



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ**  
**„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА**  
**ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА**  
**КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ**

**д-р Моника Тошкова Тодорова**

**РОЛЯ НА ВИТАМИН D И ВИТАМИН B12**  
**ПРИ БРЕМЕННИ ЖЕНИ И НОВОРОДЕНИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд**

за присъждане на образователна и научна степен

**„ДОКТОР“**

**Научен ръководител:**

*доц. д-р Даниела Иванова Герова, д.м.*

**Варна, 2023 г.**

Дисертационният труд съдържа 187 страници, 34 фигури и 59 таблици. Цитирани са 350 литературни източника, от които 5 на кирилица, 342 на латиница и 3 интернет сайта. Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата съответства на тази от дисертацията (липсват фигурите и таблиците, присъстващи в литературния обзор). Пълните наименования на цитираните литературни източници са включени в дисертацията.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на заседание на катедрен съвет на Катедрата по Клинична лаборатория при Медицински университет – Варна, състояло се на 30.01.2023 г. и е насочен за защита пред **Научно жури** в състав:

*Външни членове:*

1. Проф. д-р Красимира Илиева Икономова-Шахова, д.м.
2. Проф. д-р Аделаида Лазарова Русева, д.м.
3. Доц. д-р Добринка Динева Савова

*Вътрешни членове:*

4. Проф. д-р Яна Димитрова Бочева, д.м.
5. Проф. д-р Маргаритка Иванова Бончева, д.м.

*Резервни членове:*

1. Доц. д-р Ирена Иванова Генчева-Ангелова, д.м.
2. Проф. д-р Миглена Димитрова Георгиева д.м.

**Публичната защита ще се състои на 16.05.2023 г. от 14h в зала 213 на УМБАЛ „Света Марина“ – Варна.**

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ-Варна и са публикувани на интернет страницата на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

## **СЪДЪРЖАНИЕ:**

### **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ**

#### **I. ВЪВЕДЕНИЕ**

#### **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

#### **III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **IV. РЕЗУЛТАТИ**

1. Клинико-лабораторна характеристика на изследваните лица:
  - 1.1. Демографски данни за изследваната група бременни жени
  - 1.2. ВМІ на бременните жени, изчислен към момента на забременяване и гестационно наддаване на тегло в хода на бременността
  - 1.3. Сезонност
  - 1.4. Резултати от изследването на показатели, свързани с въглехидратната обмяна при бременните жени
    - 1.4.1. ОГТТ
    - 1.4.2. Инсулин
  - 1.5. Антропометрични данни за новородените деца на изследваната кохорта бременни жени.
2. Витамин D статус на бременните жени.
  - 2.1. Определяне на витамин D статуса и установяване честотата на витамин D дефицит и/или недостатъчност за цялата кохорта, както и за трите изследвани групи.
  - 2.2. Влияние на сезона върху витамин D статуса за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи бременни жени.
  - 2.3. Влиянието на индекса на телесната маса върху витамин D статуса за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи бременни жени.
  - 2.4. Зависимост на витамин D статуса от приема на витамин D като фармацевтичен продукт и/или хранителни добавки, съдържащи витамина, за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи бременни жени.
  - 2.5. Влиянието на витамин D статуса относно неблагоприятния изход от бременността по отношение на новороденото и възникването на

преждевременно раждане и раждане на дете с ниско тегло при здрави бременни и при жени с усложнения на бременността.

### 3. Витамин В12 статус на бременните жени.

3.1. Серумни нива на тотален витамин В12, активен витамин В12 и метилмалонова киселина и определяне честотата на витамин В12 дефицит или недостатъчност.

3.2. Влияние на сезона върху витамин В12 статуса за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи бременни жени.

3.3. Влияние на индекса на телесната маса върху витамин В12 статуса за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи бременни жени.

3.4. Зависимост на витамин В12 статуса от приема на хранителни добавки, съдържащи витамина за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи бременни жени.

3.5. Влияние на витамин В12 статуса относно неблагоприятния изход от бременността по отношение на новороденото и възникването на преждевременно раждане и раждане на дете с ниско тегло при здрави бременни и при жени, с усложнения на бременността.

## **V. ДИСКУСИЯ**

1. Бременност и рискови фактори за възникване на усложнения на бременността.
2. Витамин D статус на бременните жени.
3. Витамин В12 статус на бременните жени.

## **VI. ИЗВОДИ**

## **VII. ПРИНОСИ**

## **VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

## **IX. БЛАГОДАРНОСТИ**

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:**

**1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D** – 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D

**25(OH)D** – 25-hydroxyvitamin D

**AC** – Abdominal circumference

**ADA** – American Diabetes Association

**BMI** – Body Mass Index

**BPD** – Biparietal diameter

**CLIA** – Chemiluminescent Immunoassay

**CMIA** – Chemiluminescent Microparticle Immunoassay

**CVD** – Cardio Vascular Disease

**DBP** – Vitamin D binding protein

**DM** – Diabetes Mellitus

**EASD** – European Association for the Study of Diabetes

**FIGO** – The International Federation of Gynecology and Obstetrics

**FL** – Femur length

**FNB** – Food and Nutrition Board

**GDM** – Gestational Diabetes Mellitus

**GWG** – Gestational weight gain

**holo-TC** – Holotranscobalamin

**HOMA-IR** – Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance

**HPLC-UV** – High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detector

**IADPSG** – International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups

**IF** – Intrinsic factor

**IR** – Insulin resistance

**ISSHP** – International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy

**LBW** – Low birth weight

**LC-MS/MS** – Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

**LMIC** – Low- and middle-income countries

**MMA** – Methylmalonic acid

**NTDs** – Neural tube defects

**OGTT** – Oral glucose tolerance test

**PE** – Preeclampsia

**PIH** – Pregnancy induced hypertension

**PTB** – Preterm birth

**PTH** – Parathyroid hormone

**RDA** – Recommended dietary allowance

**SD** – Standard deviation

**SGA** – Small for gestational age

**T2DM** – Type 2 Diabetes Mellitus

**tHcy** – Homocysteine

**VDR** – Vitamin D receptor

**WHO** – World Health Organization

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Бременността е забележително физиологично състояние, по време на което организъмът на бременната жена претърпява значителни промени. Те обуславят такова метаболитно приспособяване, което да гарантира адекватен приток на хранителни вещества към плода, осигуряващи му нормален растеж и развитие. Наблюдаваните физиологични промени се влияят от метаболитния и хранителен статус на бременната жена. Храненето, като потенциално модифицируем фактор, играе жизненоважна роля по време на бременността. Добре балансираната диета, в която са включени разнообразие от микронутриенти като витамини и минерали, е от съществено значение за много клетъчни и метаболитни процеси – клетъчна диференциация, пролиферация, производство на хемоглобин и пренос на кислород, минерализация на костите и др., всички те допринасящи за оптимално протичаща бременност, развитие на плода и добри перинатални резултати.

Един от важните микронутриенти за бременната жена и нейния плод е витамин D – мастно разтворим витамин, който се произвежда в кожата при излагане на слънце или се набавя с храната и хранителните добавки. Дълго време той е възприеман единствено като „витамин на костите“, тъй като основната му функция е свързана с контролирането на калциевата хомеостаза. През последните десетилетия са идентифицирани т. нар. „некалциемични ефекти“ на витамина, свързани с регулация на клетъчната диференциация и пролиферация, с промени в имунната система, гарантиращи имунологичен толеранс и в същото време ефективна защита срещу инфекциозни агенти и неопластични процеси, както и с благоприятни ефекти при редица метаболитни заболявания. Вследствие на променения начин на живот, разпространението на витамин D дефицита и или неговата недостатъчност е повсеместно и обхваща различни групи от населението на света, включително и бременните жени. Витамин D дефицитът по време на бременност се свързва с възникването на множество усложнения както за бременната жена, така и за новороденото, а именно индуцирана от бременността хипертония, прееклампсия, гестационен захарен диабет, бактериална вагиноза, преждевременно раждане, по-ниско тегло при раждане, нарушено развитие на костната система на детето и др.

Друг важен витамин за бременните жени е водоразтворимият витамин B12. Той е основен микронутриент, необходими за синтезата на ДНК, протеини и липиди чрез участието му в редица клетъчни процеси, свързани с т.нар. едновъглероден

метаболизъм. Витамин В12 не се синтезира в организма и се набавя основно чрез храната при консумация на продукти от животински произход или чрез хранителни добавки. Освен при малабсорбция на витамин В12 в храносмилателния тракт, по-характерна за възрастните индивиди, риск от развитие на недостатъчност или дефицит на витамина настъпва в резултат на спазване на определени хранителни режими като прием основно на храни с растителен произход. В развитите индустриални държави тези режими стават все по-модерни, а в бедните райони по света те се спазват по необходимост. Всичко това обуславя възможността от широко разпространение на недостатъчност или дефицит на витамин В12, което от своя страна може да доведе до смущения в ДНК синтезата и клетъчния метаболизъм със сериозни клинични последици като макроцитна анемия, неврологична дисфункция, хиперхомоцистеинемия и метилмалонова ацидемия. Витамин В12 недостатъчността или дефицит се свързват с по-висок риск от развитие на неблагоприятни последици за бременната жена и новороденото – спонтанни аборти, прееклампсия, преждевременно раждане, аномалии в развитието на плода, интраутеринно забавяне на растежа, ниско тегло при раждане и др. Адекватният витамин В12 статус по време на бременност е от съществено значение, защото витаминът играе основна роля в невралната миелинизация, развитието на мозъка и растежа на плода.

В световната литература се натрупват все повече данни за разпространението на недостатъчността и дефицита на тези два микронутриента сред различни таргетни групи, включително и при бременни жени. Обобщават се неблагоприятните здравословни ефекти и усложнения на бременността в резултат от широкото разпространение на витамин D и витамин В12 недостатъчност и/или дефицит с важни краткосрочни и дългосрочни последици за здравето както на детето, така и на майката и се провеждат здравни политики за ограничението на тези дефицити и/или недостатъчности.

В България данните за витамин D и витамин В12 статуса на бременните жени към настоящия момент са твърде оскъдни и ограничени, което предизвиква нашия изследователския интерес.



## **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **ЦЕЛ**

Настоящото проучване има за цел да определи витамин D и витамин B12 статуса на бременни жени с нормална и патологична бременност и да оцени ролята на дефицита и/или недостатъчността им за хода на бременността и нейния изход.

### **ЗАДАЧИ**

За изпълнението на целта изследваната кохорта бременни жени бе подразделена в три основни групи: жени с нормална бременност, жени развили GDM в хода на бременността и жени с преекламписия според утвърдени в акушеро-гинекологичната практика критерии и са поставени следните основни задачи:

- I. Разглеждане на възрастта на бременните жени, ВМІ изчислен към момента на забременяване, гестационното наддаване на тегло и сезонността като потенциални рискови фактори за възникване на неблагоприятни усложнения на бременността – GDM, преекламписия.
- II. Витамин D статус:
  1. Да се изследват серумните нива на 25(OH)D на включените в проучването бременни жени.
  2. Да се определи витамин D статуса и да се установи честотата на витамин D дефицит и/или недостатъчност за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи.
  3. Да се оцени влиянието на индекса на телесната маса и сезона върху витамин D статуса при трите изследвани групи.
  4. Да се изследва зависимостта на витамин D статуса от приема на витамин D като фармацевтичен продукт и/или хранителни добавки, съдържащи витамина, в трите изследвани групи.
  5. Да се оцени влиянието на витамин D статуса относно неблагоприятния изход от бременността по отношение на новороденото и възникването на преждевременно раждане и раждане на дете с ниско тегло при здрави и бременни жени с усложнения на бременността.

### Ш. Витамин В12 статус:

1. Да се изследват серумните нива на тотален витамин В12, активен витамин В12 и на метилмалонова киселина на включените в проучването бременни жени.
2. Да се определи витамин В12 статуса и да се установи честотата на витамин В12 дефицит и/или недостатъчност за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи.
3. Да се оцени влиянието на индекса на телесната маса върху витамин В12 статуса при трите изследвани групи.
4. Да се изследва зависимостта на витамин В12 статуса от приема на витамин В12 като фармацевтичен продукт и/или хранителни добавки, съдържащи витамина, в трите изследвани групи.
5. Да се оцени влиянието на витамин В12 статуса относно неблагоприятния изход от бременността по отношение на новороденото и възникването на преждевременно раждане и раждане на дете с ниско тегло при здрави и бременни жени с усложнения на бременността.

