003).

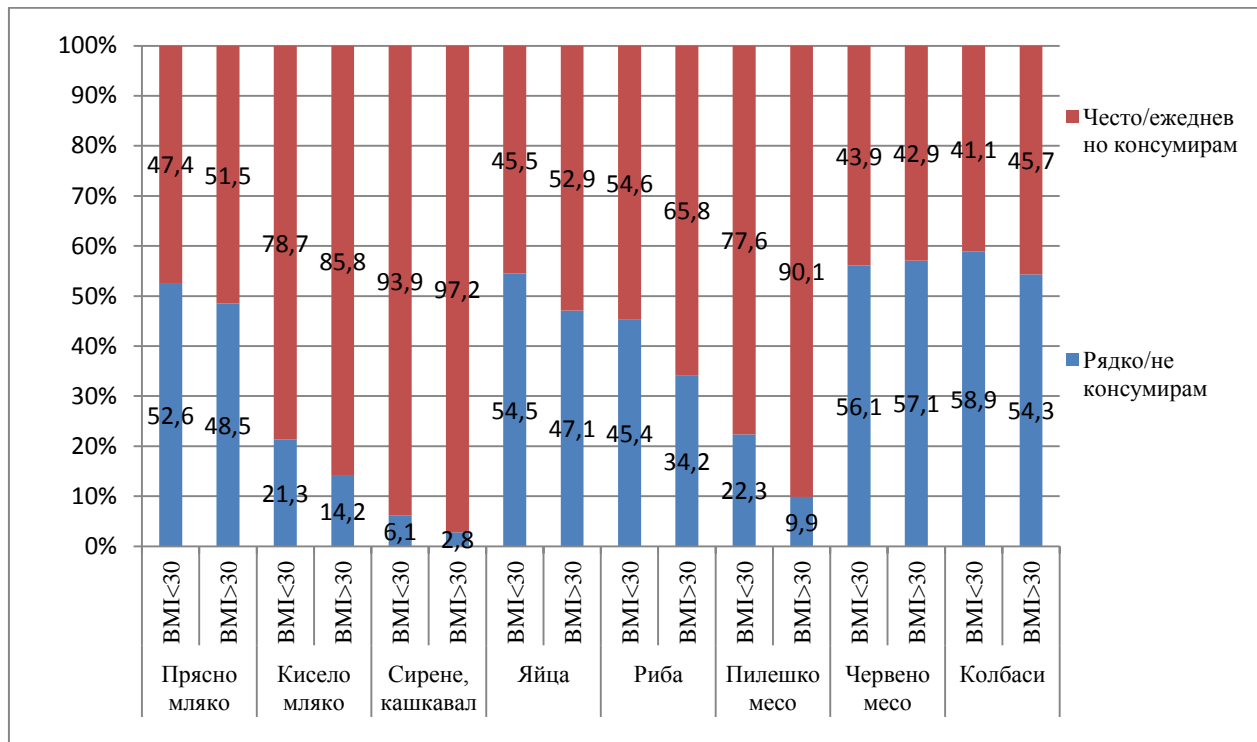
В макаронените изделия нишестето е с променена структура и се усвоява в по-малка степен, отколкото нишестето в други продукти, което прави макароните и спагетите подходящи за включване в храненето при затлъстяване. По-малко от 35% от лицата, участвали в анкетите, посочват честа консумация на макаронени изделия. Не се установи значима разлика между двете изследвани групи ( $\chi^2=1.17$ ,  $p>0.05$ ).



Фигура 3. Връзка между честота на консумация на храни, богати на мазнини и ИТМ (данните са представени като процент в съответната група).

Част от енергийния внос в организма е за сметка на приема на храни богати на мазини. Традиционно използвано в българската популация е рафинираното слънчогледово олио. В групата на лицата с ИТМ ≥30 се установи статически по-честа консумация на рафинирани растителни масла ( $\chi^2=4.43$ ,  $p<0.05$ ). По-голяма част от анкетираните лица посочват рядка употреба на нерафинирани растителни масла, като разликите в двете групи не са статистически значими ( $\chi^2=1.53$ ,  $p>0.05$ ) (фиг.3). Редовната консумацията на зехтин, богат на

полиненаситени мастни киселини, благоприятства ниските нива на LDL-холестерола (Covas, 2007). В нашето изследване по-малко от половината лица докладват употреба на зехтин, като не се наблюдават статистически значими разлики между двете изследвани групи лица ( $\chi^2=0.06$ ,  $p>0.05$ ). Едва около четвърт от лицата в настоящето изследване посочват честа употреба на маргарини, като не се наблюдават статистически значими разлики между двете изследвани групи ( $\chi^2=0.06$ ,  $p>0.05$ ). Също така, и над 75% от анкетираните лица посочват, че рядко консумират масло, като разликите в двете групи не са значими ( $\chi^2=0.37$ ,  $p>0.05$ ).



Фигура 4. Връзка между честота на консумация на храни богати на животински протеини и ИТМ (данните са представени като процент в съответната група)

Млечните продукти са богати на белтъчини, витамини от групата В и калций. Храните от тази група са богати на мазнини, а саламурените сирена съдържат и високи количества сол (Петрова и съавт., 2006). Киселото мляко е особено богато на пробиотици и е традиционна храна за българската популация. Подобно наблюдение установихме и при нашето изследване, в което над 75% от всички анкетираните лица консумират често кисело мляко. Друга традиционна храна за България е бялото саламурено сирене. Над 95% от всички респонденти посочват честа или ежедневна консумация на сирене и кашкавал (фиг.4). При направеното сравнение между двете изследвани групи лица не са установени статистически значими разлики относно консумацията на прясно ( $\chi^2=0.6$ ,  $p>0.05$ ) и кисело ( $\chi^2=0.8$ ,  $p>0.05$ ) мляко, сирене и кашкавал ( $\chi^2=1.8$ ,  $p>0.05$ ).

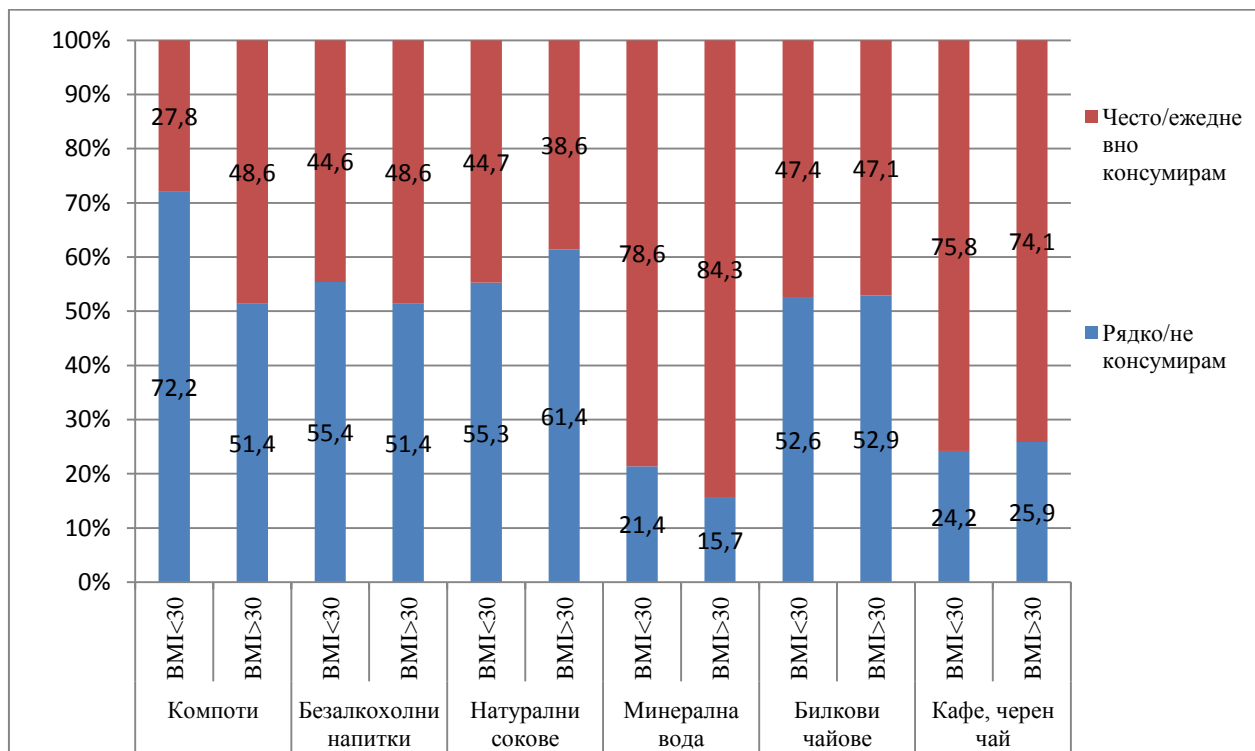
Яйцата също се явяват пълноценен източник на протеини и желязо. В нашето прочуване около половината анкетираните лица докладват честа консумация на яйца, като в двете групи тя е приблизително равностойна, без установени статистически значими разлики ( $\chi^2=0.93$ ,  $p>0.05$ ) между тях (фиг. 4).

Рибата е източник на пълноценни белтъци, витамини А, D и от В групата, лесно усвоимо желязо. Редовната консумацията на риба се свързва с поддържане на оптимално тегло и намаляване честотата на инфарктите. Една от причините е наличието на ейкозапентаенова киселина, която снижава съдържанието на общия холестерол и триглицериди (Maglara-Katsilambrou et al., 1997). Повече от половина изследвани лица

докладват честа консумация на риба, но не се открива статистически значима разлика между двете групи ( $\chi^2=3.12$ ,  $p>0.05$ ) (фиг. 4).

Повечето диетолози препоръчват консумацията на пилешко месо за поддържане на оптимално телесно тегло. Редица изследвания сочат, че при лица, консумиращи храни богати на протеини, нивата на кръвната глюкоза не се увеличават рязко и нивата на инсулин остават относително ниски. Това води до по-продължително чувство за ситост. Групата лица с ИТМ  $\geq 30$  консумира по-често пилешко месо в сравнение с контролната група, но не се наблюдава статистически значима разлика ( $\chi^2=3.5$ ,  $p>0.05$ ) (фиг. 4). Това може да е обусловено както от увеличено количеството на консумираното месо, както и в съчетание с увеличен калориен прием на диетата като цяло.

Червените меса са богат източник на протеини, желязо, витамини от Б групата, но съдържат и наситени мастни киселини, холестерол и прекомерната им употреба се асоциира с повишен риск от сърдечно-съдови заболявания. В нашето изследване по-малко от 45% от всички изследвани лица посочват честа/ежедневна консумация на червени меса (фиг. 4). Не се установи статистически значима разлика между двете изследвани групи лица ( $\chi^2=0.02$ ,  $p>0.05$ ). Известно е, че колбасите са богати на сол, нитрити и наситени мастни киселини и не са препоръчителни за здравословното хранене. По-голямата част от всички изследвани лица посочват, че рядко консумират колбаси, като не се установява статистически значима разлика между двете групи ( $\chi^2=0.38$ ,  $p>0.05$ ) (фиг. 4).

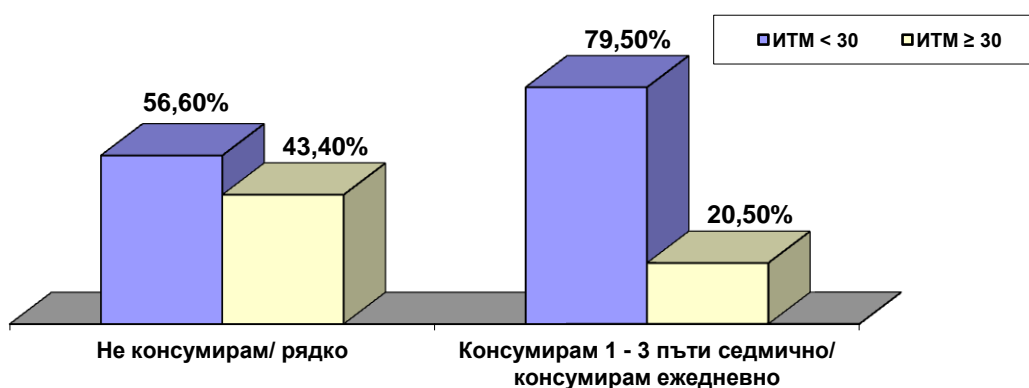


Фигура 5. Връзка между честота на употреба на течности и ИТМ (данните са представени като процент в съответната група).

Поради увеличен прием на калории и увеличен енергиен баланс консумацията на подсладени напитки се явява независим фактор за увеличен ИТМ (Liebman et al., 2003). От друга страна, повишената консумация на безалкохолни напитки често се съпътства и с увеличена консумация на „бърза храна“, което от своя страна индиректно води до увеличен ИТМ.

Подобни изследвания в научната литература показват, че консумацията на компоти, богати на рафинирана захар и на безалкохолни напитки е по-честа в групата на лицата със затлъстяване, като разликата е статистически значима при употребата на компоти ( $\chi^2=8.7$ ,  $p<0.05$ ) (фиг. 5). В проучване на възрастни индивиди се наблюдава значително увеличение на теглото след 10-седмична хранителна програма включваща повишена консумация на напитки, богати на рафинирана захар (Raben et al., 2002).

По-малко от 40% от лицата посочват честа употреба на натурални сокове, като не се откриват значими разлики между двете групи ( $\chi^2=3.5$ ,  $p>0.05$ ) (фиг. 5). По-голямата част от участниците в проучването консумират минерална вода ( $\chi^2=2.4$ ,  $p>0.05$ ). Консумацията на различни билкови чайове е традиционна за българската популация. Близо половината от анкетираните лица посочват редовна консумация на билкови чайове, като разликата между двете изследвани групи не е статистически значима ( $\chi^2=2.5$ ,  $p>0.05$ ). По-голяма част от изследваните лица посочват честа употреба на кафе, като не се наблюдават статистически значими разлики между двете изследвани групи ( $\chi^2=1.0$ ,  $p>0.05$ ) (фиг.5)



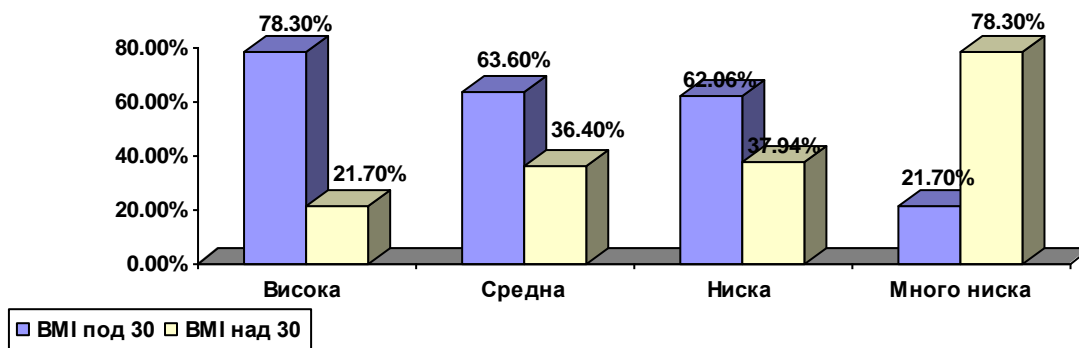
Фигура 6. Връзка между честота на солени храни и ИТМ.

Важен фактор по отношение на храненето е употребата на солени храни (снакс, чипс, осолени ядки) -  $\chi^2 = 6.75$ ,  $p<0.01$ . В противовес с болшинството налични изследвания, употребата на солени храни преобладава не при хора с наднормено тегло, а при тези с нормално телесно тегло (фиг. 6). Подобен резултат от мониторингово изследване е докладван за Гърция, която е близка като култура, начин на хранене и физическа активност на населението у нас (Polikandrioti et al 2009).

#### 2.4. Влияние на физическата активност върху изявата на затлъстяване.

Физическата активност на изследваните лица е определяна по преценката на респондентите чрез попълване на анкетни карти. За целта са използвани следните критерии:

- Много ниска активност –заседнал начин на живот; работа без движение.
- Ниска активност – ходене пеш по-малко от 4 часа седмично.
- Средна активност – леки до умерени физически натоварвания повече от 4 часа седмично.
- Висока – активни тренировки повече от 4 часа седмично.



Фигура 7. Физическа активност на изследваните лица. Данните са представени като % във всяка група със съответна физическа активност.

Намалената физическа активност и заседналият начин на живот са значителни фактори за изявата на затлъстяване. Нивото на физическа активност оказва значимо влияние върху ИТМ  $\chi^2 = 20,94$  ( $p < 0,001$ ) (фиг.7). Получените резултати потвърждават недвусмислено водещата роля на физическата активност за поддържане на нормален ИТМ. Това се потвърждава и от многобройни предходни изследвания на други автори в различни европейски популации, както при мъже, така и при жени (Lahmann, 2000; Wagner, 2001).

Видът на физическа активност също има важна роля. 78.95% от хората, ангажирани с интензивни двигателни упражнения като фитнес или аеробика са с ИТМ  $< 30$  ( $\chi^2 = 6.71$ ,  $p < 0.01$ ). Тези резултати потвърждават данните от подобни проучвания, според които за поддържане на здравословен ИТМ са необходими енергични физически упражнения минимум 3 пъти седмично в продължение на най-малко 30 минути (Andersen, et al., 1999). Други сходни изследвания показват, че дори слабо интензивни физически упражнения (ходене пеш повече от 4 часа/седмица) оказват положителен ефект върху телесното тегло както при мъжете, така и при жените. При това разликата е статистически значима  $\chi^2 = 13.55$ ,  $p < 0.001$ . (Littman, et al., 2005). При нашето изследване 68,30% от респодентите, които посочват, че имат дори слабо интензивни физически упражнения, са с ИТМ  $< 30$ .

#### Изводи

- Социо-демографските фактори оказват влияние върху изявата на затлъстяване:
- Високото образование, женския пол, младата възраст и трудовата заетост корелират позитивно със здравословното тегло.
- Консумацията на алкохол не оказва влияние върху ИТМ.
- Факторът тютюнопушене корелира с висок ИТМ.
- Консумацията на пресни плодове и зеленчуци оказва благоприятен ефект върху телесното тегло.
- Консумацията на рафинирани масла, бял ориз и компоти, богати на захар корелира с изявата на затлъстяване.
- В противовес с данните от литературата консумацията на торти и вафли е по-голяма в групата с ИТМ  $< 30$ .
- Степента на физическата активност е важен фактор за поддържане на здравословно тегло и ИТМ  $< 30$ .

### 3. Влияние на подобрани пет единични еднонуклеотидни полиморфизми върху изявата на биохимични и клинични параметри на затлъстяването и метаболитния синдром.

#### 3.1. Определяне на алелните и генотипните честоти на петте единични нуклеотидни полиморфизма в извадка от 182 изследвани лица в българската популация.

Една от задачите на настоящето изследване е да се установи генотипното и алелното разпределение на изследваните полиморфизми в извадка от 182 лица от българската популация. С помощта на TaqMan SNP техника на Real Time PCR System е извършен SNP анализ на петте подобрани еднонуклеотидни полиморфизма - rs9939609, rs1501299, rs822391, rs16928662 и rs1800795. Резултатите са представени в таблица 12.

Таблица 12. Генотипни и алелни честоти на пет подобрани SNP-та в българска извадка от 182-ма доброволци.

SNP	Генотип	Брой лица	Генотипна честота	Алелна честота
FTO rs9939609	T/T	69	0.38	T=0.61
	T/A	83	0.46	
	A/A	30	0.16	A=0.39
AdipoQ rs1501299*	G/G	92	0.51	G= 0.69
	G/T	66	0.36	
	T/T	23	0.13	T=0.31
AdipoQ rs822391	T/T	124	0.68	T=0.81
	C/T	47	0.26	
	C/C	11	0.06	C=0.19
AdipoR2 rs16928662	T/T	178	0.98	T=0.99
	G/T	3	0.01	
	G/G	1	0.01	G=0.01
IL 6 rs1800795	G/G	89	0.49	G=0.70
	G/C	76	0.42	
	C/C	17	0.09	C=0.30

\* едно лице не беше генотипирано по rs1501299

В настоящето изследване е направено сравнение между установените генотипни честоти на петте SNPs при изследваните български доброволци, представители на европейската раса и публикуваните в различни литературни източници, вкл. и в базата данни “International HapMap Project” (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) сведения за генотипните честоти на същите полиморфизми при други кохорти, представители на европейската раса и на монголоидната раса.

Генотипното разпределение по отношение на rs9939609 в изследваната група от 182 лица е 0.38 за TT, 0.46 за AT и 0.16 за AA. Генотипното разпределение е сходно с това в датската популация, докато при сравнение с други популации от европейски произход има малки различия. Според Loos & Giles (2014), в популации с европейски произход приблизително 43% от населението носи рисков алел с малки вариации в генотипните честоти. В популациите от азиатски произход се наблюдава изключително ниска честота на минорния A алел - 0.12–0.20 (Li et al., 2007; <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Получените резултати са първите данни за генотипното разпределение по отношение на единичния нуклеотиден полиморфизъм rs9939609 в българската популация.



Генотипното разпределение по отношение на rs1501299 при всички 182 лица, участващи в проведеното изследване е: 0.51 за G/T, 0.36 за T/T и 0.13 за G/G (таблица 12). Генотипното разпределение е близко до това на лицата с европейски произход в САЩ. Не се откриват съществени различия в генотипното разпределение между различните популации.

Генотипното разпределение по отношение на rs822391 при всички 182 изследвани лица е: 0.68 за G/T, 0.26 за T/T и 0.06 за G/G (таблица 12). Генотипното разпределение в нашата извадка е подобно на това при популации с европейски произход в САЩ. Честотата на С алела в азиатските популации е изключително ниска. Получените резултати са първите данни за генотипното разпределение по отношение на единичния нуклеотиден полиморфизъм rs822391 в гена за адипонектин в българската популация.

Генотипното разпределение по отношение на rs16928662 при всички 182 изследвани лица е: 0.98 TT, 0.01 GT и 0.01 GG (таблица 12). Генотипното разпределение на този полиморфизъм е сходно с това на други европейски популации и се различава от това при азиатските популации. При всички изследвани лица честотата на GG генотипа е изключително рядка. Получените резултати са първите данни за генотипното разпределение по отношение на единичния нуклеотиден полиморфизъм rs16928662 в гена за рецептора за адипонектин в българската популация.

Генотипното разпределение по отношение на rs16928662 при всички 182 изследвани лица е: 0.49 GG, 0.42 GC и 0.09 CC (таблица 12) и е в потвърждение на генотипното изследване на Димов (2012) за българската популация при здрава кохорта от региона на Стара Загора. Генотипното разпределение на този полиморфизъм е различно в различните популации, като значителни разлики има и сред тези от европейски произход. Честотата на G алела в азиатските популации е изключително ниска. Сравнявайки получените от нас генотипни и алелни честоти, установихме сходно разпределение и с испанската популация

Получените за българите данни за генотипните и алелни честоти при петте SNPs съответстват на данните от изследванията при други кохорти, представители на европейската раса от Европа и САЩ.

### **3.2. Определяне на алелните честоти на петте единични нуклеотидни полиморфизми в българската извадка от 182 изследвани лица, разделени в две групи според ИТМ.**

Изследваните от нас 182 лица са разделени в две групи според изчисления им ИТМ. В едната група са включени 70 лица, които са с ИТМ  $\geq 30$ , а във втората - 112 лица, които са с ИТМ  $< 30$ . Първата група беше определена като група на лица със затлъстяване, а втората група - контролна на първата. В групата на лицата със затлъстяване 31 лица са с I-ва степен на затлъстяване (ИТМ 30-34,9  $\text{kg}/\text{m}^2$ ); 23 от лицата са със II-ра степен на затлъстяване (35-39,9  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) и 16 индивида са с ИТМ  $> 40$ . Определените честоти на срещане на отделните алели и генотипове за петте единични нуклеотидни полиморфизма при двете изследвани групи са представени в таблица 13.

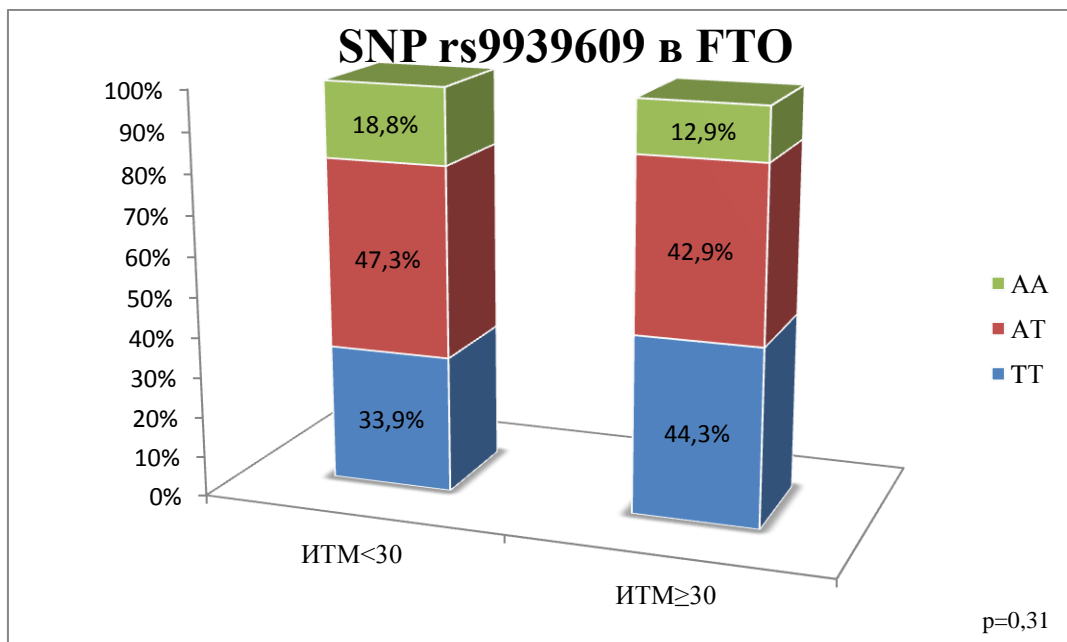
Таблица 13. Алелни честоти в групите на лица с ИТМ<30 и в група на лица с ИТМ>30 за полиморфизмите rs9939609 в гена за FTO, rs1501299 и rs822391 в гена за адипонекин, rs16928662 в гена за рецептора за адипонектин и rs1800795 в гена за IL-6

SNP/Алел	Лица с ИТМ≥30 (N=70)	Лица с ИТМ<30 (N=112)	OR (95% CI)	р-стойност
rs9939609 T A	0.66 0.34	0.58 0.42	1,38 (0,89 – 2,15)	0,145
rs1501299 G T	0.71 0.29	0.68 0.32	1,14 (0,72 – 1,81)	0,566
rs822391 T C	0.76 0.24	0.84 0.16	0,95 (0,56 – 1,63)	0,855
rs16928662 T G	0.98 0.02	0.99 0.01	0,41 (0,07 – 2,49)	0,334
rs1800795 G C	0.69 0.31	0.73 0.27	0,83 (0,52 – 1,31)	0,419

При сравняване на генотипните честоти на контролната група и на групата на лицата с ИТМ≥30 не се наблюдават статистически значими разлики по отношение на изследваните полиморфизми.

**3.2.1. Изследване на зависимостта между наличието на определен генотип на единичния нуклеотиден полиморфизъм rs9939609 в FTO гена и някои биохимични и клинични показатели за затлъстяване и метаболитен синдром.**

В настоящето изследване е представено и сравнено разпределението по генотипове в двете изследвани групи (лица ИТМ≥30 и лица с ИТМ<30) в три модела: кодминантен, доминантен и рецесивен за единичния нуклеотиден полиморфизъм SNP rs9939609. Резултатите са представени на фигура 8 и в таблица 14.