Извършените изследвания и дейности във връзка с представения дисертационен труд са стартирали след получаване на писмено разрешение от Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) при МУ-Варна (протокол № 84/27.06.2019г.)

### **III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **1. Изследвани лица и дизайн на научното изследване**

Извършеното проучване е проспективно по своя характер и е проведено в ДКЦ „Св. Марина“ – Варна, АСС МЦ – Варна, СБГАЛ „Проф. д-р Д. Стаматов“ – Варна и МБАЛ „Св. Анна“ – Варна за периода от 02.07.2019 – 31.12.2021 год. Включени са общо 259 бременни жени. Всички участници, заявили желание за участие в проучването, са получили и подписали информирано съгласие, съгласно изискванията на КЕНИ към МУ – Варна. Личните данни на бременните жени, както и резултатите от изследванията им са получавани, обработвани и съхранявани в съответствие със Закона за защита на личните данни и Кодекса на професионалната етика.

Бременните жени, включени в клиничното проучване, след запознаване и подписване на информираното съгласие, попълват анкетна карта, съдържаща демографски данни и информация, свързана с начина им на живот, с протичането на предходни бременности (ако е имало такива) и акушерски резултати от тях, както и фамилна анамнеза.

На амбулаторно проследяваните бременни жени в 24-та до 28-ма гестационна седмица (г.с.) е предоставена възможност за провеждане на орален глюкозо-толерантен тест (ОГТТ) със 75 гр. глюкоза. В нулевата минута от провеждането на теста е взета и допълнителна епруветка венозна кръв (5 мл) за отделяне на кръвен серум и изследване на по-късен етап на витамин D, тотален витамин B12, активен витамин B12, метилмалонова киселина и инсулин. Ако резултатите от ОГТТ сочат развитие на GDM, бременните жени са насочвани към специалист ендокринолог за по-нататъшно проследяване на състоянието и лечение.

На нерисковите здрави бременни жени, включени в изследването преди 24-та г.с. или след 28-ма г.с. е измерена плазмена глюкоза на гладно и е взета венозна кръв във вакуета за серум (5 мл), за изследване на витамин D, тотален и активен витамин B12, метилмалонова киселина и инсулин.

На бременните жени, хоспитализирани в лечебно заведение по повод диагноза прееклампсия, в хода на рутинни лабораторни изследвания по време на болничния им престой е взета допълнителна вакуета с 5 мл венозна кръв за отделяне на серум за изследване на витамин D, тотален и активен витамин B12, метилмалонова киселина и инсулин.

От медицинската документация на АГ-консултативните кабинети и посочените болнични лечебни заведения е взета и обработена информация за развитието на плода в хода на бременността, а информация за антропометричните показатели на новородените след раждането е получена от неонатологичните отделения, АГ специалистите или от самите участници.

### **Критерии за включване и изключване в изследването:**

#### *Критерии за включване в проучването:*

- бременни жени на възраст >18 години, дали съгласие за участие в проучването
- бременни жени с едноплодна бременност, потвърдена с ултразвук до 12 г.с., с известен термин на бременността, изчислен въз основа на последна редовна менструация
- бременни жени с GDM
- бременни жени с прееклампсия и еклампсия.

#### *Критерии за изключване от проучването:*

- бременни жени на възраст <18 години
- бременни жени с двуплодна или многоплодна бременност
- бременни жени с неясен термин
- бременни жени, чиято бременност е вследствие на асистирана репродукция
- бременни жени с артериална хипертония, установена преди бременността
- бременни жени с установен захарен диабет преди бременността
- бременни жени с хронични и системни заболявания – сърдечно-съдови заболявания, бъбречни, чернодробни и други.

## **2. Методи**

**2.1. Анкетен метод** – всички бременни жени, включени в клиничното проучване, след запознаване и подписване на информираното съгласие, попълват надлежно под надзора на лекар, участващ в проучването, анкетна карта, съдържаща демографски данни и информация, свързана с начина им на живот (хранене, двигателна активност, прием на медикаменти и хранителни добавки), данни за предходни бременности и акушерски резултати от тях, фамилна история.

## **2.2. Антропометрични измервания.**

**2.2.1. Антропометрични измервания на бременните жени** – след запознаване и подписване на информираното съгласие и попълване на анкетната карта от бременната жена, се измерва телесното тегло с цел изчисляване на гестационното наддаване на тегло (GWG – gestational weight gain), а индексът на телесната маса към момента на забременяване се изчислява по общоприетата формула:  $BMI = \text{тегло (kg)} / [\text{ръст (m)}]^2$  въз основа на данните от попълнената анкетна карта.

**2.2.2. Антропометрични измервания на новородените** – информация за антропометричните показатели на новородените (ръст и тегло), както и ехографски данни за измерени бипариетален диаметър, обиколка на корем и дължина на бедрената кост са получени от документацията на родилните отделения в СБГАЛ „Проф. д-р Д. Стаматов“ – Варна и МБАЛ „Св. Анна“ – Варна.

## **2.3. Използвани аналитични методи:**

### **Преданалитичен етап.**

На всички бременни жени е вземана венозна кръв във вакуети с ЕДТА и без антикоагулант сутрин от 07:00 до 10:00 ч, след 12-часова хранителна пауза. Венепункцията е извършена при минимално травмиране на изследваните лица и при съблюдаване на всички изисквания на преданалитичния етап за събиране на биологичен материал, както и при спазени условия за стерилност по време на работа. За отделянето на плазма/серум венозната кръв е центрофугирана при 3000 об./мин. за 10 минути. Концентрациите на глюкоза са анализирани в ЕДТА плазма непосредствено след пробовземането. Отделеният серум е разделян на няколко аликвота, които са съхранявани при температура  $-20^{\circ}\text{C}$  до извършване на анализите за определяне концентрациите на 25(OH)D, тотален витамин B12, активен витамин B12, ММА и инсулин.

### **2.3.1. Аналитична процедура за количествен анализ на 25(OH)D в кръвен серум**

Качественият и количествен анализ на циркулиращата форма на витамин D3 в кръвен серум бяха извършени в Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика, факултет „Фармация“, Медицински университет – Варна. За целта беше разработен и валидиран течно-хроматографски метод с мас-селективна и UV детекция

за идентификация и количествен анализ на 25-хидрокси витамин D3 25(OH)D в кръвен серум.

#### *Преданалитичен етап и пробоподготовка*

Анализът на 25(OH)D в кръвен серум е аналитично предизвикателство. Липофилният 25(OH)D се транспортира в циркулацията здраво свързан с витамин D свързващия протеин. За ефективното отделяне на анализа от свързващия протеин е необходима предварителна преципитация на белтъка и последващо екстрахиране на анализа от надстоящата течност. Като преципитиращи агенти са използвани 0,2M ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и метанол, добавени към 475µl проба кръвен серум съответно в съотношения 1:0.3 и 1:2.1. След енергично разбъркване и последващо центрофугиране от надстоящата течност анализът се екстрахира с n-хексан в съотношение 1:3. Отделя се органичната фаза, която се изпарява до сух остатък под струя азот. Полученият сух остатък се разтваря в метанол с чистота за мас-спектрометрия, филтрува се и се анализира хроматографски.

#### *Хроматография с UV и мас-селективна детекция*

Хроматографският анализ е извършен с хроматографска система Acuity UPLC QDa PDA, с мас-селективен детектор и автоматичен пробовземач на производителя Waters, USA. Разделянето на анализите в пробата е осъществено с хроматографска UPLC колона Acuity UPLC BEH C18 1.7µm, 2.1x50mm (Waters, USA). Използван е градиентен режим на разделяне с подвижна фаза от два компонента А: 0,1% мравчена киселина с 5mM амониев формиат; В: метанол: вода в съотношение 98: 2, съдържаща 0,1% мравчена киселина с 5mM амониев формиат. Скоростта на потока на подвижната фаза бе 0,3ml/min, времето на анализа – 20 min.

Мас-спектралният анализ бе извършен в режим на електроспрей позитивна йонизация, следене на характеристичен йон с  $m/z = 383$  за 25(OH)D и  $m/z = 389$  за вътрешния стандарт хексадеутериран 25(OH)D. Потвърдителният анализ бе осъществен с UV детектор с диодна матрица при дължина на вълната 265 nm.

#### *Идентификация и количествен анализ*

Идентификацията на 25(OH)D бе извършена по характеристичния йон за 25(OH)D с  $m/z = 383$  и по UV спектъра на 25(OH)D. Времето на задържане на 25(OH)D и на вътрешния стандарт бе 5,01 min.

Количественият анализ бе извършен по метода на вътрешната калибровка. Като вътрешен стандарт бе използван хексадеутериран 25(OH)D, с концентрация 50 µg/mL в етанол (D6-25-Hydroxyvitamin D3 (26,26,26,27,27,27-D6; Merck, Germany), от който бе приготвен работен разтвор с концентрация 1 µg/mL в метанол. Калибровката на метода бе осъществена с помощта на серумни калибратори в 6 нива с концентрации 9,44nmol/L; 43.2nmol/L; 77.0nmol/L; 156nmol/L; 246nmol/L; 335nmol/L, съответстващи на физиологичните граници на анализа. Със всяка серия проби са анализирани серумни контроли в две нива: ниво 1 - 36,7nmol/L и ниво 2 - 135nmol/L. Матричен ефект е оценяван с помощта на серумна празна проба (серумен калибратор ниво 0). Използвани са калибратори и контроли на производителя Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Germany.

#### *Валидиране на метода*

Методът е валидиран според изискванията на Международната конференция за хармонизация на техническите изисквания за регистрация на лекарствени продукти за човешка употреба (International Conference on Harmonization of Pharmaceuticals for Human Use, ICH, 2019). Определени са следните валидационни параметри:

- Точност – изчислена е чрез трикратно определяне на следните концентрации на 25(OH)D в серума:
  - 9,44 nmol/L – 85,4%;
  - 43.2 nmol/L – 85,9%;
  - 77.0 nmol/L – 101,2%;
  - 156 nmol/L – 92,5%;
  - 335 nmol/L – 96,5%
- Линеиност – методът е линеен в изследвания обхват от концентрации със следните характеристики на калибрационната крива:
  - уравнение, изведено от калибрационната графика:  $y = 0.0191x + 0.0097$ ;
  - $R^2 = 0.9979$
- Повторяемост (RSD %) – изчислена е чрез определяне на следните концентрации на 25(OH)D в серума (n=10):
  - 12.7nmol/L – 4.85%;
  - 49.5nmol/L – 2.61%;
  - 83.5nmol/L – 0.68%.

- Междинна прецизност (RSD %) – изчислена е чрез трикратно определяне на следните концентрации на 25(OH)D в серума:
  - 12.7nmol/L – 1.50%;
  - 49.5nmol/L – 1.66%;
  - 83.5nmol/L – 3.25%.
- Матричен ефект – не се установява.

### **2.3.2. Метод за определяне на общ витамин В12:**

За определяне серумните концентрации на тотален витамин В12 е използван търговски кит на Beckman Coulter (USA) – Access Vitamin B12 Reagent Pack, Cat No. 33000 за автоматизиран имунологичен анализатор ACCESS 2, базиран на принципа на директна хемилуминисценция (CLIA). За калибрация и контрол на метода са използвани предложените от производителя калибрационни (Access Vitamin B12 Calibrator, Cat No. 33005) и контролни материали (Serorm Immunoassay Lyo Level 1, 2, 3). Анализите са извършени в Клинична лаборатория на ДКЦ „Света Марина” – Варна, при стриктно спазване инструкциите на производителя и правилата за добра лабораторна практика.

### **2.3.3. Метод за определяне на активен витамин В12:**

За определяне серумните концентрации на активен витамин В12 е използван търговски кит на Abbott Laboratories (USA) – ARCHИТЕКТ Active-B12 (Holo-transcobalamin) 3P24 за автоматичен имунологичен анализатор ARCHИТЕКТ, базиран на принципа на хемилуминисцентен имуноанализ с микрочастици (CMIA). За калибрация и контрол на метода са използвани предложените от производителя калибрационни (3P24-01 ARCHИТЕКТ Active B12 Calibrators) и контролни материали (3P24-10 ARCHИТЕКТ Active B12 Controls). Анализите са осъществени в МДЛ Лаборекспрес – Варна при стриктно спазване инструкциите на производителя и правилата за добра лабораторна практика.

### **2.3.4. Аналитична процедура за количествен анализ на метилмалонова киселина (ММА) в кръвен серум:**

Качественият и количествен анализ на метилмалонова киселина (ММА) бяха извършени в Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика, факултет „Фармация“, Медицински университет – Варна. За целта беше разработен и валидиран



точно-хроматографски метод с мас-селективна и UV детекция за идентификация и количествен анализ на ММА в кръвен серум.

#### *Преданалитичен етап и пробоподготовка*

Анализът на ММА в кръвен серум е свързан с няколко предизвикателства: ММА е дикарбоксилна киселина с ниско молекулно тегло, ММА е структурен изомер на сукцината и има много близко време на задържане с неговото, хидрофилна е, не е летлива, концентрацията ѝ в серума при здрави индивиди, при които не се очаква дефицит на витамин В12 е много по-ниска от тази на сукцината, което изисква много прецизно и надеждно хроматографско разделяне.

Проба кръвен серум (200µl) се депротеинизира с преципитиращ разтвор, съдържащ ацетонитрил с 1% мравчена киселина и 100 ng/mL вътрешен стандарт 3-деутерирана (d3-ММА, Ceriliant 1mg/ml, 1.5 ml; Supelco, Germany). След отделяне на протеините, анализът се извлича от надстоящата течност с твърдофазна екстракция върху обратнофазова колонка Oasis Prime HLB 30mg/3ml (Waters, USA). Събраните елуати се изпаряват до сух остатък под струя азот. Полученият сух остатък се разтваря във H<sub>2</sub>O:ацетонитрил = 98:2, съдържащ 0,1% мравчена киселина с чистота за мас-спектрометрия, филтрува се и се анализира хроматографски.

#### *Хроматография с UV и мас-селективна детекция*

Хроматографският анализ е извършен с хроматографска система Acuity UPLC QDa PDA, с мас-селективен детектор и автоматичен пробовземач на производителя Waters, USA. Разделянето на анализите в пробата е осъществено с хроматографска UPLC колона AccQ-TAG Ultra C18 1.7µm, 2.1x100mm (Waters, USA). Използван е градиентен режим на разделяне с подвижна фаза от два компонента:

- А: вода, съдържаща 0,5% мравчена киселина;
- В: ацетонитрил, съдържащ 0,5% мравчена киселина.

Скоростта на потока на подвижната фаза бе 0,3ml/min, времето на анализа – 10 min.

Мас-спектралният анализ бе извършен в режим на електроспрей негативна йонизация, следене на характеристичен йон с  $m/z = 117,3$  за ММА и  $m/z = 120,1$  за вътрешния стандарт тридеутерирана ММА.

#### *Идентификация и количествен анализ*

Идентификацията на ММА бе извършена по характеристичния йон за ММА с  $m/z = 117,0$ . Времето на задържане на ММА и на вътрешния стандарт бе 2,92 min.

Количественият анализ бе извършен по метода на вътрешната калибровка. Като вътрешен стандарт бе използвана тридеутерирана ММА. Калибровката на метода бе осъществена с помощта на серумни калибратори в 3 нива с концентрации 219.7nmol/L; 758.8nmol/L; 1402.7nmol/L, съответстващи на физиологичните нива на анализа. Със всяка серия проби са анализирани серумни контроли в две нива: ниво 1 – 269.5nmol/L и ниво 2 – 587.28nmol/L. Матричен ефект е оценяван с помощта на серумна празна проба (калибратор ниво 0). Използвани са калибратори и контроли на производителя Recipre Chemicals & Instruments GmbH, Germany.

#### *Валидиране на метода*

Методът е валидиран според изискванията на Международната конференция за хармонизация на техническите изисквания за регистрация на лекарствени продукти за човешка употреба (International Conference on Harmonization of Pharmaceuticals for Human Use, ICH, 2019). Определени са следните валидационни параметри:

- Точност – изчислена е чрез трикратно определяне на следните концентрации на ММА в серума:
  - 211.25nmol/L – 95,4%;
  - 338.0nmol/L – 94.88%;
  - 507.0nmol/L – 103.93%;
  - 591.0nmol/L – 103.09%;
  - 676.0nmol/L – 97.61%; (n=3)
- Линейност – методът е линеен в изследвания обхват от концентрации със следните характеристики на калибрационната крива:
  - уравнение, изведено от калибрационната графика:  $Y=0.002215*X+0.06258$ ;
  - $R^2 = 0.9946$ ;
- Повторяемост – изчислена е чрез определяне на следната концентрация на ММА в серума (n=10):
  - 6.8% RSD
- Междинна прецизност – 14.52% RSD; (n=6)
- LOQ – 194.35nmol/L
- LOD – 58.3nmol/L

- Экстракционната ефективност (n=6):
  - 211.25nmol/L – 105%;
  - 338.0nmol/L – 95%;
  - 507.0nmol/L – 109%;
  - 591.0nmol/L – 108%;
  - 676.0nmol/L – 94%;
- Матричен ефект – не се установява.

### **2.3.5. Метод за определяне на инсулин:**

За определяне серумните концентрации на инсулин е използван търговски кит на Beckman Coulter (USA) – Access Insulin Reagent Pack, Cat No.33410 за автоматизиран имунологичен анализатор Access 2, базиран на принципа на директна хемилуминисценция (CLIA). За калибрация и контрол на метода са използвани предложените от производителя калибрационни (Access Insulin Calibrator, Cat No.33415) и контролни материали (Seronom Immunoassay Lyo Level 1, 2, 3). Анализите са извършени в Клинична лаборатория на ДКЦ „Света Марина” – Варна, при стриктно спазване инструкциите на производителя и правилата за добра лабораторна практика.

### **2.3.6. Метод за определяне на глюкоза**

Нивата на глюкоза са измерени в К2ЕДТА плазма, получена след непосредствено центрофугиране на взетата венозна кръв при 3000 об/мин. за 10 минути. Използван е търговски кит на фирма Biosystems (Spain) – Glucose Hexokinase. Измерването е извършено на биохимичен анализатор Mindray в Клинична лаборатория на ДКЦ „Света Марина” и АСС МЦ – Варна, при спазени всички условия на производителя и правилата за добра лабораторна практика.

## **2.4. Статистически методи за анализ на резултатите**

За статистическа обработка на данните са използвани възможностите на статистически пакет IBM SPSS, v. 25. и са приложени следните статистически методи:

**2.4.1. Дескриптивен анализ** – за идентифициране на търсените характеристики на извадката от срезовото проучване

**2.4.2. Вариационен анализ** – за представяне на средна величина и стандартно отклонение на количествените показатели

**2.4.3. Непараметричен анализ** – анализ на категорийни признаци чрез кростабулация и критерий Хи квадрат ( $\chi^2$ ). Кростабулацията формира двупосочни и многопосочни таблици. Структурата на таблицата е подредена по категории, които спомагат за определяне вида на използвания статистически тест.  $\chi^2$  е непараметричен тест, който на базата на честотен анализ, показва оформянето на някаква процентна тенденция и нейната статистическа значимост. Получените резултати са оценени като статистически значими, когато стойността  $p < 0.05$ .

**2.4.4. Корелационен анализ** – оценката на силата на зависимостта между променливите се базира на резултатите от коефициента на Pearson ( $r$ ) и на Spearman ( $\rho$ ), като коефициентът на Spearman изчислява корелацията на базата на монотонни взаимоотношения, а на Pearson на базата на линейни връзки. Степента на асоциация между променливите е определяна като слаба при корелационен коефициент  $< 0.3$ , умерена при коефициент между  $0.3 - 0.5$  и силна при корелационен коефициент над  $0.5$  при ниво на статистическа значимост  $p < 0.05$ .

**2.4.5. Параметричен тест** – t-test на Student-Fisher, при сравнение на независими променливи, които следват нормално разпределение. Изчислява разликите между стойностите на променливите и тества дали средните стойности се различават от 0, т.е. има ли разлика при сравнението и дали тази разлика е статистически значима.

**2.4.6. Графичен анализ** – за визуализация на получените резултати.

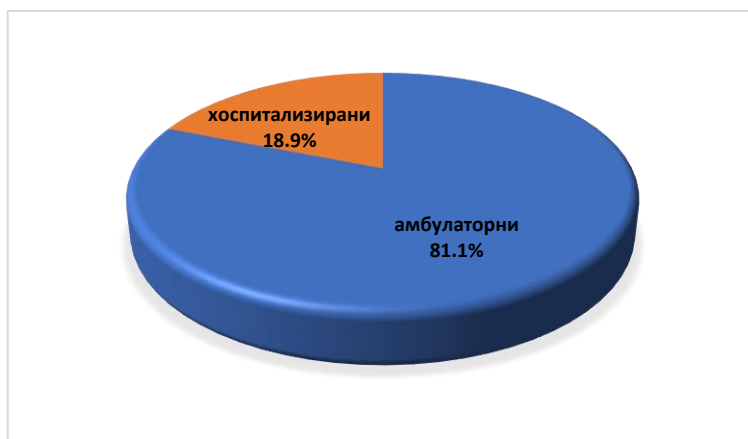
Използвано е критично ниво на значимост  $\alpha = 0.05$ , като нулевата хипотеза се отхвърля при стойност на  $p$  по-малка от  $\alpha$  ( $p < 0.05$ ).

## IV. РЕЗУЛТАТИ

### 1. Клинико-лабораторна характеристика на изследваните лица:

#### 1.1. Демографски данни за изследваната група бременни жени

От включените в проучването общо 259 бременни жени 210 (81.08%) са амбулаторно проследявани жени, а 49 (18.91%) са хоспитализирани и пролежали в СБГАЛ „Проф. д-р Д. Стаматов“ – Варна с диагноза прееклампсия. Съотношението на амбулаторно проследяваните към хоспитализираните жени е приблизително 4:1, демонстрирано на фигура 4.



Фиг.4 Разпределение на бременните жени според начина им на проследяване.

Средната възраст на изследваните бременни жени е 30.5 години (обхват от 19 до 49 години), като с цел установяване влиянието на фактора възраст, участниците са подразделени в две допълнителни подгрупи: жени в млада възраст (възрастова група А: до 34 години включително) – 85.55% (n=219) и жени в по-напреднала възраст (възрастова група В:  $\geq 35$  години) – 15.44% (n=40). Преобладават жените с български произход – 89.57% (n=232), живеещи в голям град – 90.35% (n=234), омъжени – 55.21% (n=143), с висше образование – 56.37% (n=146) и без придружаващи хронични и несистемни заболявания – 94.20% (n=244).