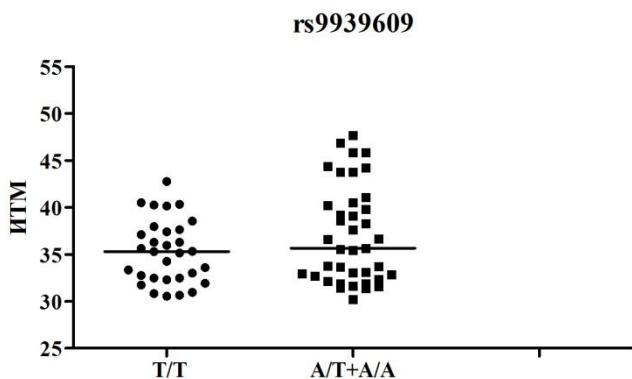


Фигура 8. Определяне на генотипните честоти по отношение на еднуклеотидния полиморфизъм rs9939609 на лица с ИТМ < 30 и лица с ИТМ ≥ 30

Таблица 14. Генетични модели на SNP rs9939609 в FTO гена.

Модел	Генотип	Лица ИТМ < 30 N=112	Лица ИТМ ≥ 30 N=70	OR (95% CI)	p-стойност
Кодоминантен	Т/Т	38 (33.9%)	31 (44.3%)	1.00	0.27 0.16
	А/Т	53 (47.3%)	30 (42.9%)	1.44 (0.75-2.77)	
	А/А	21 (18.8%)	9 (12.9%)	1.90 (0.76-4.75)	
Доминантен	Т/Т	38 (33.9%)	31 (44.3%)	1.00	0.16
А/Т+А/А	74 (66.1%)	39 (55.7%)	1.55 (0.84-2.86)		
Рецесивен	Т/Т+А/Т	91 (81.2%)	61 (87.1%)	1.00	0.29
А/А	21 (18.8%)	9 (12.9%)	1.56 (0.67-3.64)		

Не се наблюдава статистически значима разлика при сравняване на различните генетични модели между двете изследвани групи лица.



Фиг. 9. Асоциация между генотипните честоти в rs9939609 полиморфизъм в гена за FTO в двете изследвани групи лица.

Според Loos & Giles (2014) носителството на рисков алел в FTO е асоцииран с 0.39 kg/m<sup>2</sup> по-висок ИТМ. В съответствие и с други литературните данни (Frayling et al., 2007) се наблюдава, че носителството на рисковия А алел е свързано с увеличен ИТМ (фиг.9). В групата на лицата с ИТМ >30 носителите на А/А+А/Т генотипа имат ИТМ=37.11±0.83, а носителите на Т/Т генотип съответно ИТМ=35.28 ± 0.60, като разликата между двете изследвани групи не е статистически значима (p=0.07).

Таблица 15 представя асоциациите на отделните генотипове на rs9939609 полиморфизма с изследваните при всички 182 доброволци нива на глюкоза, триацилглицероли, общ и HDL холестерол, систолно и диастолно кръвно налягане, съотношение талия/ханш.

Таблица 15. Асоциация на отделните генотипове на полиморфизма rs9939609 с някои клинични показатели в двете изследвани групи: лица с ИТМ<30 и лица с ИТМ≥30.

Показател	Лица с ИТМ<30 (N=112)				Лица с ИТМ≥30 (N=70)			
	ТТ (n=38)	АА (n=21)	АТ (n=53)	P	ТТ (n=31)	АА (n=9)	АТ (n=30)	P
Глюкоза (mmol/l)	4.39±0.13	4.51±0.12	4.56±0.1	0.53	6.42±0.48	5.18±0.42	4.98±0.14	0.012
Триацилглицероли (mmol/l)	0.94±0.08	0.87±0.09	1.36±0.25	0.20	1.75±0.18	2.73±0.55	1.55±0.09	0.006
Общ холестерол (mmol/l)	4.84±0.19	4.32±0.2	4.9±0.16	0.13	5.28±0.25	5.05±0.38	5.21±0.18	0.88
HDL холестерол (mmol/l)	1.37±0.07	1.38±0.1	1.4±0.05	0.94	1.24±0.06	1.2±0.07	1.25±0.07	0.9
Систолно кръвно налягане (mm Hg)	110.79±2.3	112.21±2.81	112.81±2.15	0.81	131.56±5.4	132.11±5.13	130.41±4.26	0.98
Диастолно кръвно налягане (mm Hg)	76.57±1.84	77.83±2.57	77.95±1.41	0.82	89.29±2.62	92.5±5.65	88.93±2.7	0.81
Съотношение талия/ханш	0.78±0.01	0.77±0.02	0.79±0.01	0.76	0.92±0.02	0.92±0.05	0.92±0.02	0.99

Получените резултати показват, че в групата на лицата с ИТМ ≥30 носителите на А/А генотипа имат значително по-високи стойности на триацилглицероли (p=0.006). Тези резултати потвърждават данните от

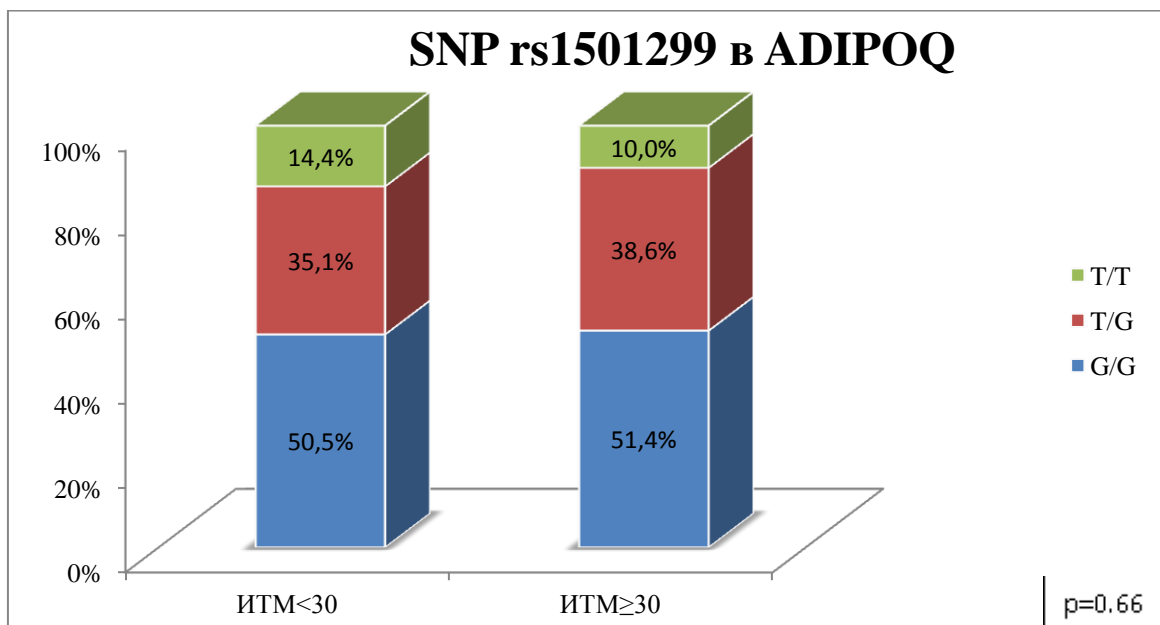
научната литература, че носителството на минорния А алел се асоциира с дислипедимия и увеличени плазмени нива на ТАГ при лица със затлъстяване (Fall et al. 2013; Freathy et al., 2008). Същевременно в групата на лицата с ИТМ <30, не се установява подобна тенденция. По отношение на нивата на общ и HDL холестерол, резултатите в настоящето изследване не откриват значими разлики във връзка с носителството на рисковия А алел.

В научната литература има данни, че носителството на хомозиготния АА генотип се асоциира и с по-висок риск за артериална хипертония (Pausova et al. 2009). В нашето изследване не откриваме подобна зависимост въпреки, че носителите на АА алела в групата със затлъстяване имат по-високи стойности на диастолно кръвно налягане, но разликата не е статистически значима (таблица 15). По отношение на съотношение талия/ханш не се наблюдават различия между двете групи.

Получените данни очертават някои сходни тенденции за ролята на SNP rs9939609 в изявата на затлъстяване и свързани метаболитни нарушения в извадка от българската популация и на други популации от кавказки тип. За момента не се доказва по ясен и недвусмислен начин ролята на този полиморфизъм за затлъстяването и изявата на метаболитен синдром. Една от възможните причини е сравнително малкия брой изследвани лица, както и високата хетерогенност в изследваната ивадка от българската популация.

### 3.2.2. Изследване на зависимостта между наличието на определен генотип на единичния нуклеотиден полиморфизъм rs1501299 в гена за адипонектин и някои биохимични и клинични показатели за затлъстяване и метаболитен синдром

В настоящето изследване е представено и сравнено разпределението по генотипове в двете изследвани групи лица (ИТМ $\geq$ 30 и лица с ИТМ<30) в три модела: кодоминантен, доминантен и рецесивен за единичния нуклеотиден полиморфизъм SNP rs9939609. Резултатите са представени на фигура 10 и в таблица 16.



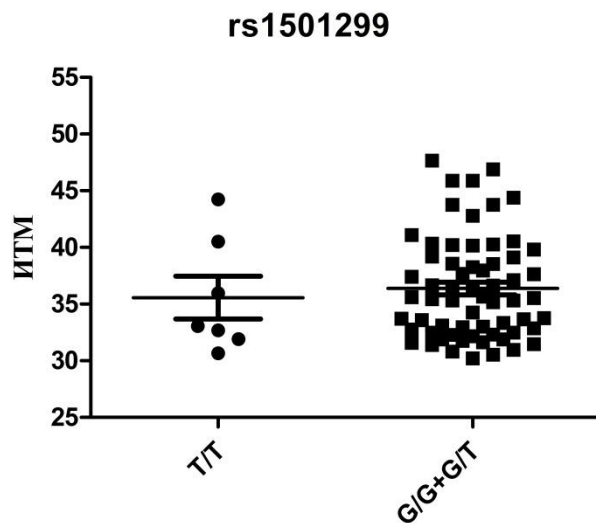
Фигура 10. Определяне на генотипните честоти по отношение на еднуклеотидния полиморфизъм rs1501299 в гена за адипонектин на лица с ИТМ<30 и лица с ИТМ $\geq$ 30.

Генотипното разпределение не се отклонява от уравнението на Харди-Вайнберг ( $\chi^2=0.896$ ,  $p=0.05$ ). Не се наблюдава статистически значима разлика при сравняване на различните генетични модели между двете изследвани групи лица

Таблица 16. Генетични модели на SNP rs1501299 в гена за адипонектин на лица с ИТМ<30 и лица с ИТМ≥30.

Модел	Генотип	Лица ИТМ<30	Лица ИТМ≥30	OR (95% CI)	P-стойност
Кодоминантен	G/G	56 (50.5%)	36 (51.4%)	1.00	0.82
	T/G	39 (35.1%)	27 (38.6%)	1.08 (0.56-2.05)	
	T/T	16 (14.4%)	7 (10%)	0.68 (0.25-1.82)	
Доминантен	G/G	56 (50.5%)	36 (51.4%)	1.00	0.9
	T/G-T/T	55 (49.5%)	34 (48.6%)	0.96 (0.53-1.75)	
Рецесивен	G/G-T/G	95 (85.6%)	63 (90%)	1.00	0.38
	T/T	16 (14.4%)	7 (10%)	0.66 (0.26-1.69)	

Според изследване на Menzagi et al. (2002) носителството на G алела се асоциира с с увеличен ИТМ. В нашето изследване се установи, че в групата на лицата с ИТМ>30 носителите на G/G+G/T генотипа имат ИТМ=36.38 ± 0.56 , а носителите на T/T генотип съответно ИТМ=35. 57 ± 1.89 като разликата между двете изследвани групи не е статистически значима  $p=0.66$ . Резултатите са представени на фигура 11.



Фиг. 11. Асоциация между генотипните честоти в rs1501299 полиморфизъм в гена за адипонектин в двете изследвани групи лица.

Таблица 17 представя асоциациите на отделните генотипове на rs1501299 полиморфизма с изследваните при всички 182 доброволци нива на глюкоза, триацилглицероли, общ и HDL холестерол, систолно и диастолно кръвно налягане, съотношение талия и ханш.

Таблица 17. Асоциация на отделните генотипове на SNP rs1501299 с някои клинични показатели в двете изследвани групи: лица с ИТМ<30 и лица с ИТМ≥30.