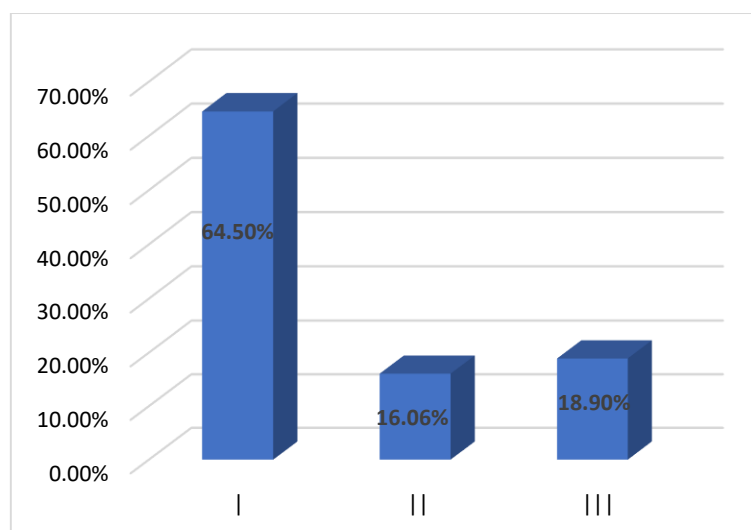
В зависимост от здравословното състояние, включените в настоящото проучване бременни жени са разделени в три основни групи:

- I-ва група – здрави бременни жени, общо 167 (64.5%). От тях 114 (68.3%) са във втори триместър на бременността, а 53 (31.7%) в трети
- II-ра група – бременни жени с GDM – общо 43 (16.6%), от които 26 (60.5%) във втори и 17 (39.5%) в трети триместър на бременността. Диагнозата е поставена след провеждане на ОГТТ със 75 грама глюкоза в периода от 24-та до 28-ма г.с. включително или по всяко друго време на бременността при показания за провеждане, съобразено с препоръките на IDF (2013) и WHO (2013). Използвани са

критериите на IADPSG, съгласно които един или повече от един от получените резултати в рамките на проведения ОГТТ са абнормни, а именно плазмена глюкоза на гладно  $\geq 5.1$  mmol/l, на 1-ви час от ОГТТ  $\geq 10$  mmol/l, а на 2-ри час от ОГТТ  $\geq 8.5$  mmol/l.

- III-та група – бременни жени с прееклампсия – общо 49 (18.9%), от които 6 (12.2%) са във втори и 43 (87.8%) са в трети триместър на бременността, хоспитализирани в отделение по патологична бременност на СБГАЛ „Проф. д-р Д. Стаматов“ – Варна. За приемане на диагнозата прееклампсия са използвани всички диагностични критерии, както следва: новопоявила се хипертония (систолично  $>140$  mmHg и диастолично  $>90$  mmHg), придружена от един или повече други признаци като протеинурия, дисфункция на различни органи на майката, включително чернодробно, бъбречно, неврологично или хематологично засягане и/или утеро-плацентарна дисфункция с ограничаване растежа на плода и/или абнормни доплерови ултразвукови находки на утеро-плацентарния кръвен поток [48].

Разпределението на бременните жени по групи е онагледено на фигура 5.



**Фиг.5** Разпределение на бременните жени според здравословния им статус. (Група I – здрави бременни жени; група II – жени с GDM и група III – жени с прееклампсия)

Демографските характеристики на бременните жени по групи са представени последователно в таблици 7, 8 и 9.

**Табл.7** Демографски характеристики на здравите бременни жени.

Възраст		Етнос		Место- живеене		Сем. положение		Образование	
<35 г.	>35 г.	Български	Друг	Град	Село	Омъжена	Неомъжена	Средно	Висше
56.4%	8.1%	58.7%	5.8%	61.4%	3.1%	35.9%	28.6%	28.6%	35.9%
n=146	n=21	n=152	n=15	n=159	n=8	n=93	n=74	n=74	n=93

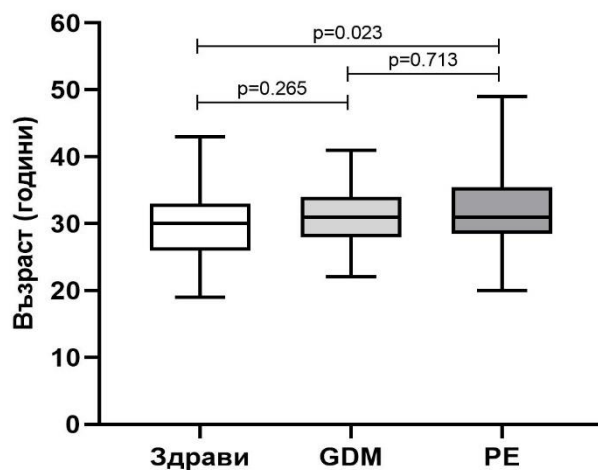
**Табл.8** Демографски характеристики на бременните жени с GDM.

Възраст		Етнос		Место- живеене		Сем. положение		Образование	
<35 г.	>35 г.	Български	Друг	Град	Село	Омъжена	Неомъжена	Средно	Висше
13.9%	2.7%	15.1%	1.5%	15.1%	1.5%	11.2%	5.4%	6.2%	10.4%
n=36	n=7	n=39	n=4	n=39	n=4	n=29	n=14	n=16	n=27

**Табл.9** Демографски характеристики на бременните жени с прееклампсия.

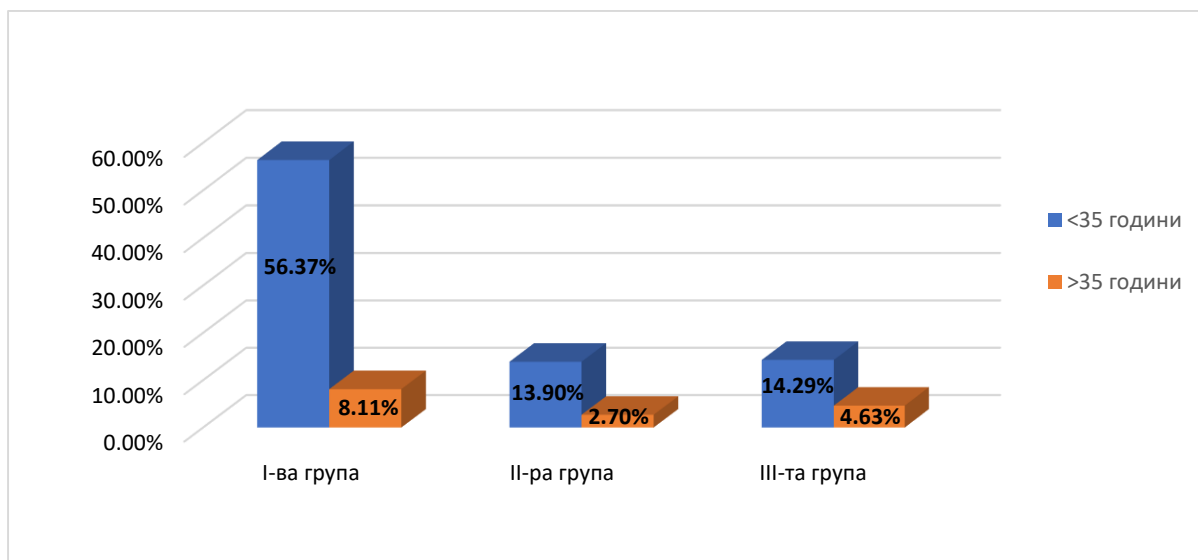
Възраст		Етнос		Место- живеене		Сем. положение		Образование	
<35 г.	>35 г.	Български	Друг	Град	Село	Омъжена	Неомъжена	Средно	Висше
14.3%	4.6%	15.8%	3.1%	13.9%	5.0%	8.1%	10.8%	8.9%	10.0%
n=37	n=12	n=41	n=8	n=36	n=13	n=21	n=28	n=23	n=26

Средната възраст на бременните жени от I-ва група е  $29.84 \pm 4.79$  години (обхват: от 19 до 43 години), във II-ра група е  $31.25 \pm 4.58$  години (обхват: от 22 до 41 години), а в III-та група –  $32.12 \pm 7.14$  години (обхват: от 20 до 49 години). При провеждане на one-way ANOVA анализ за сравнение на групите според възрастта се установява статистическа достоверна разлика ( $F=4.027$ ,  $p=0.019$ ). Tukey's множественият анализ за отделно сравнение между групите открива статистическо значимо различие единствено между здравите бременни жени и тези с прееклампсия (фигура 6).



**Фиг.6** Сравнение между трите основни групи бременни жени според възрастта. (GDM – бременни жени с гестационен диабет, PE – бременни жени с прееклампися,)

Съгласно проучената литература, бременните жени в изследването са разделени на две подгрупи според възрастта – под и над 35 години. На фигура 7 е представено честотното им разпределение по критерий възраст в трите основни групи бременни жени – здрави, жени с гестационен диабет и жени с прееклампися.



**Фиг.7** Честотно разпределение на жените в две възрастови категории в трите основни групи изследвани жени (I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – жени с GDM, III-та група – жени с прееклампися)

В таблица 10 е представена подробна информация за възрастта на бременните жени и честотата на възникване на усложнения в хода на бременността (прееклампися и GDM) с цел установяване на евентуален риск от усложнения в зависимост от възрастта.



**Табл.10** Риск от развитие на усложнение на бременността според възрастта на бременните жени и здравословното им състояние

			Възраст		Общо
			<35год.	>35год.	
Диагноза	Здрави бременни жени	N	24	143	167
		%	9.3%	55.2%	64.5%
	Жени с усложнение на бременността	N	16	76	92
		%	6.2%	29.3%	35.5%
Общо	N		40	219	259
	%		15.4%	84.6%	100%

От таблицата се вижда, че процентът на жените над 35 годишна възраст в групите с развито усложнение на бременността е по-голям (20.38%) в сравнение с този на здравите бременни жени (12.57%). При провеждане на chi-квадрат анализа ( $X^2=4.146$ ,  $p=0.387$ ) не се установяват закономерни различия между възрастта на участниците и риск от възникването на усложнения на бременността.

От всички бременни жени, включени в проучването, най-голям е процентът на първескините – 47.10% ( $n=122$ ), последван от 39.00% ( $n=101$ ) за жените с втора бременност и 13.90% ( $n=36$ ) за тези с трета и четвърта поредност на бременността. Разпределението на бременните жени според поредността на бременността е посочено на фигура 8.

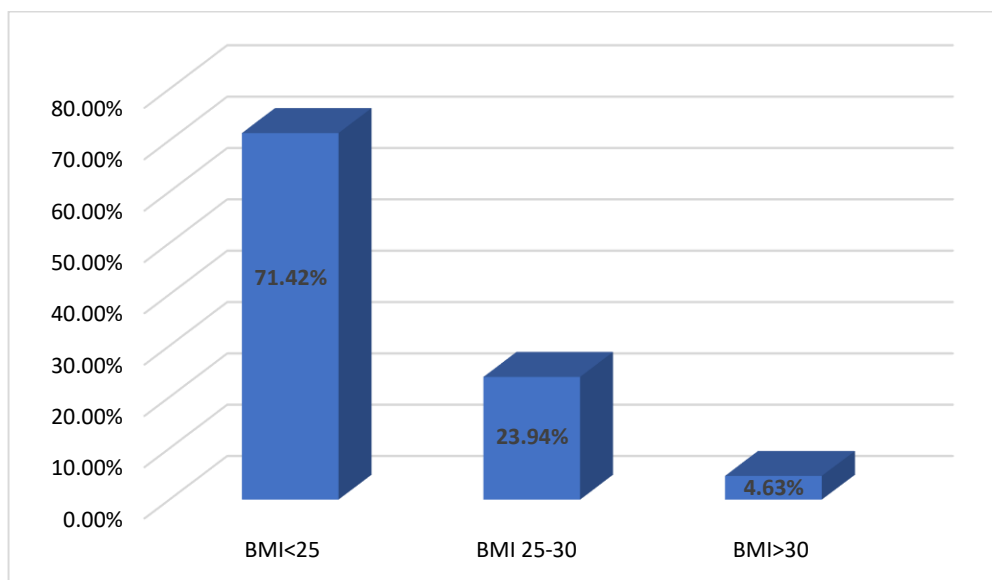


**Фиг.8** Процентно разпределение на бременните жени според поредността на бременността

## 1.2. ВМІ на бременните жени, изчислен към момента на забременяване и гестационно наддаване на тегло в хода на бременността.

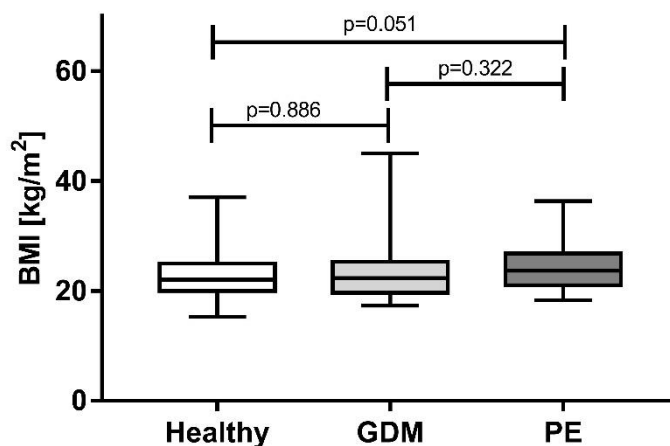
Във връзка с проучената литература и наблюдаващата се в световен мащаб тенденция за увеличаване броя на жените в репродуктивна възраст с наднормено тегло и затлъстяване [214] на бременните жени, включени в проучването, е изчислен ВМІ към момента на забременяване според данните за телесно тегло и ръст, попълнени в

анкетните карти. Изследваните бременни жени са подразделени в три подгрупи: с нормално тегло (BMI<25), с наднормено тегло (BMI 25-30) и със затлъстяване (BMI>30). Фигура 9 изобразява процентното разпределение на бременните жени в зависимост от показателя BMI.



**Фиг.9** Процентно разпределение на бременните жени в зависимост от изчисления към момента на забременяване BMI.

Средната стойност на изчисления BMI за всички участници е  $23.08 \pm 3.93$  (обхват: от 15.24 до 44.98). В групата на здравите бременни жени стойността е  $22.69 \pm 3.69$  (обхват от 15.24 до 37.02), при бременните жени с GDM  $23.06 \pm 4.91$ , като минималната (17.30) и максимална (44.98) стойности в тази група са по-високи в сравнение със здравите бременни жени. Средната стойност на BMI е най-висока за бременните жени с прееклампсия –  $24.25 \pm 3.66$  (обхват: от 18.29 до 36.33). При провеждане на one-way ANOVA тест за сравнение на групите според BMI се установя тенденция към статистическо различие ( $F=2.752$ ,  $p=0.065$ ). Tukey's множественият анализ за отделно сравнение между групите открива почти достигащо статистическо значимо различие между здравите бременни жени и тези с прееклампсия (фигура 10).



**Фиг.10** Сравнение между трите основни групи бременни жени според BMI. (PE – бременни жени с прееклампсия, GDM – бременни жени с гестационен диабет)

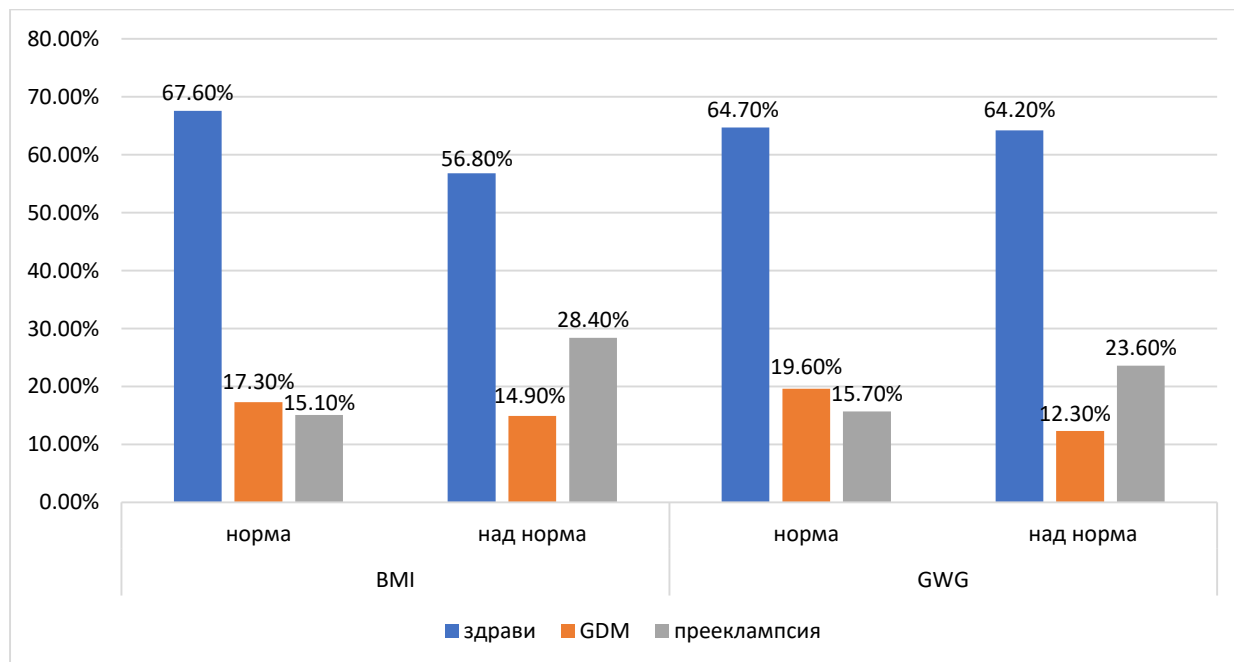
Друг показател, имащ съществено значение за успешното и благоприятно протичане на бременността и раждането е гестационното наддаване на тегло (gestational weight gain – GWG). От всички 259 бременни жени, включени в проучването, 154 (59.46%) са качили килограми в съответствие с препоръчителното за съответната гестационна седмица (г.с.) наддаване на тегло, а 40.54% (n=105) са надхвърлили допустимия диапазон на наддаване на тегло. Средното GWG в групата на здравите бременни жени е  $8.68 \pm 4.78$  кг (обхват: от 1 кг до 45 кг), като 108 (64.67%) от участниците в тази група са повишили килограми в границите на допустимия диапазон за съответната г.с., а 59 (35.33%) са го надхвърлили. При II-рата група бременни жени с GDM, средното GWG е  $9.69 \pm 4.86$  кг, по-високо в сравнение с това на първата група (обхват: от 2 кг до 29 кг), но и тук бременните с нормално наддаване на килограми за съответната г.с. преобладават – допустимо наддаване се наблюдава при 28 жени (65.12%), а над нормата – при 15 жени (34.88%). В III-тата група бременни жени с прееклампсия, средното GWG е най-високо –  $13.91 \pm 4.73$  кг (обхват: от 5 кг до 25 кг) и за разлика от първите две основни групи бременни жени, съотношението между жените с допустимо спрямо тези с нежелателно високо GWG е точно обратното: жените, наддали в границите на препоръчителния диапазон са само 18 на брой (36.73%), а тези, които го надскочат, са 31 на брой (63.27%). Обобщените данни за GWG при трите групи бременни жени са посочени в таблица 11.

**Табл.11** Гестационно наддаване на тегло и процентно разпределение на жените с нормално и абнормно наддаване в трите изследвани групи бременни жени.

I-група			II-група			III-група		
GWG (kg)	Нормално GWG	Патологично GWG	GWG (kg)	Нормално GWG	Патологично GWG	GWG (kg)	Нормално GWG	Патологично GWG
Mean=8.68	n=108	n=59	Mean=9.69	n=29	n=15	Mean=13.91	n=18	n=31
SD=4.78	67.4%	35.3%	SD=4.86	65.1 %	34.9 %	SD=4.73	36.7 %	63.3 %

GWG (gestational weight gain) – гестационно наддаване на тегло, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение

Посредством непараметричен хи-квадрат анализ и търсейки корелационни зависимости между BMI и гестационното наддаване на тегло проверихме дали усложненията по време на бременност са по-вероятни при жени с наднормено тегло и затлъстяване (BMI>25) преди зачеването и GWG над допустимото за съответната г.с. Резултатите от честотното разпределение на данните показаха достоверни статистически зависимости и при двата показателя (BMI и GWG) по отношение на риска от усложнения по време на бременността ( $\chi^2=6.046$ ,  $p<0.049$ ). По-конкретно, установихме, че около 43.30% от жените с BMI>25 и около 35.90% от бременните с GWG над допустимото са с риск да развият усложнения в хода на бременността (фигура 11).



**Фиг.11** Риск от усложнения при бременните жени според BMI и GWG.

Проверихме и доколко е силна връзката между показателите BMI и GWG и вероятността от възникване на усложнения по време на бременността. За целта използвахме корелационен анализ по метода на Spearman, който доказва, че съществува положителна, пропорционална зависимост между високия BMI (>25) и вероятността за развитие на усложнение като GDM и прееклампсия ( $\rho=0.124$ ,  $p=0.046$ ). Допълнително установихме, че GWG е значим утежняващ фактор, защото паралелно с увеличаването на BMI, нараства и GWG и в резултат се увеличава и рискът за настъпване на усложнение на бременната жена ( $\rho=0.134$ ,  $p=0.031$ ) (таблица 12).

**Табл.12** Вероятност за възникване на риск от усложнение при бременната жена в зависимост от BMI и GWG.

			<b>BMI</b>	<b>GWG</b>	<b>Усложнение</b>
<b>Spearman's rho</b>	<b>BMI</b>	rho	1.000	0.134*	0.124*
		p	.	0.031	0.046
		N	259	259	259
	<b>GWG</b>	rho	0.134*	1.000	0.033
		p	0.031	.	0.601
		N	259	259	259
	<b>Усложнение на бременността</b>	rho	0.124*	0.134*	1.000
		p	0.046	0.031	.
		N	259	259	259
*p <0.05 ниво на значимост					

### 1.3. Сезонност.

Тъй като участниците са включвани в проучването за период от 2 години и 6 месеца (от юли месец 2019 година до декември 2021 година) стана възможно бременните жени да се разпределят в зависимост от сезона на пробовземане. Всички 259 бременни жени са разделени на две групи: първа група, съставена от 166 участника (64.09%), чиято венозна кръв за изследване е взета през зимното полугодие (от ноември до април включително) и втора група, съставена от 93 участника (35.91%), при които вземането на биологичния материал е направено през лятното полугодие (от май до октомври включително). Разпределението на бременните жени според месеца на пробовземане във всяка една от трите основни групи – здрави бременни жени, бременни жени с GDM и бременни жени с прееклампсия е представено в таблица 13.

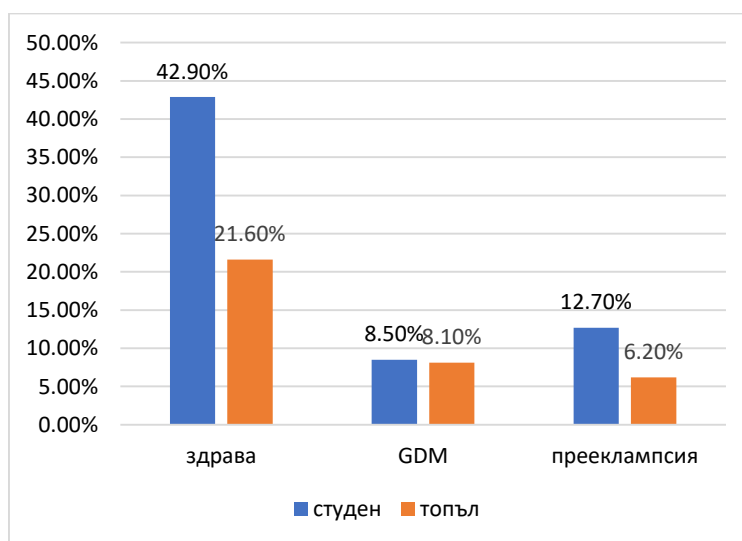
**Табл.13** Разпределение на бременните жени според сезона на пробовземане

I-ва група		II-ра група		III-та група	
Зимно полугодие	Лятно полугодие	Зимно полугодие	Лятно полугодие	Зимно полугодие	Лятно полугодие
n=108	n=59	n=27	n=16	n=31	n=18
64.67%	35.33%	62.79%	37.21%	63.27%	36.73%

(I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – жени с GDM, III-та група – жени с прееклампсия)

В трите основни групи приблизително две трети от участниците са включени в проучването през зимното полугодие. Интерес представлява III-та група, където 63.3% (n=31) от бременните жени са развили прееклампсия през зимното полугодие.