Показател	Лица с ИТМ<30 (N=112)				Лица с ИТМ≥30 (N=70)			
	GG (n = 56)	TT (n = 16)	GT (n = 39)	P	GG (n = 36)	TT (n = 7)	GT (n = 27)	P
Глюкоза (mmol/l)	4.43±0.07	4.51±0.15	4.55±0.16	0.73	6.02±0.44	5.17±0.28	5.27±0.17	0.28
Триацилглицероли (mmol/l)	0.95±0.07	0.91±0.11	1.46±0.34	0.14	1.66±0.12	1.65±0.55	2.00±0.23	0.39
Общ холестерол (mmol/l)	4.63±0.15	4.85±0.27	4.87±0.18	0.54	5.22±0.21	4.42±0.39	5.44±0.2	0.12
HDL холестерол (mmol/l)	1.35±0.05	1.55±0.13	1.38±0.06	0.24	1.26±0.06	1.14±0.12	1.25±0.06	0.66
Систолно кръвно налягане (mm Hg)	112.22±2.06	103.59±2.99	114.71±2.12	0.03	136.85±4.66	116.5±5.62	127.21±4.3	0.09
Диастолно кръвно налягане (mm Hg)	77.88±1.56	73.19±2.58	78.28±1.53	0.25	91.74±2.27	82.07±4.41	88.56±3.23	0.26
Талия/ханш	0.79 ±0.01	0.78 ±0.02	0.78±0.02	0.80	0.93±0.02	0.87±0.03	0.92±0.02	0.36

Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка

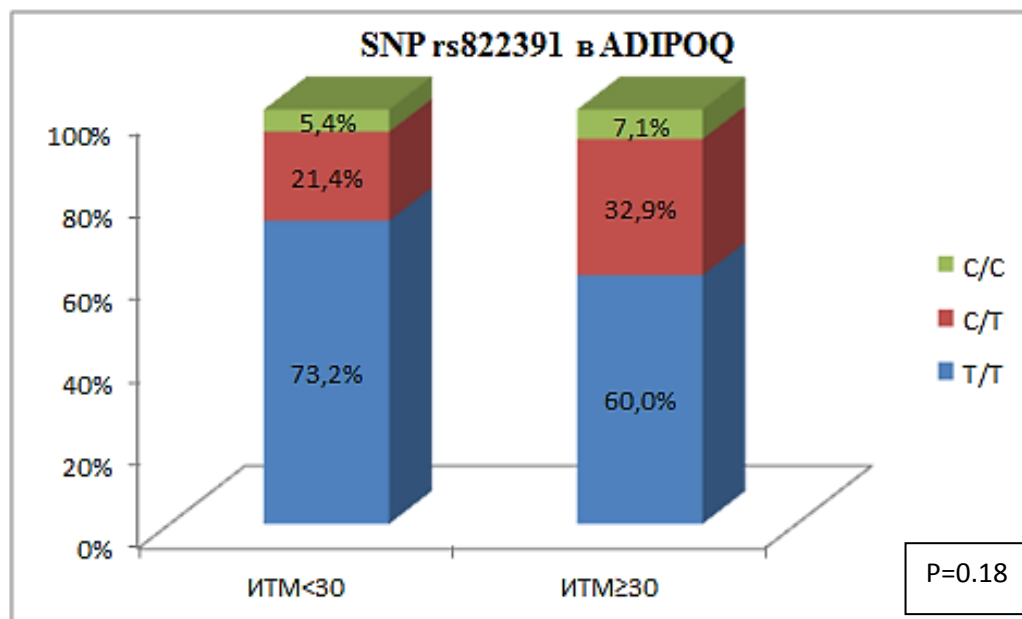
Понижените нива на адипонектин са независим рисков фактор за развитие на затлъстяване, метаболитен синдром и диабет тип 2 (Nigro et al., 2014). Редица изследвания показват, че при носителите на G/G генотип концентрацията на циркулиращия адипонектин е по-ниска в сравнение с G/T и T/T носителите. Това се установява както при японската, така и при испанската и шведската популации (Hara et al., 2002; Gonzales-Sanchez et al., 2005; Ukkola et al., 2003).

В нашето изследване се установи, че при всички лица носителите на G/T генотип имат по-високи стойности на ТАГ - 1.68±0.22 в сравнение с T/T и G/G носителите - 1.21±0.07, p=0.047. В групата на лицата с ИТМ ≥30 носителите на G/G генотип имат по-високи стойности на систолното кръвно налягане, като разликите не са статистически значими. В групата на лицата с ИТМ <30 носителите на G алела (G/G+T/G) имат сигнификантно по-високи стойности на систолно кръвно налягане 113.24±1.49 в сравнение с T/T носителите - 103.59±2.99, p=0.013. Тези резултати са сходни с изследване в шведската популация, при което носителите на G алела в групата със затлъстяване имат повишени стойности на артериалното кръвно налягане (Ukkola et al., 2003). Също така е сходно и с изследване в италианска популация, при което се установява, че за носителите на G/G генотип съществува по-висок риск от инфаркт на миокарда, в сравнение с T/T носителите (Chiodini et al., 2010). Същевременно ниските серумни нива на адипонектин са асоциирани с артериална хипертония (Shankar et al., 2008). В групата на лицата с ИТМ ≥30 носителите G/G генотипа имат по-високи стойности на глюкоза в сравнение с G/T и T/T, като разликите не са сигнификантни. В групата на лицата с ИТМ≥30, носителите на G алела (G/G+T/G) имат по-високи стойности на общия холестерол, в сравнение с T/T носителите: 5.31±0.13 vs 4.42±0.39, като разликата е близка до сигнификантаната (p=0.056). Този резултат е сходен с изследване в китайската популация, които показват, че носителите на G/G генотипа имат повишени стойности на общ холестерол (Li et al., 2012).

В научната литература съществуват противоречиви резултати относно носителството на този полиморфизъм, изявата на затлъстяване и свързани клинични показатели. По-голямата част от даните в литературата се обединяват около тезата, че носителството на G алела се асоциира с дислипидемия, диабет тип 2, увеличено кръвно налягане, повишен риск от изявата на метаболитен синдром (Menzagi et al., 2007; Li et al., 2013). Резултатите от настоящето изследване не доказват ролята на този полиморфизъм, но показват тенденция носителството на G алела да се явява рисков фактор за отклонение в някои клинични показатели свързани със затлъстяване и метаболитен синдром в изследваната извадка от българската популация. При следващи проучвания би могло да се установи връзка между плазмените нива на адипонектин на лица, носители на различните генотипи на изследвания полиморфизъм в по-голяма извадка.

**3.2.3. Изследване на зависимостта между наличието на определен генотип на единичния нуклеотиден полиморфизъм rs822391 SNP и някои биохимични и клинични показатели за затлъстяване и метаболитен синдром.**

В настоящето изследване е представено и сравнено разпределението по генотипове в двете изследвани групи (лица с ИТМ  $\geq 30$  и лица с ИТМ  $< 30$ ) в три модела: кодоминантен, доминантен и рецесивен за единичния нуклеотиден полиморфизъм SNP rs822391 в гена за адипонектин. Резултатите са представени на фигура 12 и в таблица 18.



Фигура 12. Определяне на генотипните честоти по отношение на еднуклеотидния полиморфизъм rs822391 в гена за адипонектин на лица с ИТМ  $< 30$  и лица с ИТМ  $\geq 30$ .

Не се наблюдават статистически значими разлики между генотипните честоти в двете изследвани групи. Наблюдава се тенденция T/T генотипът преобладава в групата на лица с ИТМ  $< 30$ , докато C/T в групата с ИТМ  $\geq 30$ . Не се наблюдава статистически значима разлика при сравняване на различните генетични модели между двете изследвани групи лица

Таблица 18. Генетични модели на при SNP rs822391 в гена за адипонектин на лица с ИТМ  $< 30$  и лица с ИТМ  $\geq 30$ .

rs822391 в ADIPOQ Модел	генотип	лица ИТМ < 30	лица ИТМ $\geq 30$	OR (95% CI)	P-стойност
Кодоминантен	T/T	82 (73.2%)	42 (60%)	1.00	0.07 0.51
	C/T	24 (21.4%)	23 (32.9%)	1.87 (0.95-3.70)	
	C/C	6 (5.4%)	5 (7.1%)	1.63 (0.47-5.64)	
Доминантен	T/T	82 (73.2%)	42 (60%)	1.00	0.064
	C/T-C/C	30 (26.8%)	28 (40%)	1.82 (0.97-3.44)	
Рецесивен	T/T-C/T	106 (94.6%)	65 (92.9%)	1.00	0.63
	C/C	6 (5.4%)	5 (7.1%)	1.36 (0.40-4.63)	



Таблица 19 представя асоциациите на отделните генотипове на rs822391 полиморфизма с изследваните при всички 182 доброволци нива на глюкоза, триацилглицероли, общ и HDL холестерол, систолно и диастолно кръвно налягане, съотношение талия и ханш.

Таблица 19. Асоциация на отделните генотипове на SNP rs822391 с отделни клинични показатели в двете изследвани групи: лица с ИТМ<30 и лица с ИТМ≥30.

Показател	Лица с ИТМ<30 (N=112)				Лица с ИТМ>30 (N=70)			
	ТТ (n = 82)	СС (n = 6)	ТС (n = 24)	P	ТТ (n = 42)	СС (n = 5)	ТС (n = 23)	P
Глюкоза (mmol/l)	4.43±0.08	4.58±0.32	4.68±0.14	0.33	5.89±0.37	6.05±0.51	5.11±0.25	0.3
Триацилглицероли (mmol/l)	1.17±0.17	1.09±0.20	0.98±0.09	0.83	1.87±0.18	1.78±0.39	1.65±0.11	0.69
Общ холестерол (mmol/l)	4.84±0.13	4.54±0.66	4.57±0.2	0.53	5.12±0.2	5.49±0.38	5.36±0.22	0.64
HDL холестерол (mmol/l)	1.41±0.05	1.06±0.14	1.38±0.07	0.11	1.26±0.05	1.29±0.18	1.2±0.07	0.69
Систолно кръвно налягане (mm Hg)	111.1±1.66	122.92±5.86	112.42±2.52	0.16	133.61±4.54	126.88±3.12	127.41±3.85	0.61
Диастолно кръвно налягане (mm Hg)	76.76±1.21	82.08±5.34	78.71±2.07	0.42	90.63 ±2.48	88.75±5.54	87.74±2.69	0.75
Съотношение талия/ханш	0.78±0.01	0.86±0.02	0.78±0.02	0.074	0.93±0.02	0.96±0.02	0.89±0.02	0.35

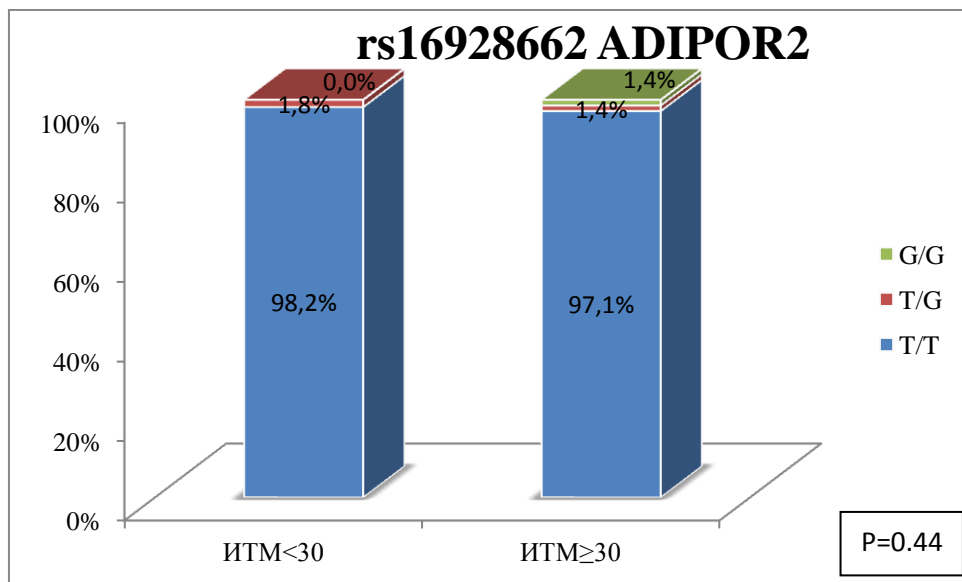
Данните са представени като средна стойност±стандартна грешка

В групата на лицата с ИТМ<30 носителите на Т алела (Т/Т+С/Т) имат значително по-високи стойности за HDL холестерол: 1.40±0.04, в сравнение с С/С носителите - 1.06±0.14, p=0.04. В контролната група носителите на Т алела (Т/Т+С/Т) имат сигнификантно по-ниско съотношение талия/ханш 0.78±0.01, докато С/С носителите 0.86±0.02, p=0.02. В групата на лицата с ИТМ ≥30 също се наблюдават сходни резултати, но без статистическа значимост. Носителите на Т/Т генотип в корейската популация се асоциират с повишен риск от сърдечно-съдови заболявания и инфаркт (Cheong et al., 2011). Доколкото затлъстяването, дислипидемията и повишеното артериално налягане се явяват рискови фактори за сърдечно съдови заболявания и инфаркти, нашите резултати не потвърждават горното изследване. Разбира се, това може да се дължи на различията ни с азиатската популация.

Понижените нива на адипонектин са независим рисков фактор за развитие на затлъстяване, метаболитен синдром и диабет тип 2 (Nigro et al., 2014). Изследване сред американски мъже от европейски произход не установява асоциация на този полиморфизъм с циркулиращите нива на адипонектин (Dhillon et al. 2011).

### 3.2.4. Изследване на зависимост между наличието на определен генотип на единичния нуклеотиден полиморфизъм rs16928662 SNP и някои биохимични и клинични показатели за затлъстяване и метаболитен синдром.

В настоящето изследване е представено и сравнено разпределението по генотипове в двете изследвани групи (лица с ИТМ ≥30 и лица с ИТМ <30) в три модела: кодоминантен, доминантен и рецесивен за единичния нуклеотиден полиморфизъм SNP rs16928662 в гена за рецептора за адипонектин. Резултатите са представени на фигура 13 и в таблица 20.



Фигура 13. Генотипни честоти по отношение на SNP rs16928662 в ADIPO R2 гена на лица с ИТМ<30 и лица с ИТМ≥30, p=0.44

Не се наблюдава статистически значима разлика при сравняване на различните генетични модели между двете изследвани групи лица

Таблица 20. Генетични модели на при SNP rs16928662 в гена за адипонектин на лица с ИТМ<30 и лица с ИТМ≥30.

Модел	Генотип	Лица ИТМ<30	Лица ИТМ≥30	OR (95% CI)	P-value
Кодоминантен	T/T	110 (98.2%)	68 (97.1%)	1.00	0.38
	T/G	2 (1.8%)	1 (1.4%)	0.81 (0.07-9.09)	
	G/G	0 (0%)	1 (1.4%)	-	
Доминантен	T/T	110 (98.2%)	68 (97.1%)	1.00	0.64
	T/G-G/G	2 (1.8%)	2 (2.9%)	1.62 (0.22-11.75)	
Рецесивен	T/T-T/G	112 (100%)	69 (98.6%)	1.00	0.17
	G/G	0 (0%)	1 (1.4%)	-	

Таблица 21 представя асоциациите на отделните генотипове на rs16928662 полиморфизма с изследваните при всички 182 доброволци нива на глюкоза, триацилглицероли, общ и HDL холестерол, систолно и диастолно кръвно налягане, съотношение талия и ханш.

Таблица 21. Разпределение на генотипите честоти на rs16928662 полиморфизма на лица с ИТМ<30 и ИТМ≥30 според различни клинични показатели.

Показател	Лица с ИТМ<30 (N=112)			Лица с ИТМ>30 (N=70)			
	ТТ (n=110)	TG (n=2)	P	ТТ (n=68)	GG (n=1)	TG (n=1)	P
Глюкоза (mmol/l)	4.49±0.07	4.77±0.65	0.59	5.67±0.25	4.79±0	4.58±0	0.79
Тригацилглицероли (mmol/l)	1.13±0.13	1.15±0.12	0.98	1.8±0.12	1.49±0	1.96±0	0.94
Общ холестерол (mmol/l)	4.77±0.11	4.49±0.38	0.73	5.2±0.14	6.34±0	5.7±0	0.59
HDL холестерол (mmol/l)	1.39±0.04	1.52±0.04	0.63	1.24±0.04	1.31±0	1.18±0	0.96
Систолно кръвно налягане (mm Hg)	111.94±1.4	116.25±6.25	0.68	130.59±3.07	175±0	125±0	0.22
Диастолно кръвно налягане (mm Hg)	77.32±1.04	85.0±5.0	0.32	89.57±1.81	101±0	77.5±0	0.54
Съотношение талия/ханш	0.78±0.01	0.92±0.13	0.03	0.92±0.01	1.03±0	0.94±0	0.58

Данните са представени като средна стойност±стандартна грешка

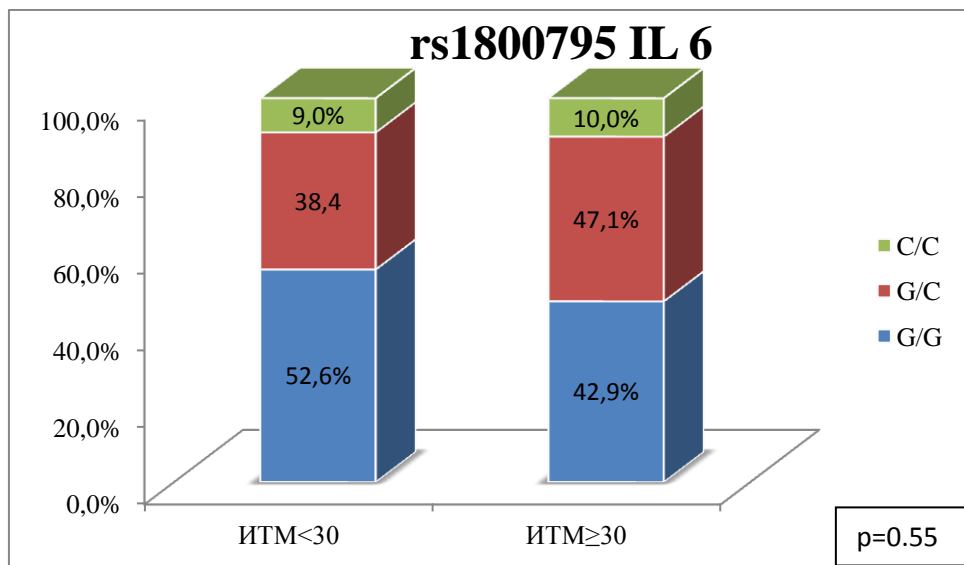
Някои изследвания показват че намаляването на плазмените нива както на адипонектина, така и на рецепторите му могат да играят основна роля в развитието на инсулинова резистентност, диабет тип 2, метаболитен синдром и сърдечно-съдови заболявания, свързани със затлъстяването (Bermudez et al., 2013). Доколкото честотата на минорния G алел е изключително ниска в популациите с европейски произход (таблица 16) в научната литература няма сведения за влиянието на този полиморфизъм върху изявата на затлъстяване.

Единственото лице в нашата извадка, което е носител на GG генотипа освен, че е с втора степен на затлъстяване (ИТМ=39,12) има и някои от критериите за метаболитен синдром, като повишено съотношение талия/ханш, повишени нива на тотален холестерол и артериално кръвно налягане в сравнение с лицата, носители на GG и ТТ генотип. В контролната група двете лица, носители на TG генотип имат статистически по-високи стойности на съотношение талия/ханш в сравнение с носителите на Т/Т генотип (таблица 21).

Разбира се, би било интересно да се изследва този полиморфизъм в по-големи извадки от популацията.

### 3.2.5. Изследване на зависимостта между наличието на определен генотип на единичния нуклеотиден полиморфизъм rs1800795 и някои биохимични и клинични показатели за затлъстяване и метаболитен синдром

В настоящето изследване е представено и сравнено разпределението по генотипове в двете изследвани групи (лица с ИТМ≥30 и лица с ИТМ<30) в три модела: кодоминантен, доминантен и рецесивен за единичния нуклеотиден полиморфизъм SNP rs1800795 в гена за IL-6. Резултатите са представени на фигура 14 и в таблица 22



Фигура 14. Генотипни честоти по отношение на SNP rs1800795 на лица с ИТМ < 30 и лица с ИТМ ≥ 30,  $p=0.55$

Генетичното разпределение е в съответствие с уравнението на Харди-Вайнберг ( $\chi^2=0.09$ ,  $p=0.763$ ).

Не се наблюдава статистически значима разлика при сравняване на различните генетични модели между двете изследвани групи лица. Наблюдава се тенденция носителите на G/G генотипа да са в по-голям процент в контролната група, а носителите на G/C са повече в групата лица с ИТМ ≥ 30.

Таблица 22. Генетични модели на SNP rs1800795 в гена за IL6 на лица с ИТМ < 30 и лица с ИТМ ≥ 30.

rs1800795 IL 6 Model	генотип	лица ИТМ < 30	лица ИТМ ≥ 30	OR (95% CI)	P-value
Кодоминантен	G/G	59 (52.6%)	30 (42.9%)	1.00	
	G/C	43 (38.4%)	33 (47.1%)	1.41 (0.75-2.66)	0.29
	C/C	10 (8.9%)	7 (10%)	1.32 (0.46-3.77)	0.61
Доминантен	G/G	59 (52.7%)	33 (47.1%)	1.00	
	G/C-C/C	53 (47.3%)	37 (52.9%)	1.39 (0.76-2.53)	<b>0.015</b>
Рецесивен	G/G-G/C	102 (91.1%)	63 (90%)	1.00	
	C/C	10 (8.9%)	7 (10%)	1.13 (0.41-3.13)	0.81

Таблица 23 представя асоциациите на отделните генотипове на rs1800795 полиморфизма с изследваните при всички 182 доброволци нива на глюкоза, триацилглицероли, общ и HDL холестерол, систолно и диастолно кръвно налягане, съотношение талия/ханш.

Таблица 23 Разпределение на генотипите честоти на rs1800795 IL6 на лица с ИТМ<30 и ИТМ≥30 според различни клинични показатели.

Показател	Лица с ИТМ<30 (N=112)				Лица с ИТМ>30 (N=70)			
	GG (n=59)	GC (n=43)	CC (n=10)	P	GG (n=30)	GC (n=33)	CC (n=7)	P
Глюкоза (mmol/l)	4.59±0.11	4.29±0.09	4.76±0.12	0.23	6.31±0.49	5.13±0.22	5.22±0.18	0.05
Триацилглицероли (mmol/l)	1.11±0.18	0.91±0.06	2.15±0.86	0.03	1.83±0.18	1.9±0.18	1.27±0.14	0.34
Общ холестерол (mmol/l)	4.77±0.15	4.66±0.18	5.2±0.28	0.36	5.28±0.23	5.02±0.19	5.85±0.32	0.21
HDL холестерол (mmol/l)	1.33±0.06	1.44±0.06	1.54±0.07	0.21	1.25±0.05	1.2±0.07	1.4±0.09	0.33
Систолно кръвно налягане (mm Hg)	112.28±1.91	110.65±2.16	116.3±5.23	0.59	126.64±3.44	132.77±4.91	142.21±12.17	0.27
Диастолно кръвно налягане (mm Hg)	77.42±1.39	77.67±1.81	76.75±2.43	0.96	88.19±2.44	90.45±2.58	91.0±6.97	0.7
Талия/ханш	0.79±0.01	0.77±0.02	0.78±0.03	0.65	0.93±0.02	0.92±0.02	0.9±0.05	0.83

Данните са представени като средна стойност±стандартна грешка

При всички изследвани лица G/G носителите имат повишена плазмена глюкоза, в сравнение с G/C и C/C носителите (5.09±0.19 vs. 4.77±0.10 mmol/l; p = 0.04), като в групата на лицата с ИТМ >30 тази тенденция е ясно изразена (6.31±0.46 vs 5.18±0.20). В групата на лицата с ИТМ ≥ 30 C/C носителите имат по-ниски стойности на ТАГ, в сравнение с G/C и G/G носителите. Тези резултати корелират с известни от литературата данни за ролята на рисковия G/G генотип по отношение на инсулиновата резистентност (Fishman et al., 1998).

Същевременно, в контролната група точно C/C носителите са със значително по-високи стойности на ТАГ (p=0.03). И в двете изследвани групи се наблюдава тенденция носителите на C/C генотип да са с по-високи стойности на общ холестерол, като разликите не са статистически значими. В нашето изследване се установи, че при лицата с ИТМ ≥30 носителите на С алел имат по-високи стойности на систолно кръвно налягане, което е в съответствие с подобни проучвания сред финладската популация (Riikola et al., 2009). Тези резултати показват, че носителството на С алела при индивиди със затлъстяване може да се асоциира с увеличен риск за метаболитни нарушения, свързани със затлъстяването.

Възможно обяснение за тези противоречиви резултати е фактът, че промоторът в гена за IL-6 е полиморфен. Това предполага, че транскрипцията на IL-6 гена зависи от сложните взаимодействия между отделните полиморфизми в него. Някои хаплотипни анализи показват, че комбинацията от различни вариации в гена IL-6 могат да допринесат за изявата на затлъстяване, нискостепенно възпаление и свързаните клинични показатели (Guryev et al., 2006; Muller-Steinhardt M et al., 2004). Също така транскрипционната активност на IL-6 се регулира комплексно от нивата на глюкокортикоиди, IL-1 и естрогени. Носителството на С алел може да опосредства по-нисък транскрипционен пик след стимулация, но по-бавен спад на циркулиращия IL-6 до изходни нива, отколкото носителството на алела G. Това би довело до хронично по-високи нива на IL-6 при носителите на С алел в сравнение с GG носителите и същевременно до по-високи нива на циркулиращия IL-6 при GG носителите в отговор на остро възпаление. Някои автори посочват, че този ефект на IL-6 G>C върху нивата на циркулиращия IL-6 е ясно изразен при пациенти с нормално тегло (BMI <25), за разлика от тези, които са с наднормено тегло (Sanderson et al. 2009).

Данните от изследванията на зависимостта между наличието на различните нуклеотидни полиморфизми и някои биохимични и клинични показатели за затлъстяване са нееднозначни и с противоречив характер. Причините за тези разлики могат да се дължат на различията между отделните популации, на генетичната хетерогенност в самата популация, на разликите във факторите на околната среда, както и на сравнително малкия размер на извадката.

### 3.3. Влияние на еднонуклеотидните полиморфизми върху изявата на метаболическия синдром.

В литературата съществуват данни, които асоциират носителството на три от изследваните полиморфизми с фенотипната изява на метаболическия синдром. От 70 лица със затлъстяване (ИТМ  $\geq 30$ ), 17 лица са идентифицирани с метаболическия синдром. Тези подбрани лица покриват поне 3 от критериите за метаболическия синдром:

- Повишена плазмена глюкоза на гладно  $> 6$  mmol/l.
- Съотношение талия/ханш  $> 0.90$  при мъже и  $> 0.85$  при жени или ИТМ  $\geq 30$ .
- Серумни триглицериди  $> 1.7$  mmol/l.
- HDL-холестерол  $< 0.9$  mmol/l при мъже и  $< 1.0$  mmol/l при жени.
- Артериално кръвно налягане  $\geq 140/90$  mmHg.

В нашето проучване 165 (90,66%) от изследваните 182 лица са без метаболическия синдром. Това са хора, които нямат или имат по-малко от три от изброените показатели за метаболическия синдром. Обособени са две групи – с и без метаболическия синдром. За всеки от изследваните полиморфизми е представено разпределението по генотип в двете групи в доминантен модел с цел да се установи асоциация на определен генотип с изявата на метаболическия синдром.

#### 3.3.1. Изследване влиянието на еднонуклеотидния полиморфизъм rs9939609 върху изявата на метаболическия синдром

Първият от изследваните полиморфизми по отношение на обвързаност с метаболическия синдром е еднонуклеотидния полиморфизъм rs9939609 в FTO гена. В литературата са налични данни, че носителството на А алела на rs9939609 се асоциира с повишен риск от развитие на метаболическия синдром. За да проверим това твърдение в нашата изследвана популация е направено разпределение по генотип на двете изследвани групи (с и без метаболическия синдром) по отношение на носителство на този рисков алел. В таблица 24 са представени носителите на AA+AT и TT генотипи в доминантен модел в двете изследвани групи.

Таблица 24. Връзка между генотипната честота на rs9939609 в FTO гена и изявата метаболическия синдром

	AA+AT брой лица/ %	TT брой лица/ %
Лица без метаболическия синдром	103/62,42%	62/37,58%
Лица с метаболическия синдром	10/58,82%	7/41,17%

При сравняването на групата с метаболическия синдром и тази без метаболическия синдром в нашата извадка не се установи асоциация на рисковия А алел с изявата на метаболическия синдром – OR=0.86, 95% CI (0.311-2.375),  $p=0.77$ . Тези резултати са първите данни за българската популация за ролята на еднонуклеотидния полиморфизъм rs9939609 в FTO гена и изявата метаболическия синдром.