Честотното разпределение на данните по категории между показателите месец на пробовземане и рисков фактор за възникване на усложнения, направен посредством кростабулация и непараметричен хи-квадрат анализ не откри статистически разлики по отношение на възникналия риск в изследваната извадка и сезона ( $X^2=1.152$ ,  $p=0.283$ ), въпреки че около 60% от рисковите пациентки са изследвани в студения период на годината. Честотното разпределение по диагнози и рискът от възникване на усложнение в зависимост от сезона е представено на фигура 12. Търсенето допълнително и на корелационна връзка между сезонност и вероятността за развитие на усложнение на бременността като GDM и прееклампсия също не доказва наличие на закономерност (Spearman rho=0.024,  $p=0.641$ )



**Фиг.12** Риск от възникване на усложнение на бременността в зависимост от сезона.

#### 1.4. Резултати от изследването на показатели, свързани с въглехидратната обмяна при бременните жени

##### 1.4.1. ОГТТ

При амбулаторно проследяването бременни жени е проведен ОГТТ със 75 g глюкоза в рамките на 24-та до 28-ма г.с. включително или по всяко друго време на бременността, ако има показания за провеждане (високорискови пациентки), съобразно препоръките на IDF (2013) и WHO (2013). Диагнозата GDM се поставя според критериите на IADPSG, съгласно които един или повече от един от получените резултати в рамките на проведения ОГТТ са абнормни, а именно плазмената глюкоза на гладно да е  $\geq 5.1$  mmol/l, на 1-ви час от ОГТТ –  $\geq 10$  mmol/l, а на 2-ри час от ОГТТ –  $\geq 8.5$  mmol/l. В зависимост от резултатите от проведения ОГТТ жените се определят или като здрави бременни жени или като жени с GDM. В таблици 14 и 15 са представени получените при обременяването резултати за плазмената глюкоза при така оформените две групи бременни жени.

Табл.14 Резултати от ОГТТ за групата на здравите бременни жени

ОГТТ	Плазмена глюкоза (mmol/l) Mean $\pm$ SD	Плазмена глюкоза (mmol/l) Min – Max range
0-ва min	4.41 $\pm$ 0.88	3.80 – 5.05
60 min	6.50 $\pm$ 4.38	3.80 – 10.00
120 min	5.21 $\pm$ 2.98	4.00 – 8.22

Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална измерени стойности.

Табл.15 Резултати от ОГТТ за групата на бременните жени с GDM

ОГТТ	Плазмена глюкоза (mmol/l) Mean $\pm$ SD	Плазмена глюкоза (mmol/l) Min – Max range
0 min	5.56 $\pm$ 4.31	3.85 – 9.95
60 min	9.71 $\pm$ 5.26	6.10 – 13.55
120 min	5.97 $\pm$ 4.73	3.50 – 10.19

Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална измерени стойности.

##### 1.4.2. Инсулин

Серумни концентрации на инсулин са определени при 138 от бременните жени – здрави и с усложнения на бременността. Средната измерена стойност на параметъра за всички жени, на които е измерен инсулин, е 15.49 $\pm$ 12.55 mIU/L (обхват: 3.18 mIU/L до 80.78 mIU/L), като за здравите бременни жени (n=91) е 12.03 $\pm$ 8.03 mIU/L (обхват: 3.18

mIU/L до 46.74 mIU/L), а за бременните жени с усложнение на бременността (n=47) – 22.19±16.41 mIU/L (обхват: 3.92 mIU/L до 80.78 mIU/L). Бременните жени с изследван серумен инсулин от двете групи са разделени в допълнителни две подгрупи в зависимост от изчисления към момента на забременяването им BMI: бременни жени с нормално телесно тегло (BMI<25) и бременни жени с наднормено тегло и затлъстяване (BMI≥25). Резултатите за серумен инсулин на така формираните групи са представени в таблици 16 и 17.

**Табл.16** Серумни концентрации на инсулин при здрави бременни жени.

N (%)	BMI	Инсулин (mIU/L) Mean±SD	Инсулин (mIU/L) Min – Max range
51 (56.04%)	<25	7.70±2.67	4.10 – 15.18
40 (43.96%)	≥25	17.54±9.14	3.18 – 46.74

BMI – индекс на телесна маса, изчислен към момента на забременяване, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална измерени стойности.

**Табл.17** Серумни концентрации на инсулин при бременни жени с усложнения на бременността.

N (%)	BMI	Инсулин (mIU/L) Mean±SD	Инсулин (mIU/L) Min – Max range
33 (70.21%)	<25	19.27±15.75	3.92 – 80.78
14 (29.79%)	≥25	29.07±15.87	7.20 – 64.59

BMI – индекс на телесна маса, изчислен към момента на забременяване, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална измерени стойности.

### **1.5. Антропометрични данни за новородените деца на изследваната кохорта бременни жени.**

Гестационната възраст (г.в.) на новородените е изчислена въз основа на данните за последна редовна менструация, отразени в анкетните карти. Информация за антропометричните показатели на новородените е получена от документацията на родилните отделения в СБГАЛ „Проф. д-р Д. Стаматов“ – Варна и МБАЛ „Св. Анна“ – Варна, както и от консултативните АГ-кабинети. Събрани са данни за гестационна възраст, пол, ръст и тегло на 257 новородени от общо 259 наблюдавани бременни жени. Една от бременностите е приключила с аборт, а една жена е със сменени местоживееене и контакт за връзка, поради което не бе възможно получаване на данни за новороденото. Средната г.в. на всички новородени е 37.85±2.26 г.с. (обхват: 30-та до 40-та г.с.). Преобладава процентът на децата родени на термин – 87.54% (n=225), с нормално тегло



при раждане – 86.38% (n=222), от мъжки пол – 54.47% (n=140). Ехографски са измерени бипариетален диаметър (biparietal diameter – BPD), обиколка на корем (abdominal circumference – AC) и дължина на бедрената кост (femur length – FL). Сумарните данни за антропометричните показатели на новородените е представена в таблица 18.

**Табл.18** Антропометрични данни за всички новородени.

Параметър	Mean±SD	Min – Max range
Тегло (gr)	3105.64±609.82	960 – 4590
Ръст (sm)	48.98±3.14	34 – 55
BPD (mm)	93.06±5.41	72 – 102
AC (mm)	315.10±31.66	214 – 370
FL (mm)	70.70±4.63	51 – 80

BPD – бипариетален диаметър, AC – коремна обиколка, FL – дължина на бедрената кост, (femur length), Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална измерени стойности.

В групата на здравите бременни жени е получена информация за антропометричните показатели на 166 от общо 167 новородени. За едно новородено не можах да се открият данни, поради факта, че неговата майка е емигрирала от страната. В тази група преобладават новородените от мъжкия пол – 57.83% (n=96), като 95.7% (n=159) от децата са родени на термин (след 37 г.с.), а преждевременно родени (преди 37 г.с.) са 4.2% (РТВ, n=7). Процентът на новородените с нормално тегло е 92.2% (n=153), а на децата с тегло под 2500 г при раждане съответно 7.2% (LBW, n=12). Антропометричните показатели на новородените, родени от здрави бременни жени, са представени на таблица 19.

**Табл.19** Антропометрични данни на новородените, родени здрави бременни жени.

Параметър	Mean±SD	Min – Max range
Тегло (gr)	3228±525.46	1390 – 4590
Ръст (sm)	49.68±2.35	37 – 55
BPD (mm)	94.48±4.06	74 – 102
AC (mm)	323.14±30.42	238 – 370
FL (mm)	71.95±3.12	60 – 80

BPD – бипариетален диаметър, AC – коремна обиколка, FL – дължина на бедрената кост, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална измерени стойности.

В групата на бременните жени с GDM е събрана информация за всички новородени – общо 43 на брой. Преобладават новородените от женският пол – 51.16% (n=22), като 93.02% (n=40) от децата са родени на термин (след 37 г.с.), преждевременно родените са 6.98% (РТВ, n=3). Процентът на новородените с нормално тегло е 86.05% (n=37), а на децата с ниско тегло при раждане (LBW) – 13.95% (n=6). Антропометричните показатели на новородените, родени от бременни жени с GDM е представена на таблица 20.

**Табл.20** Антропометрични данни на новородените, родени от бременни жени с GDM.

Параметър	Mean±SD	Min – Max range
Тегло (gr)	3091.39±589.22	1100 – 3880
Ръст (sm)	48.65±3.40	34 – 53
BPD (mm)	92.20±5.14	72 – 98
AC (mm)	316±22.18	236 – 362
FL (mm)	70.09±4.78	51 – 77

BPD – бипариетален диаметър, AC – коремна обиколка, FL – дължина на бедрената кост, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална измерени стойности.

В групата на бременните жени с прееклампсия е събрана информация за общо 48 новородени, тъй като една от бременностите приключва с аборт. От останалите 48 бременности при една има мъртво раждане (2.08%). Разпределението по пол е равномерно (женски пол – 24, мъжки пол – 24), като броят на децата родени на термин е 26 (54.17%), а тези родени преждевременно са 22 (45.83%). Процентът на новородените с ниско тегло (LBW) е значително по-висок – 33.33% (n=16), в сравнение с установения при първите две групи бременни жени. Антропометричните показатели на новородените, родени от бременните жени с прееклампсия са представени в таблица 21.

**Табл.21** Антропометрични данни на новородените, родени от бременните жени с прееклампсия.

Параметър	Mean±SD	Min – Max range
Тегло (gr)	2693.33±720.32	960 – 3800
Ръст (sm)	46.83±4.20	34 – 53
BPD (mm)	88.92±7.27	72 – 100
AC (mm)	293.12±33.87	214 – 347
FL (mm)	66.92±6.48	51 – 79

BPD – бипариетален диаметър, AC – коремна обиколка, FL – дължина на бедрената кост, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална измерени стойности.

## 2. Витамин D статус на бременните жени

### 2.1. . Серумни нива на 25(OH)D в изследваната кохорта

Като най-подходящ и надежден маркер, отразяващ в най-добра степен наситеността на организма с витамин D, са измерени серумните нива на 25(OH)D на всички бременни жени, включени в проучването, посредством валидиран течнокроматографски метод с мас-спектроскопска детекция.

Средната стойност на серумните концентрации на 25(OH)D общо за цялата кохорта изследвани лица е  $76.26 \pm 38.27$  nmol/l., а медианата 69.15 nmol/l (обхват: 10.25 nmol/l до 204.23 nmol/l).

В таблица 22 са представени резултатите за серумните концентрации на 25(OH)D при бременните жени в трите основни изследвани групи.

**Табл.22** Серумни концентрации на 25(OH)D в трите изследвани групи.

Група бременни жени	25(OH)D (nmol/l) Mean $\pm$ SD	25(OH)D (nmol/l) Min-Max range
I-ва група	76.72 $\pm$ 37.14	10.25 – 204.23
II-ра група	73.98 $\pm$ 37.96	17.00 – 160.43
III-та група	76.85 $\pm$ 42.92	18.08 – 194.03

I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – бременни жени с GDM, III-та група – бременни жени с прееклампсия, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална измерени стойности.

Най-ниска е средната стойност на 25(OH)D при бременните жени с GDM (73.98 nmol/l), последвана от тези при здрави бременни жени (76.72 nmol/l) и при бременните жени с прееклампсия (76.85 nmol/l). При провеждане на one-way ANOVA тест не се установи статистически значима разлика в резултатите за 25(OH)D между трите изследвани групи ( $F=0.115$ ,  $p=0.892$ ). Допълнително проверихме има ли връзка между серумните стойности на 25(OH)D и принадлежността към групата бременни жени, развили усложнение, но корелацията по Spearman не доказва достоверна закономерност ( $\rho=0.028$ ,  $p=0.661$ ).

Детайлното сравнение на средните стойности от измерените концентрации на 25(OH)D между трите групи бременни жени по метода на Tukey потвърди липсата на статистически значима разлика между тях (таблица 23).