Затлъстяването се явява рисков фактор за развитието на метаболическия синдром. Затова не е изненадващо, че носителството на рисковия А алел опосредства изявата на метаболическия синдром. В литературата носителството на А алела на rs9939609 в FTO гена се асоциира с увеличен ИТМ (Frayling et al., 2007). Al-Attar et. al., в мултиетническо изследване сред 2112 доброволци установяват, че носителите на

рисквия А-алел освен повишен ИТМ, имат и някои от критериите за метаболитен синдром, като понижени стойности на HDL холестерол, в сравнение с Т носителите. Freathy et. al., при изследване на 12 555 европейци в мета-анализ установяват, че носителите на А алела имат увеличени нива на инсулин и глюкоза на гладно, увеличени обиколки на талия, ханш и съотношението им; както и с нарушения в липидния профил, съпътстващи затлъстяване като увеличени плазмени нива на ТАГ и понижени на HDL холестерол. Други изследвания сред показват, че носителството на А алела се асоциира с диабет тип 2 и метаболитен синдром, независимо от ефекта му върху ИТМ (Hertel et al., 2011; Hotta et al., 2011; Fall et al., 2013).

От нашите резултати, които са първите данни за българската популация за ролята този полиморфизъм при изявата метаболитен синдром, не се установи асоциация на рисквия А алел с изявата на метаболитен синдром. Те са в потвърждение на изследванията на Shimaoka et al., които не откриват асоциация на rs9939609 полиморфизма с развитието на метаболитен синдром в японска популация. При изследвания на 3 210 души от китайската хан популация не се установява връзка между носителството на рисквия А алел и развитието на затлъстяване, диабет тип 2 и метаболитен синдром (Li et al. 2008).

### 3.3.2. Изследване влиянието на еднонуклеотидния полиморфизъм rs1501299 върху изявата на метаболитен синдром

В литературата съществуват противоречиви данни относно носителството на G алела в SNP rs1501299 и изявата на метаболитен синдром. Целта ни е да установим дали носителството на G алела е асоцииран с метаболитен синдром в изследваната извадка. В таблица 25 са представени резултатите от разпределението на двете групи лица (идентифицирани с метаболитен синдром и такива без метаболитен синдром) и носителството на рисквия G алел в доминантен модел за rs1501299 в гена за адипонектин.

Таблица 25. Връзка между генотипната честота на SNP rs1501299 в гена за адипонектин и изявата метаболитен синдром.

	<b>GG+GT</b> брой лица/ %	<b>ТТ</b> брой лица/ %
Лица без метаболитен синдром	141/85.98%	23/14.02%
Лица с метаболитен синдром	17/100%	0

При сравняване на двете групи в нашето изследване се установи, че в групата на лицата с метаболитен синдром няма такъв с генотип ТТ. При сравняване на двете групи по отношение на генотипното разпределение няма статистически значима разлика ( $p=0.23$ ).

Според последни проучвания ниските нива на адипонектин са независимо асоциирани с развитието на метаболитен синдром (King et al., 2012; Calton et al., 2013). Някои автори посочват, че определени полиморфизми в гена за адипонектин могат да регулират серумните нива на адипонектин, като по този начин повлияват риска от развитие на метаболитен синдром (Gao et al. 2013). По отношение на SNP rs1501299 в гена за адипонектин и изявата метаболитен синдром има противоречиви резултати в научната литература. Изследванията за японската популация недвусмислено показват, че носителите на G/G генотип имат намалени плазмени нива на адипонектин, увеличена инсулинова резистентност и увеличен риск от развитие на диабет тип 2. Изследване за финландската популация показва, че носителите на ТТ генотипа имат някои от критериите за метаболитен синдром, като повишени плазмени нива на триглицериди и повишено систолно кръвно налягане (Mousavinasab et al., 2006). В гръцката популация носителите на Т алела имат значимо по-високи нива на инсулин и увеличена инсулинова резистентност при жени с по-висок ИТМ, докато при слабите индивиди не се наблюдава значима разлика при носителите на двата алела (Melistas et

al., 2009). При сравняване на двете групи (с и без метаболитен синдром) в нашето изследване се установи, че нито един от носителите на ТТ генотип не е идентифициран метаболитен синдром (Таблица30). Това показва, че носителството на G алела преобладава в групата на лицата с метаболитен синдром, въпреки че няма статистическа достоверност  $p=0.23$ . Тези резултати са подобни на данните за испанска (González-Sánchez et al., 2005), японска популации (Hara et al., 2002) . Нашите резултати са сходни и с мета-анализ на китайската хан популация при която носителството на рисковия G алел в доминантен модел за rs1501299 в гена за адипонектин е сигнификантно асоциирано с изявата на метаболитен синдром (Gao et al., 2013). В италианската популация носителството на Т/Т алела се асоциира с протективен ефект за развитие на сърдечно-съдови заболявания при лица с диабет тип 2 (Vacci et al., 2004).

Тези резултати не доказват ролята на този полиморфизъм, но очертават тенденция, че е възможно носителството на G алела да се явява рисков фактор за изявата на метаболитен синдром и при българската популация. Броят на лицата с метаболитен синдром в нашата извадка е малък и тези резултати се нуждаят от потвърждение в по-големи кохорти лица.

### 3.3.3. Изследване влиянието на еднуклеотидния полиморфизъм rs822391 върху изявата на метаболитен синдром

В научната литература не съществуват данни за връзката на SNP rs в гена за адипонектин и изявата метаболитен синдром. Нашата цел е да установим дали носителството на този полиморфизъм е асоцииран с метаболитен синдром в изследваната извадка. В таблица 26 са представени резултатите от разпределението на двете групи лица и генотипното разпределение в доминантен модел на rs822391 в гена за адипонектин.

Таблица 26. Връзка между генотипната честота на SNP rs822391 в гена за адипонектин и изявата метаболитен синдром.

	СТ+ТТ брой лица/ %	СС брой лица/ %
Лица без метаболитен синдром	155/93.94%	10/6.06%
Лица с метаболитен синдром	16/94.12%	1/5.88%

При сравняването на двете изследвани групи не установихме асоциация на еднуклеотидния полиморфизъм rs822391 в гена за адипонектин с изявата на метаболитен синдром – OR=1.03, 95% CI (0.124-8.592),  $p=0.98$ .

### 3.3.4. Изследване влиянието на еднуклеотидния полиморфизъм rs1800795 върху изявата на метаболитен синдром

В литературата съществуват противоречиви данни относно носителството на G алела в rs1800795 в гена за IL-6 и изявата на метаболитен синдром. Нашата цел е да установим дали носителството на G алела е асоцииран с метаболитен синдром в изследваната извадка. В таблица 27 са представени резултатите от разпределението на двете групи лица и носителството на рисковия G алела в доминантен модел. метаболитен синдром.

Таблица 27 Връзка между генотипната честота на SNP rs1800795 в гена за IL-6 и изявата метаболитен синдром.

	GG+GC брой лица/ %	СС брой лица/ %
Лица без метаболитен синдром	149/90,30%	16/9,70%
Лица с метаболитен синдром	16/94.12%	1/5.88%



При сравняването на двете групи в нашата извадка не се установи асоциация на рисковия G алел с изявата на метаболитен синдром – OR=1.718, 95% CI (0.213-13.823), p=0.51.

Данните в научната литература за ролята на rs1800795 еднонуклеотидния полиморфизъм в гена за IL-6 и изявата метаболитен синдром са противоречиви. В испанската популация лицата със затлъстяване, които са носители на C алела имат повишен риск от развитие на метаболитен синдром и инсулинова резистентост в сравнение с GG носителите (Goyenechea et al., 2009). В същото време, изследване сред датската популация установява, че носителството на G алела е свързано с инсулинова резистентност и дислипидемия (Hamid et al., 2005). От резултатите в нашето изследване не може да твърдим, че rs1800795 полиморфизмът в гена за IL-6 е асоцииран с изявата на метаболитен синдром, т.к. не се установява статистически значима разлика в двете изследвани групи лица, p=0.51. Прави впечатление, че от 17 лица, които са идентифицирани с метаболитен синдром, само един е носител на CC генотип, а 16 са с генотип GG+GC). Това наблюдение е подобно на описаните за датската популация.

Данните в настоящето проучване за връзката на изследваните еднонуклеотидни полиморфизми и изявата на метаболитен синдром са първи за българската популация. Тези резултати не показват асоциация между носителството на определен генотип и изявата на метаболитен синдром. Една възможна причина е малката статистическа извадка от 182 доброволци, като само 17 са диагностицирани с метаболитен синдром. Наблюдаваните тенденции в настоящето изследване се нуждаят от потвърждение в по-голяма група от пациенти с метаболитен синдром.

#### **3.4. Изводи**

- Генотипното разпределение на изследваните полиморфизми в гените за FTO, IL6, ADIPOQ и ADIPOR2 е сходно с разпределението при други европейски популации.
- Не са установени категорични доказателства за ролята на носителство на изследваните полиморфизми и изявата на затлъстяване и метаболитни нарушения.
- Въпреки малката извадка се наблюдават някои сходни тенденции с описаните в литературата.

#### 4. Целеви интервенции

##### 4.1. Изследване ефектите от приема на чай от *Agrimonia eupatoria* върху метаболитни и биохимични маркери, свързани със затлъстяване.

Днес се смята, че нискостепенното хронично възпаление е в основата на нарушенията, наблюдавани при затлъстяване и съпътстващите го състояния като инсулинова резистентност, метаболитен синдром и диабет тип 2 (Matsuda & Shimomura, 2014). Възпалението се опосредства от повишени концентрации на различни провъзпалителни фактори като CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8. Водният извлек от чай от камшик е традиционно използван в България, както самостоятелно, така и в комбинация с други медицински растения. Начинът на приготвяне на чая (водни инфузии) позволява извличането на водоразтворими съединения, някои от които са с полифенолна природа. На част от тези полифенолните съединения се дължи и антиоксидантната активност на билката. Въпреки научния интерес, няма проучвания, отчитащи ефектите на консумацията му върху различни маркери на възпалението и продукцията на адипокини при хора. Затова решихме да изследваме влиянието на приема на чай от *Agrimonia eupatoria* като добавка към диета върху някои биохимични и метаболитни маркери, свързани със затлъстяването.

##### 4.1.1. Изследване на влиянието на чай от *Agrimonia eupatoria* върху някои антропометрични показатели, метаболитни маркери и антиоксидантният капацитет на плазма при здрави доброволци

Деветнадесет здрави доброволци на възраст между 18 и 55 години, от които 14 жени и 5 мъже бяха включени в проучването след одобрение на Комисията по етика към Медицински Университет “Проф. Д-р Параскев Стоянов”, град Варна (Протокол No 13/24.03.2011 г.). Всички доброволци попълваха декларация за информирано съгласие преди началото на изследването. Няма участници, които са били изключени от настоящето изследване. Всички доброволци в продължение на 30 дни консумираха като допълнение към ежедневната си диета 200ml воден извлек от агримония, разделен в два приема.

Демографските и антропометрични характеристики на участниците са представени в таблица 28.

Таблица 28. Демографски и антропометрични характеристики на участниците (изследваните лица)

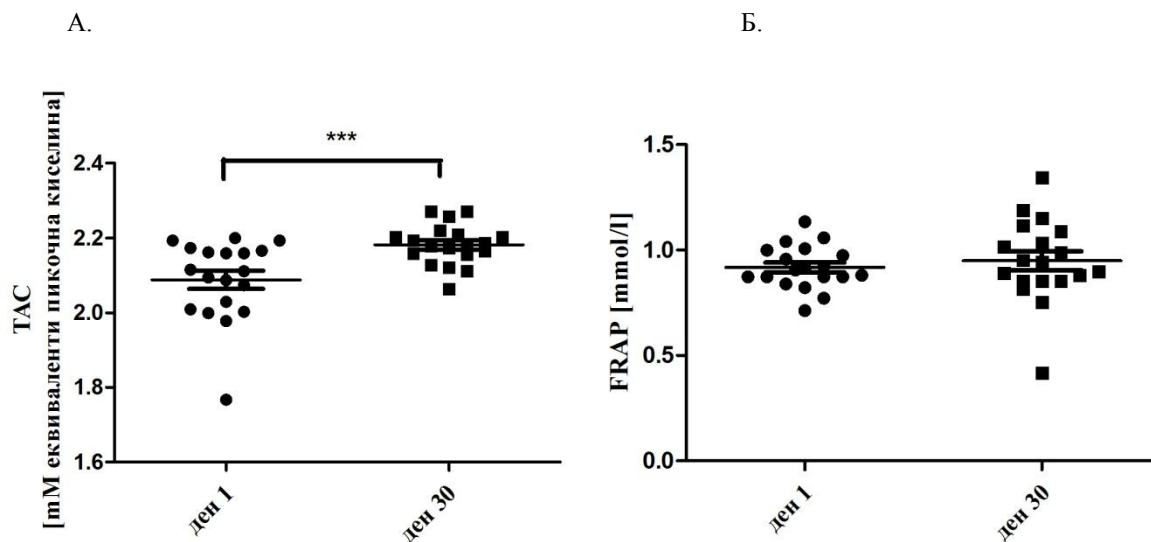
	Ден 1	Ден 30
Пол:		
Мъже/жени	5/14	
Възраст (години)	27.79 $\pm$ 11.83	
Височина (m)	1.69 $\pm$ 0.08	
Тегло (kg)	64.08 $\pm$ 14.95	64.69 $\pm$ 14.70
ИТМ (kg/m <sup>2</sup> )	22.15 $\pm$ 3.81	22.37 $\pm$ 3.74
Съотношение талия/ханш	0.75 $\pm$ 0.09	0.76 $\pm$ 0.06

Данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност.

Не са установени отклонения в серумните нива на чернодробните ензимни АсАт, АлАТ и  $\gamma$ -ГТ в края на изследването.

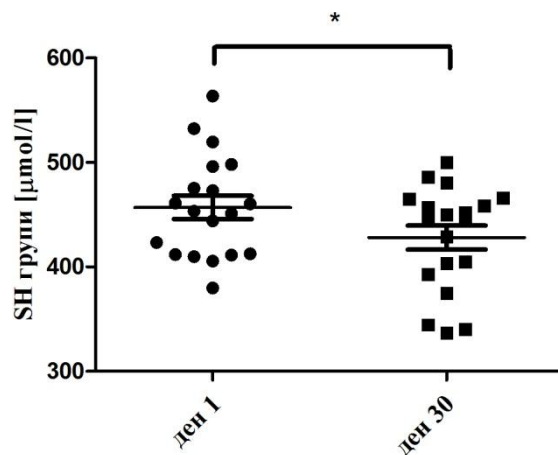
#### 4.1.2. Влияние на воден извлек *Agrimonia eupatoria* върху общия антиоксидантен капацитет в серум

Нивата на серумния ТАС значително се увеличиха след 30 дневна консумация на извлек от камшик ( $p < 0.001$ ). При 68% от участниците в края на се установи увеличаване на нивата на FRAP с 11,69% в сравнение с първия ден, като тези резултати са без статистическа значимост (Фиг. 15).



Фигура 15. Стойности на ТАС на серум при здрави доброволци преди (ден 1) и след (ден 30) консумация на чай от агримония: (А) чрез използване на ABTS радикал; (Б) чрез използване на FRAP метод. Данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност \*\*\* $p < 0.001$ , спрямо базовите стойности измерени преди началото на изследването

Консумацията на чай от *A. eupatoria* доведе до значително понижаване на количеството на тиолови групи в серума на изследваните лица в сравнение с изходните нива, измерени преди началото на интервенцията (фиг. 16)



Фигура 16. Концентрация на тиолови групи в серум на здрави доброволци преди (ден 1) и след (ден 30) консумация на чай от агримония.

Данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност

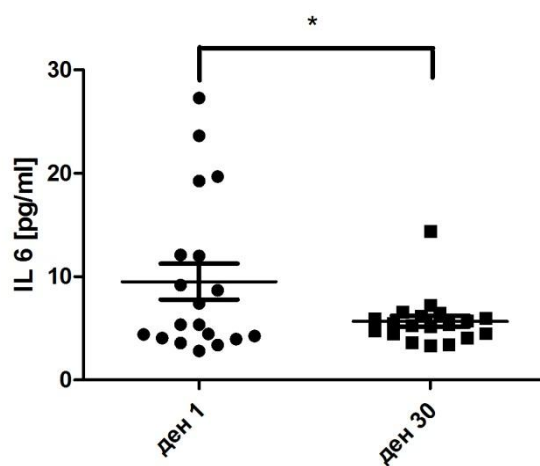
\* $p < 0.05$ , спрямо базовите стойности измерени преди началото на изследването

#### 4.1.3. Влияние на воден извлек от *Agrimonia eupatoria* върху проинфламаторни цитокини при здрави доброволци

30-дневна консумация на извлек от билката камшик доведе до статистически значимо намаляване нивата на IL-6 в серума на изследваните лица ( $p < 0.05$ ). Резултатите са представени на фиг. 17.

Нивата на CRP не се променят и остават в референтни граници -  $0.64 \pm 0.23$  mg/L за 1 ден и  $0.47 \pm 0.1$  mg/L за 30 ден.

Серумните концентрации на TNF $\alpha$  измерени в ден 1 бяха над 8pg/ml при четирима от участниците, докато на 30 ден при всички изследвани лица стойностите на TNF $\alpha$  бяха под нивата на отчитане на метода.



Фигура 17. Концентрация на IL-6 в серум на здрави доброволци преди (ден 1) и след (ден 30) консумация на чай от *A. eupatoria*.

Данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност

\* $p < 0.05$ , спрямо базовите стойности измерени преди началото на изследването

#### 4.1.4. Влияние на воден извлек от *Agrimonia eupatoria* върху кръвната захар и липидния профил при здрави доброволци

Биохимичните маркери за липидния и глюкозен метаболизъм (триглицериди, общ холестерол, HDL и LDL холестерол и глюкоза) останаха в референтни граници. Беше установено статистически значимо увеличение на нивата на и HDL холестерола заедно с общия холестерол (табл. 29)

Таблица 29. Клинични показатели на участниците, консумирали чай от *A. eupatoria*

Показател [mM]	Ден 1	Ден 30	% промяна
глюкоза	4,75 $\pm$ 0,11	4,91 $\pm$ 0,11	4,14
триглицериди	0,74 $\pm$ 0,1	0,92 $\pm$ 0,17	22,95
общ холестерол	4,32 $\pm$ 0,18	4,69 $\pm$ 0,15*	9,89
HDL холестерол	1,49 $\pm$ 0,05	1,65 $\pm$ 0,07**	12,04
LDL холестерол	2,67 $\pm$ 0.14	2,86 $\pm$ 0.15	7,99
съотношение HDL/LDL	0,58 $\pm$ 0,03	0,63 $\pm$ 0,06	7,57

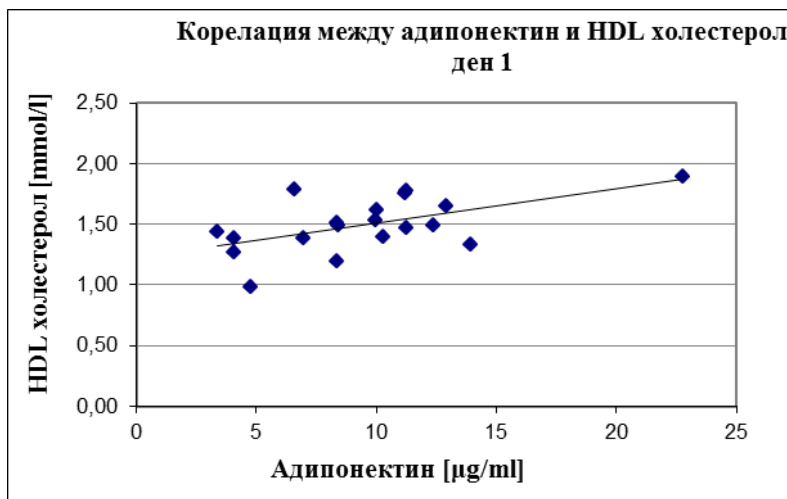
Данните са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност

\*\* $p < 0.05$ , спрямо ден 1; \* $p < 0.01$ , спрямо ден 1.

#### 4.1.5. Влияние на воден извлек от *Agrimonia eupatoria* върху нивата на адипокини при здрави доброволци

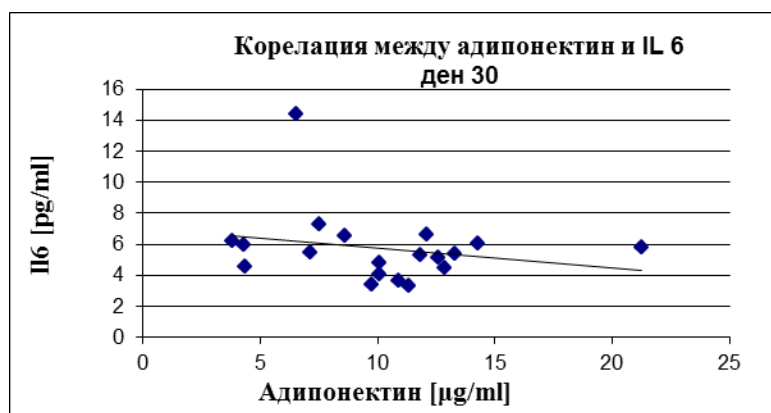
Не бяха установени статистически достоверни разлики в серумните концентрации на адипонектин преди и в края на интервенцията (9,5 $\pm$ 0,9  $\mu$ g/ml за 1 ден и 10,1 $\pm$ 0,9  $\mu$ g/ml за 30 ден). 58% от участниците се наблюдаваше намаляване на нивата на лептин – 4,7 $\pm$ 0,9 ng/ml за 1ден и 2,6 $\pm$ 0,7 ng/ml за 30, въпреки че средните стойности за групата останаха без статистически достоверни разлики.

Установена беше положителна корелация между плазмените концентрации на адипонектин и нивата на HDL холестерола (фиг. 18), която значително се увеличи вследствие консумацията на чай от камшик ( $r=0,57$  и  $r=0,63$ , за 1 и 30 ден съответно).



Фигура 18. Корелация между серумните концентрации на адипонектин и HDL холестерола при здрави доброволци преди консумация на чай от *A. eupatoria*

Нивата на адипонектин корелират отрицателно с нивата на IL-6 в края на изследването -  $r=-0,22$  (фиг. 19).



Фигура 19. Корелация между серумните концентрации на адипонектин и IL-6 измерени при здрави доброволци след 30 дневна консумация на чай от *A. eupatoria*

В традиционната медицина чайът от камшик (*A. eupatoria*) се използва при възпалителни заболявания и метаболитни нарушения. Настоящото изследване имаше за цел да проучи ефектите на извлек от камшик върху глюкозния и липидния метаболизъм, плазмения антиоксидантен капацитет и производството на адипокени при здрави доброволци. Предствени са научни данни, че камшикът проявява инсулиноподобен антихипергликемичен ефект, както и че стимулира инсулиновата секреция (Swanston-Flatt et al., 1990; Gray & Flatt, 1998).

Проведеното изследване включва само здрави доброволци с нормален въглехидратен метаболизъм и, както се очакваше, концентрацията на кръвната захар измерена на гладно остана в референтните граници след едномесечната консумация на чая от *A. eupatoria*.

Изследване при експериментален модел на метаболитни нарушения при плъхове, показва, че прием на 40% водно-алкохолнен екстракт от *A. eupatoria* предотвратява натрупването на мазнини в черен дроб и мастна тъкан, както и нормализиране на серумния липиден профил (Bratoeva et al., 2010). В настоящето изследване всички плазмени липиди остават в референтните граници до края на изследването. В същото време, докато в стойностите на HDL холестерола се наблюдаваше увеличение след 30 дневна консумация на чай от *A. eupatoria*, LDL холестеролът остана непроменен (табл. 34). Увеличаването на нивата на HDL холестерола е благотворен ефект на растението, който не е докладван до сега. Ниските нива на HDL холестерол се разглеждат като независим маркер за повишен риск от сърдечносъдови заболявания (Watson, 2008) и в този смисъл представеният по горе резултат разкрива, че *A. eupatoria* има потенциал при профилактиката на тези заболявания.

Може да се предполага, че полифенолите имат роля в механизма, по който се проявява ефектът на билката върху нивата на плазмения HDL холестерол. Известно е, че диета богата на полифеноли може да подобри липидния профил, както при здрави, така и при индивиди с компрометиран здравен статус (Baba et al 2007a; Marnewick et al., 2011).

Установено е, че водните и водно-алкохолните извлекци на камшик имат високо полифенолно съдържание (Ivanova, et al., 2004, 2005), въпреки, че до сега не е идентифициран точният им полифенолен състав. Въпреки, че полифенолите имат ограничена бионаличност, много от продуктите на техния интестинален метаболизъм преодоляват чревната бариера и достигат до тъканите, където осъществяват биологичните си ефекти (Pandey & Rizvi, 2009).

С цел да се идентифицира ефектът на воден *A. eupatoria* от камшик върху антиоксидантния статус бяха изследвани плазмените нива на SH групи и на FRAP, както и TAC на плазмата на изследваните доброволци. Резултатите от измерените плазмени концентрации на SH групи показаха значително намаляване на нивата на този показател след 30 дневна консумация на чай от агримония. Вероятна причина за изчерпването на тиоловите белтъци може да е използването им при метаболизирането на полифенолите. От друга страна самите полифеноли, благодарение на антиоксидантните си свойства компенсират нуждата от синтез на SH съдържащи белтъци.

За първи път в настоящото изследване беше демонстриран благотворен ефект на извлекка от *A. eupatoria* върху антиоксидантния потенциал при хора. Беше установено значително увеличение на плазмения TAC след 30 дневна консумация на чая. Липсата на статистическа достоверност в повишените нива на FRAP в края на изследването вероятно се дължи на различната чувствителност на двата метода в присъствието на различни антиоксиданти в серума (фиг. 19, Б).

Установеният ефект на чая върху АО капацитет на хора е в подкрепа на данни, получени в изследвания върху експериментални животни и клетъчни култури (Gião et al., 2010; Lee et al., 2010). Някои автори докладват, че различни екстракти и фракции на агримония имат потенциал да обезвреждат АКФ в изследвания *in vitro* (Kiselova et al., 2004; Ivanova, et al., 2005; Venskutonis et al., 2007; 2008). Установено е, че умерената консумация на зелен чай, който е изключително богат на полифеноли, увеличава антиоксидантния капацитет на плазмата (Mejia et al., 2009), което е в съответствие с резултатите от настоящето изследване. Полифенолите проявяват антиоксидантните си свойства директно, като обезвреждат свободните радикали в условия *in vitro*, и индиректно, в условия *in vivo*, чрез повлияване активността на антиоксидантни ензими или чрез модифициране активността на редокс чувствителни транскрипционни фактори (Frei & Higdon, 2003). По нататъшно проучване на бионаличността на полифенолите при консумация на чай от агримония, би било от полза за разкриване механизмите, по които се повлиява антиоксидантният капацитет на плазмата.

В народната медицина растението *A. eupatoria* се използва основно заради неговите противовъзпалителни свойства (Памуков, Ахтарджиев, 1989; Fabricant & Farnsworth., 2001; Sakilcioglu and Turkoglu, 2010). Противовъзпалителната активност на билката е демонстрирана чрез инхибиторния ефект, който има върху синтезата на провъзпалителни цитокини като TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 в миши клетъчни култури (Bae et al., 2010). Цитокини като TNF $\alpha$  и IL-6 имат съществена роля в отключването и предаването на

възпалителения отговор. Освен това, ролята на TNF $\alpha$  в индукцията на про-възпалителни гени се свързва с хронични заболявания като диабет тип 2 и атеросклероза (Fernández-Sánchez et al., 2011).

В нашето изследване серумните нива на IL-6 значително се понижават след 30 дневната консумация на чай от агримония. Този ефект е първото научно доказателство за противовъзпалителни свойства на *A. eupatoria* при хора, в потвърждение на данните от народната медицина. Противовъзпалителният ефект на чая също би могъл да се отдаде на ролята на полифенолите в него. В различни изследвания е показано, че диета богата на полифеноли се свързва с ниски нива на маркери на възпалението в кръвта, такива като CRP, IL-6 и TNF $\alpha$  (Nanri et al., 2008; Salas-Salvado et al., 2008; Holt et al., 2009). Полифенолното съдържание на водно-алкохолните екстракти от *A. eupatoria* включва процианиди, кемпферолови и кверцетиново гликозиди, за които е известно, че притежават антиоксидантни свойства (Correia et al., 2006).