**Табл. 23** Сравнения на 25(OH)D между трите групи бременни жени по метода на Tukey.

Сравнения между трите групи бременни жени							
	Диагноза	Диагноза	Средна разлика	SEM	p	95% CI	
						долен	горен
25(OH)D (nmol/L)	Здрави	GDM	3.10	6.71	0.889	-12.72	18.93
		Прееклампсия	-0.13	6.53	1.000	-15.54	15.27
	GDM	Здрави	-3.10	6.71	0.889	-18.93	12.72
		Прееклампсия	-3.23	8.26	0.919	-22.73	16.26
	Прееклампсия	Здрави	0.13	6.53	1.000	-15.27	15.54
		GDM	3.23	8.266	0.919	-16.26	22.73

\* Средната разлика е сигнификантна при  $p < 0.05$

SEM – средна стандартна грешка, CI – доверителен интервал

### 2.1. Определяне на витамин D статуса и установяване честотата на витамин D дефицит и/или недостатъчност за цялата кохорта, както и за трите изследвани групи.

За определяне витамин D статуса на участниците е избрана предложената от Hollis (2011) скала за степени на насищане с витамин D [142]. Разпределението на всички бременни жени, включени в проучването, съгласно тази скала е представено в таблица 24.

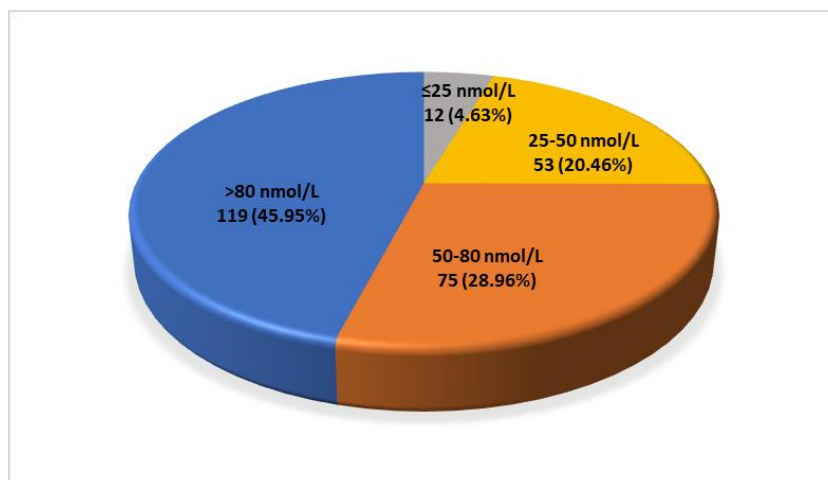
**Табл.24** Витамин D статус на цялата кохорта изследвани бременни жени.

Витамин D статус	N (%)	25(OH)D (nmol/L) Mean±SD
Дефицит ( $\leq 25.0$ nmol/L)	12 (4.63%)	18.21±4.80
Изразена недостатъчност (25.01 – 50.0 nmol/L)	53 (20.46%)	39.38±6.41
Недостатъчност (50.01 – 80.0 nmol/L)	75 (28.96%)	63.38±8.21
Достатъчност ( $> 80.01$ nmol/L)	119 (45.95%)	113.21±28.13

N – брой изследвани лица, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение

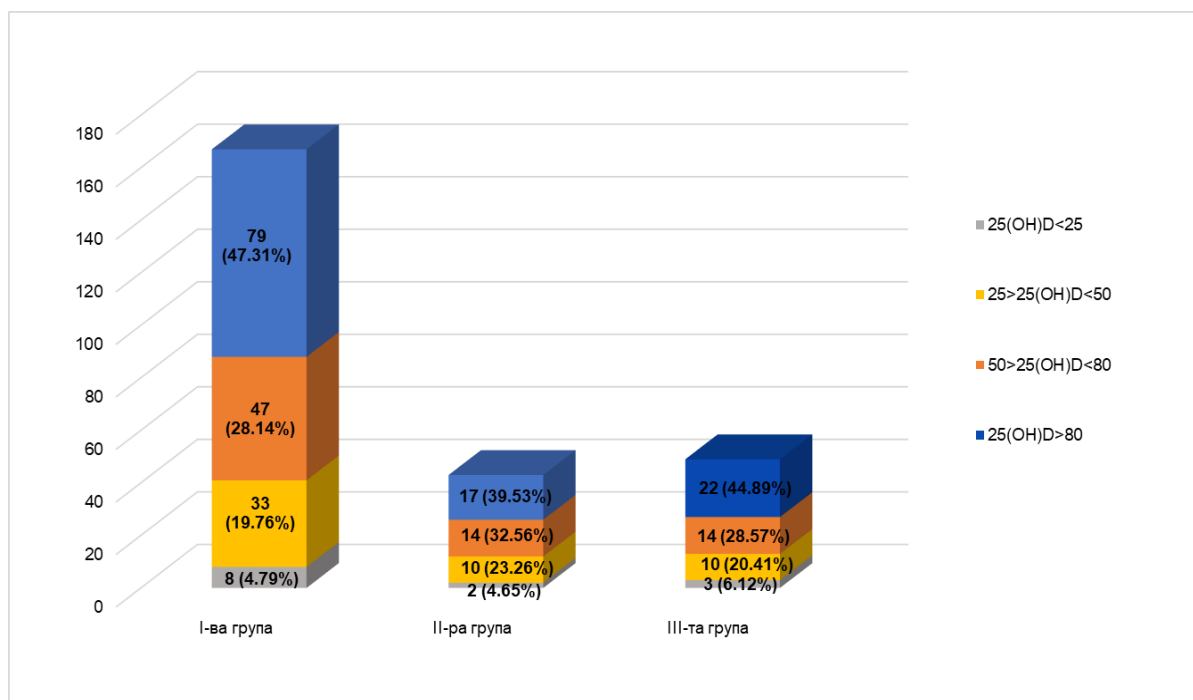
При 54.05% от изследваните лица се установяват нива на витамин D под общоприетото оптимално ниво от 80.00 nmol/L, над което се счита, че витамин D може да проявява и некалциемичните си ефекти. Абсолютен дефицит се открива при 4.63% от бременните жени, а 49.41% от изследваните лица са с различна степен на недостатъчно

насищане с витамина. Малко по-малко от половината бременни жени (45.95%) са с оптимални нива на витамина (фигура 13).



**Фиг.13** Разпределение на бременните жени според степента им на насищане с витамин D за общата група

На следващата фигура 14 е представен витамин D статуса на бременните жени от трите основни изследвани групи. От получените данни се вижда, че най-висока честота на абсолютен витамин D дефицит се установява при бременните жени с прееклампсия (6.12%), докато в групата на здравите бременни жени и в тази на жените с GDM процентът на тези от тях, които са с абсолютен дефицит, е приблизително еднакъв (4.79% за здравите и 4.65% за жените с GDM). Изразената недостатъчност на витамина се среща с най-ниска честота в групата на здравите бременни жени (<20%), докато в другите две групи тази честота е над 20% и е най-изразена при лицата с GDM (23.26%). Общо честотата на жените с нива на 25(OH)D под оптималните 80 nmol/l е най-висока за групата с GDM (60.47%), последваната от групата на жените с прееклампсия (55.10%) и най-ниска в групата на здравите бременни жени (52.69%). Съответно на това процентът на жените с оптимални нива на 25(OH)D >80 nmol/l е най-висок в групата на здравите бременни жени (47.31%), последвана от групата на жените с прееклампсия (44.89%), а най-ниският процент на жени с оптимални нива на витамина се установява при групата с GDM (39.53%).

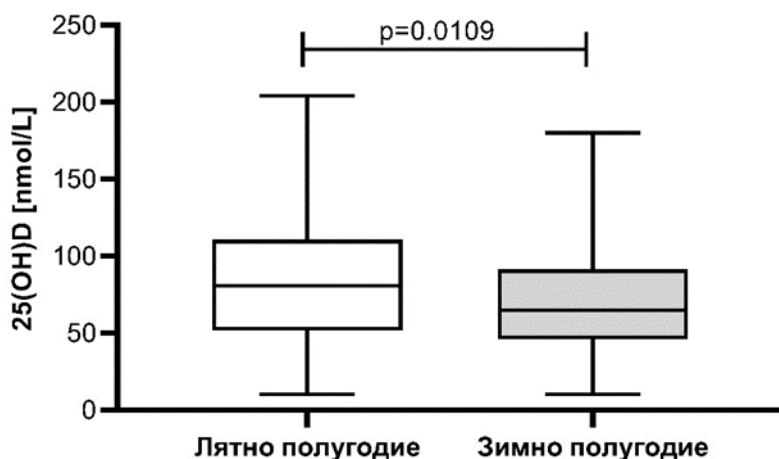


**Фиг.14** Разпределение на бременните жени според степента им на насищане с витамин D в трите основни изследвани групи

Въпреки тези цифрови различия в процентното разпределение на жените според витамин D статуса им в трите основни групи, проведенният  $\chi^2$ -квадрат анализ не доказва статистически различия между тях ( $\chi^2=1.044$ ,  $p=0.9839$ ).

## **2.2. Влияние на сезона върху витамин D статуса за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи.**

Във връзка със зависимостта на серумните концентрации на 25(OH)D от сезона, през който се осъществява пробовземането, подразделихме бременните жени в две групи според годишното време, през което е вземана кръвта им за изследване на 25(OH)D (зимно или лятно полугодие). Средната измерена стойност на 25(OH)D при бременните жени, изследвани през зимното полугодие, е  $71.40 \pm 36.15$  nmol/l (медиана 64.93 nmol/l и интерквартилен обхват 46.09-91.65 nmol/l). Средната измерена стойност на 25(OH)D при бременните жени, изследвани през лятното полугодие, е  $85.30 \pm 40.63$  nmol/l (медиана 80.93 nmol/l и интерквартилен обхват 51.70-110.70 nmol/l). При проведения Mann-Whitney тест се установи статистическо значимо различие между серумните нива на 25(OH)D, измерени през двете полугодия на годината (фигура 15).



**Фиг.15** Серумни нива на 25(OH)D, измерени през двете полугодия на годината за цялата изследвана кохорта (данните са посочени като медиана и интерквартилен диапазон, Mann-Whitney тест е използван за сравнителния анализ).

Данните за средните серумни нива и медиани на 25(OH)D за двете полугодия на годината в трите основни изследвани групи са посочени в таблица 25.

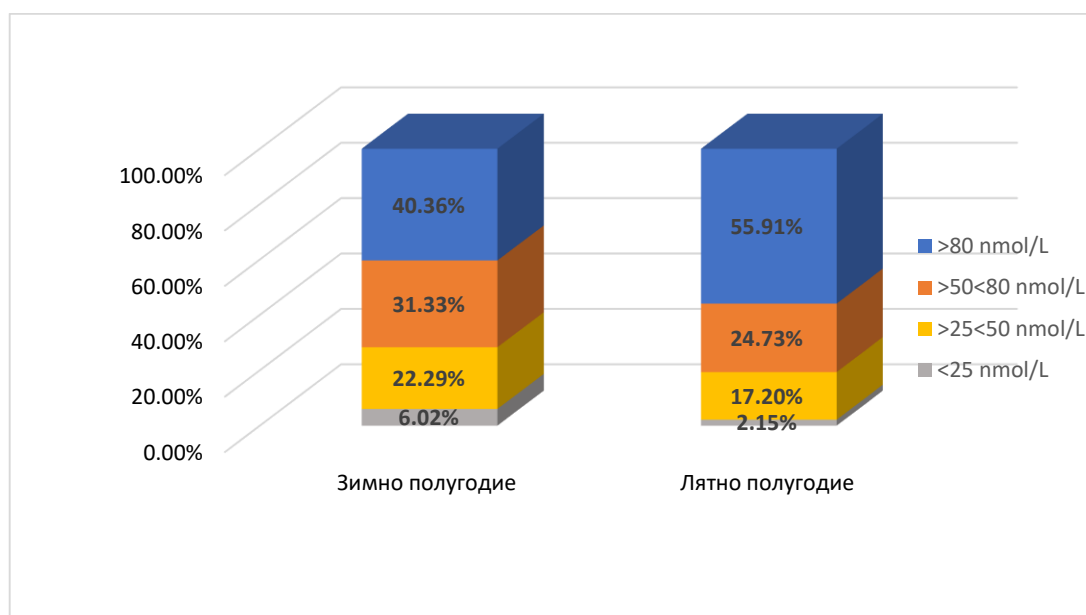
**Табл.25** Серумни нива на 25(OH)D, измерени през двете полугодия на годината в трите основни изследвани групи

Изследвана група	25(OH)D [nmol/l] Mean±SD	25(OH)D [nmol/l] Median (IQR)
I-ва група: зимно полугодие	72.95±37.04	65.87 (46.73-93.24)
лятно полугодие	82.79±37.37	78.83 (51.22-109.6)
II-ра група: зимно полугодие	65.14±31.32	59.73 (42.48-78.34)
лятно полугодие	86.76±38.20	85.74 (51.89-130.3)
III-та група: зимно полугодие	68.37±34.01	66.90 (42.23-90.20)
лятно полугодие	85.46±47.64	73.88 (51.43-147.5)

I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – бременни жени с GDM, III-та група – бременни жени с прееклампсия, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Median – медиана, IQR – интерквартилен обхват

Проведеният one-way ANOVA анализ не доказва статистически значими различия между серумните нива на 25(OH)D между трите основни групи изследвани бременни жени, разпределени в двете полугодия на годината (F=0.4386, p=0.6457 за зимно полугодие и F=0.07165, p=0.9309 за лятно полугодие).