Нивата на IL-6 в циркулацията корелират с ИТМ, инсулиновата резистентност и глюкозния интолеранс (Lastra et al., 2006). Освен това се смята, че този цитокин е отговорен за освобождаването на CRP от хепатоцитите (Heinrich et al., 1990; Ridker et al., 2000). В съответствие с понижените нива на IL-6, в концентрациите на CRP не се установиха промени след периода на третиране и те останаха в референтни граници.

В концентрациите на TNF $\alpha$  също не бяха наблюдавани специфични отклонения, с изключение на факта, че след края на изследването при всички участници стойностите на този маркер бяха под детектуемото ниво на метода. Това кореспондира с установените високи нива на антиоксидантна активност, измерени в края на изследването, отчитайки факта че TNF $\alpha$  е свързан с активирането на редокс чувствителни гени, посредством NF- $\kappa$ B (Lastra et al., 2006). Като цяло всички тези данни се подкрепят и от факта, че участниците в изследването са здрави и без затлъстяване.

Въз основа на експериментални данни, предполагащи антидиабетен потенциал на *A. eupatoria* (Gray et al., 1998; Swanston-Flatt et al., 1990; Bratoveva et al., 2010) са изследвани промените в нивата на адипонектин и лептин след 30 дневна консумация на чай от билката.

Адипонектин и лептин се проследяват като прогностични маркери за дислипидемия, затлъстяване и диабет. Понижените нива на адипонектин са независим рисков фактор за развитие на атеросклероза, затлъстяване, метаболитен синдром и диабет тип 2 (Renaldi et al., 2009). Доказана е позитивна корелация между високите плазмени нива на лептин със състояния като затлъстяване и метаболитен синдром (Ntyintyane et al., 2009), а прилагането му се асоциира с увеличени нива на CRP, свидетелстващи за провъзпалителен ефект на хормона (Steffes et al., 2006). От друга страна, беше установена негативна корелация между нивата на IL-6 и адипонектин (фиг. 19), допълваща данните за връзката между адипокините и маркери на възпалението. Въпреки че в нашето изследване суплементирането с чай от камшик не доведе до статистически значимо увеличение на плазмените нива на адипонектин, концентрацията му позитивно корелира с тази на HDL холестерола, като след края на изследването тази корелация дори се увеличава (фиг. 18).

Много автори представят неоспорими доказателства, че корелацията между нивата на адипонектин и подобрения липиден профил, включително повишени нива на HDL холестерол, са маркер за подобрен здравен статус по отношение на метаболитен синдром и сърдечно-съдови заболявания (Ryo et al. 2004; Riestra et al., 2011). Резултатите получени в настоящото изследване могат да бъдат разглеждани като допълнение към вече установения потенциал на *A. eupatoria* да подобрява фактори с прогностична стойност за метаболитни нарушения и сърдечно-съдови заболявания. Продължителността на проучването, както и добрият здравен статус на участниците могат да са предпоставки, определящи умерения ефект на билката върху нивата адипонектин и лептин.

Резултатите представени в това първо по рода си изследване ефектите на чай от *A. eupatoria* при хора, разкриват потенциала на растението да повлиява благотворно маркерите на липидния метаболизъм, оксидативния статус и възпалението при здрави възрастни индивиди. Получените данни са първото научно доказателство в подкрепа на приложенията на билката камшик в народната медицина. Имайки предвид, че



нискостепенното възпаление и оксидативният стрес са тясно свързани в сложна мрежа от сигнални пътища и допринасят за патогенезата на много заболявания, може да се предположи, че умерената консумация на чай от *A. eupatoria* има превантивна роля срещу затлъстяване, метаболитни нарушения и диабет.

### **Изводи**

Консумацията на чай от камшик като добавка към нормалната диета води до:

- Инфузия от *A. eupatoria* проявява антиоксидантна активност като повишава общия антиоксидантен капацитет в серум на доброволци след едномесечен прием на чай.
- Консумацията на чай от *A. eupatoria* доведе до значително понижаване на серумите нива на IL-6 – това са първите научни данни за молекулните ефекти, на които се дължи противовъзпалителното действие на камшика, докладвани в народната медицина
- Консумацията на чай от *A. eupatoria* доведе до значително повишаване на общия холестерол и HDL холестерола в серума на изследваните лица.
- Установена е положителна корелация между плазмените концентрации на адипонектин и нивата на HDL холестерола, която значително се увеличи вследствие консумацията на чай от *A. eupatoria*

## V Обобщение

Все по-разрастващата се епидемия от затлъстяване в световен мащаб е резултат от сложните взаимодействия между генетични фактори и фактори на околната среда, включително и начина на живот. Днес се смята, че затлъстяването има генетична основа, но негенетичните фактори са тези, които силно повлияват изявата на обезитетен фенотип (Vliet-Ostapchouk et al, 2012).

По-доброто разбиране на генетичните фактори, оказващи влияние върху затлъстяването, както и взаимодействието им с други фактори, като напр. такива, свързани с начина на живот, ще допринесе за по-доброто разбиране на причинно-следствените връзки между тях, както и за развитие на стратегии за превенция и лечение на затлъстяването.

Разпространението на затлъстяването в някои популации се увеличава с толкова бързи темпове, че не би могло да се обясни с промени в наследствеността, тъй като генофондът остава сравнително стабилен в продължение на много поколения. През последните десетилетия, обаче, настъпиха значителни промени в околната среда, а заедно с това и физическите, социалните, политическите, икономическите и много други фактори, повлияващи начина на живот на съвременния човек, в.т.ч. и храненето.

Същевременно, въпреки агресивната глобализация, националните особености, включително генетични дадености и специфични традиции, бит и култура, все още оказват влияние върху здравето и обуславят някои популационни различия. В настоящата работа бе разгледано влиянието на някои генетични и негенетични фактори върху изявата на затлъстяване и метаболитен синдром.

Множество изследвания подкрепят водещата роля на физическата активност за поддържане на здравословно тегло, независимо от генетичната предиспозиция. В нашето изследване също беше установено, че степента на физическата активност е важен фактор за поддържане на здравословно тегло и оптимален ИТМ.

Същевременно, висококалорийна диета, заседналият начин на живот с относително висок прием на подсладени напитки и продължително гледане на телевизия може да усили изявата на затлъстяване при налична генетична предиспозиция (Qi et al., 2012). В настоящето изследване се установи, че консумацията на рафинирани масла, бял ориз и компоти, богати на захар корелира с изявата на затлъстяване. Същевременно, също в съответствие с данните от литературата се установи, че консумацията на пресни плодове и зеленчуци има благоприятен ефект върху телесното тегло. Взети заедно, тези данни показват, че здравословното хранене и начин на живот може да намалят влиянието на генетична предразположеност за изявата на обезитетен фенотип (Qi et al., 2014).

*Известно* е, че носителството на определен генотип може да определя предразположение към затлъстяване, но средата е от значение за степента на неговата изява. В настоящото изследване се установи, че социо-демографските фактори също оказват влияние върху изявата на затлъстяване. По-високата степен на образование, женският пол, младата възраст и трудовата заетост корелират положително със здравословното тегло.

Въпреки, че установените от нас генотипни разпределения са сходни с тези на други популации, в настоящото проучване не бяха установени съществени корелации между носителство на изследваните

полиморфизми и изявата на затлъстяване и метаболитен синдром. Данните от едно по-задълбочено проучване, обхващащо по-многобройна извадка, а също така представляваща по-голяма територия от страната би допринесло за по-добро разбиране на връзката между генетични и генетични фактори и изява на затлъстяване.

Приемът на някои видове лекарства също може да бъде причина за увеличено телесно тегло. От друга страна, употребата на редица групи медикаменти, използвани за редукция на телесното тегло е свързана с различни неблагоприятни странични ефекти. В допълнение, съществуват и състояния, които не са показани за лекарствена терапия при затлъстяване, например бременност, лактация, детска или напреднала възраст на индивидите. Поради това вниманието на изследователите е насочено към търсене на по-ефективни и безопасни алтернативи за редукция на телесното тегло.

В последно време вниманието на фармацевтичната индустрия е насочено все повече в търсене на препарати от природни продукти. Преоткриват се познанията на народната медицина и фитотерапията все по-често се доказва като ефективен метод за профилактика и лечение на множество социално значими заболявания. В тази връзка е важно значението на научните изследвания за осигуряване на научни доказателства за биологичните ефекти на лечебните растения и механизмите на тяхното проявление. В настоящото проучване се установи, че воден извлек от *Agrimonia eupatoria* увеличава антиоксидантния капацитет на кръвна плазма и намалява концентрацията на някои възпалителни фактори. Изхождайки от факта, че затлъстяването е състояние, което е придружено от оксидативен стрес и нискостепенно хронично възпаление, то би могло да се очаква, че билката ще има благоприятен ефект за превенция и лечение на такива състояния. Едно по-задълбочено проучване, което да включва доброволци с наднормено тегло би дало ценна информация за потенциала на растението за превенция и лечение на затлъстяване и някои свързани с него патологии

## **VI. Заключение**

Според статистиката затлъстяването достига застрашителни размери. Днес е известно, че затлъстяването е заболяване с полигенен характер и степента и честотата на изявата му зависи от негенетични фактори. От друга страна като приоритетни за развитие на такова състояние се посочват предимно начина на живот, а именно хранителният режим, физическата активност, някои социодемографски фактори и др. От значение са и възможностите на народната медицина, като източник на познание за употребата и начина на приложение на лечебните растения.

Научните данни за значението на генетичните и негенетичните фактори за изява на някои патологии, включително и затлъстяване са от изключителна необходимост за развитието и прилагането на подходите на персонализираната медицина. Отдавна е ясно, че прилагането на един стандартен подход много често не е подходящ или е недостатъчен за отделния индивид. Персонализираното хранене и персонализираната медицина се основават на молекулярната основа, която отчита индивидуалните генетични различия на пациентите все по-задълбочено. Хранителен и двигателен режим, съобразени с индивидуалните особености могат да намалят влиянието на генетична предразположеност за изявата на обезитетен фенотип.

### Оригинални приноси

1. За първи път са установени алелните и генотипни честоти в извадка от българската популация от варненски регион при затлъстяване на следните полиморфизми:
  - SNP rs9939609 в FTO гена
  - SNP rs1501299 и rs822391 в гена за адипонектин
  - SNP rs16928662 в гена за рецептора за адипонектин
  - SNP rs1800795 в гена за IL -6
2. Получени са първите научни доказателства, че *Agrimonia eupatoria* повишава антиоксидантния капацитет при хора.
3. Идентифицирани са провъзпалителни маркери, върху които *Agrimonia eupatoria* има ефект, проявявайки противовъзпалително действие при хора. Получено е първо научно доказателство за противовъзпалителни свойства на камшика при хора в потвърждение на данните от народната медицина.
4. За първи път е установено подобряване на липидния профил при здрави индивиди след продължителна консумация на чай от *Agrimonia eupatoria*, свидетелство за потенциал на билката в профилактиката на сърдечно-съдовите заболявания.

### Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е влиянието на някои социо-демографски фактори при затлъстяване и свързани метаболитни нарушения
  - Възраст
  - Образование
  - Трудова заетост
2. Потвърдена е ролята на физическата активност за поддържане на здравословно тегло.

### Списък на научните публикации в пълен текст по темата на дисертацията

1. Ivanova D., **Vankova D.**, Nashar M. (2013). Agrimonia eupatoria tea consumption in relation to markers of inflammation, oxidative status and lipid metabolism in healthy subjects. *Arch Physiol Biochem* 119(1): 32-37
2. **Vankova D.**, Radanova M., Kiselova-Kaneva Y., Madjova V., Ivanova D. (2012). The FTO rs9939609, ADIPOQ rs1501299, rs822391, AND ADIPOR2 rs16928662 polymorphisms relationships to obesity and metabolic syndrome in Bulgarian sample. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 26(1): 65-71
3. **Vankova D.**, Ivanova D, Kiselova Y., Gerova D, Velikova V, Madjova V. (2012). Diet, lifestyle and obesity in Bulgarian sample. *Science & Technologies* II(1): 15-19

### Списък на участия в научни форуми по темата на дисертацията:

1. **Vankova D.**, Иванова Д., Киселова-Кънева Й., Раданова М., Маджова В. Диета, физическа активност, начин на живот изява на затлъстяване в извадка от българската популация”, 7-8 юни 2012, Стара Загора, 22 Международна научна конференция, Съюз на учените Стара Загора.
2. **Vankova D.**, Radanova M., Kiselova-Kaneva Y., Madjova V., Ivanova D. “The FTO rs9939609, ADIPOQ rs1501299, rs822391 and ADIPOR2 rs16928662 polymorphisms relationship to obesity and metabolic syndrome in Bulgarian sample” Anniversary Molecular Biology Conference, October 2011, Sofia, Bulgaria.
3. **Vankova D.**, Nashar M., Radanova M., Ivanova D. “Effects of Agrimonia eupatoria on antioxidant potential in healthy volunteers”. NuGO week 2011, Wageningen, The Netherlands.
4. **Vankova, D.**, Ivanova, D. “The FTO rs9939609 and ADIPOQ rs1501299 polymorphisms and the metabolic syndrome in Bulgarian sample”, The NuGO Week 31 August - 3 September 2010, Glasgow, Great Britain.
5. **Vankova, D.**, Gerova, D., Ivanova, D., Tomcheva, S., Madjova, V. “Assessment of the predictive value of obesity markers for the diagnosis of metabolic syndrome”, 2<sup>nd</sup> Congress of Association of General Practice/Family Medicine of South-East Europe, 22-25 April, 2010, Antalia, Turkey.
6. **Vankova, D.**, Radanova, M., Iotova, V., Galcheva, S., Feschieva, N., Aleksandrova, K., Kiselova, Y., Ivanova, D. “Campaign against obesity in children and adolescent supported by Nutrigenomic Center-Varna”, The NuGO Week, 31 August - 3 September 2009, Montecatini Terme, Italy.