Изследвано е честотното разпределение на жените според витамин D статуса им в зависимост от периода на годината, когато са изследвани серумните нива на 25(OH)D. През зимното полугодие 59.64% (n=99) от изследваните бременни жени имат нива на 25(OH)D под 80 nmol/l, като дялът на тези от тях с абсолютен дефицит е 6.02% (n=10). Те, заедно с участниците със серумни нива на 25(OH)D между 25 nmol/l и 50 nmol/l, формират съществен дял от групата изследвана през зимното полугодие – 28.31%. Участниците със серумни нива на 25(OH)D между 50 nmol/l и 80 nmol/l са 31.33% (n=52), а тези с нива >80nmol/l съставляват 40.36% (n=67). През летните месеци на годината витамин D статусът на бременните жени е по-добър и нивата под оптималната стойност (80 nmol/l) представляват 44.09% (n=41) от всички 93 изследвани. Бъдещите майки с абсолютен дефицит са само 2.15% (n=2). Те, заедно с бременните жени със серумни нива на 25(OH)D между 25 nmol/l и 50 nmol/l (n=16) представляват едва 19.35% от всички изследвани през лятното полугодие, а около една четвърт от бременните жени от групата са със субоптимални нива на витамина (между 50 nmol/l и 80 nmol/l). На фигура 16 са представени получените резултати за честотното разпределение на жените според витамин D статуса им в двете полугодия на годината за цялата изследвана кохорта.



**Фиг.16** Витамин D статус на бременните жени през зимно и лятно полугодие.

При провеждане на chi-квадрат анализа относно честотното разпределение на жените през двете полугодия се наблюдава тенденция за достигане на статистическо значимо различие ( $\chi^2=7.049$ ,  $p=0.0704$ ).

### **2.3. Влияние на индекса на телесната маса върху витамин D статуса за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи.**

С цел оценка влиянието на BMI върху серумните нива на 25(OH)D всички изследвани бременни жени са подразделени в две групи: с нормално телесно тегло



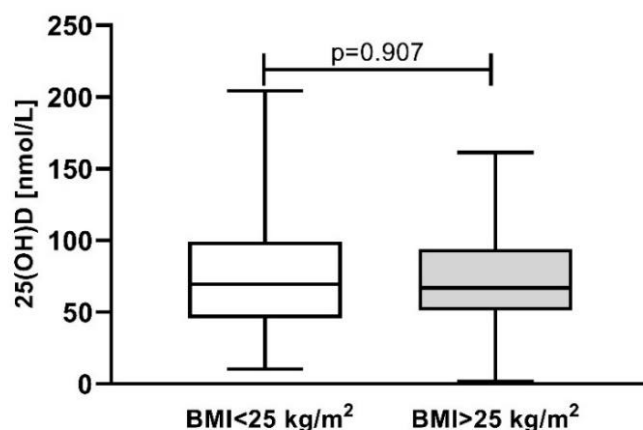
(BMI<25) – 185 на брой и с наднормено тегло и затлъстяване (BMI≥25) – 74 на брой, 12 от които са с BMI≥30. В таблица 26 са посочени серумните нива на 25(OH)D в тези групи, класифицирани според телесния им индекс.

**Табл.26** Серумни нива на 25(OH)D при бременни жени с нормален и наднормен BMI.

BMI	N (%)	25(OH)D [nmol/L] Mean±SD	25(OH)D [nmol/L] Median (IQR)
<25	185 (71.43%)	76.59±39.53	69.65 (46.03 – 99.27)
≥25	74 (28.57%)	74.43±34.91	66.88 (51.20 – 93.99)

Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Median – медиана, IQR – интерквартилен обхват

Въпреки, че е има леко понижаване на средната стойност на 25(OH)D при жените с висок BMI, при провеждане на Mann-Whitney теста не се откриват статистически значими различия в серумните нива на 25(OH)D между групата с нормално телесно тегло и тази с наднормено тегло (фигура 17).



**Фиг.17** Сравнение на серумните нива на 25(OH)D между групата с нормално телесно тегло и тази с наднормено тегло (сравнителният анализ е направен с помощта на Mann-Whitney теста).

В таблица 27 са посочени серумните нива на 25(OH)D в трите основни групи, подразделени според индекса им на телесна маса.

**Табл. 27** Серумни нива на 25(OH)D при здрави бременни жени и жени с GDM и прееклампсия, подразделени според индекса им на телесна маса

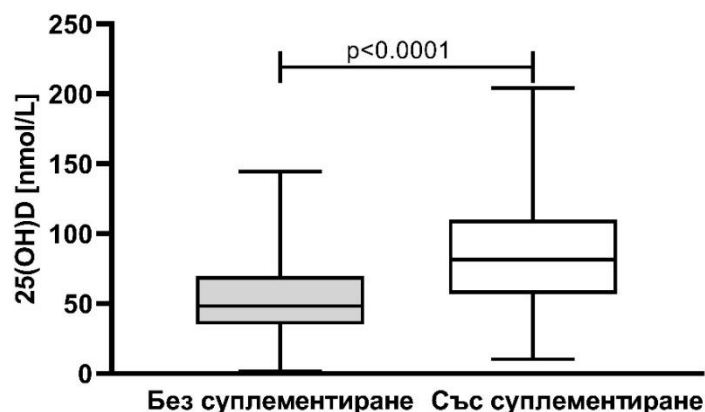
Група бременни жени	N (%)	25(OH)D [nmol/l] Mean±SD	25(OH)D (nmol/l) Median [IQR]	*P value
<b>I-ва група</b> BMI<25 BMI≥25	125 (74.85%) 42 (25.15%)	85.76±34.14 73.25±37.95	82.33 (56.92 – 116.80) 67.25 (45.85 – 94.36)	p=0.035
<b>II-ра група</b> BMI<25 BMI≥25	32 (74.42%) 11 (25.58%)	77.77±40.43 61.92±31.59	69.64 (42.78 – 104.20) 62.80 (45.30 – 76.03)	p=0.446
<b>III-та група</b> BMI<25 BMI≥25	28 (57.14%) 21 (42.86%)	91.19±46.73 60.47±31.85	90.20 (55.08 – 116.30) 53.80 (42.23 – 67.05)	p=0.011

I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – бременни жени с GDM, III-та група – бременни жени с прееклампсия, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Median – медиана, IQR – интерквартилен обхват (\*p стойността е изчислена за отделните групи с помощта на Mann-Whitney тест)

Посочените в таблицата данни сочат, че стойностите на 25(OH)D са по-високи при жените с нормално телесно тегло, но статистически значими различия се установяват за групите жени с нормална бременност и при тези с PE, докато при жените с GDM статистическата значимост се губи, вероятно поради малкия брой жени, включени в тази група. При провеждане на one-way ANOVA теста за изследване на междугруповите различия в серумните нива на 25(OH)D според BMI, се установяват статистически значими различия в трите изследвани групи с BMI≥25 (F=4.881, p=0.0105), но не и при жените с BMI<25 (F=2.048, p=0.1322).

#### **2.4. Зависимост на витамин D статуса от приема на витамин D като фармацевтичен продукт и/или хранителни добавки, съдържащи витамина, за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи.**

От всички анкетиранни бременни жени, включени в проучването, 85 (32.82%) не съобщават за прием на витамин D като фармацевтичен продукт и/или хранителни добавки, съдържащи витамина. Средната измерена стойност на серумните нива на 25(OH)D при несуплементирани жени е 56.05±29.78 nmol/l (медиана: 48.18 nmol/l и интерквартилен обхват: 35.18 – 69.65 nmol/l). Над две трети от изследваните жени (n=174, 67.18%) са суплементирани с витамин D препарати, като тяхната средна измерена стойност на серумните нива на 25(OH)D е 86.41±38.50 nmol/l (медиана: 81.53 и интерквартилен обхват nmol/l (56.97 – 110.10)). С помощта на Mann-Whitney теста се доказва статистически значимо различие между двете групи (фигура 18).



**Фиг.18** Серумни нива на 25(OH)D при несуплементирани и суплементирани с витамин D препарати бременни жени (данните са представени чрез медианата и минимален-максимален обхват; Mann-Whitney тест е използван за доказване на статистическото различие между групите)

Интересно е дали честотното разпределение на жените според витамин D статуса им е различно в зависимост от приема на витамин D препарати. Резултатите са посочени в таблица 28. Видно е, че има съществено различие в разпределението – близо 60% от жените, които се суплементират достигат до оптимални серумни нива на 25(OH)D, докато само 21% от несуплементираните достигат до нива, сочещи достатъчност. Обратно, около 3% са с абсолютен дефицит при суплементираните жени, а при несуплементираните процентът нараства до 8.24%.

**Табл.28** Разпределение на бременните жени според витамин D статуса им в зависимост от приема на витамин D препарати

Витамин D статус	Без витамин D прием N (%)	С витамин D прием N (%)
Дефицит (<25.0 nmol/L)	7 (8.24%)	5 (2.87%)
Изразена недостатъчност (25.01-50.0 nmol/L)	37 (43.53%)	16 (9.19%)
Недостатъчност (50.01 – 80.0 nmol/L)	23 (27.06%)	52 (29.89%)
Достатъчност (>80.01 nmol/L)	18 (21.17%)	101 (58.05%)
Общо	85 (100%)	174 (100%)

При провеждане на Chi-квадрат анализа се доказва статистически значимо различие в разпределението на бременните жени според витамин D статуса им в зависимост от приема на витамин D препарати ( $\chi^2 = 52.92, p < 0.0001$ ).

В таблица 29 са представени данни за среднодневния прием на витамин D препарати от бременните жени в трите основни изследвани групи.

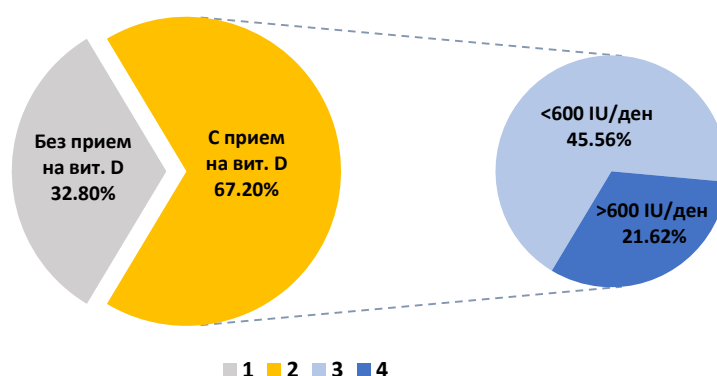
**Табл.29** Среднодневно суплементиране с витамин D препарати в трите основни групи бременни жени.

Изследвани групи бременни жени	Прием витамин D (IU/d) Mean±SD	Прием витамин D (IU/d) Min – Max range
I-ва група	540.12±706.00	0 – 3400
II-ра група	677.42±934.46	0 – 3400
III-та група	212.24±295.54	0 – 1200

I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – бременни жени с GDM, III-та група – бременни жени с прееклампсия, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална дози ежедневен прием на витамин D препарати

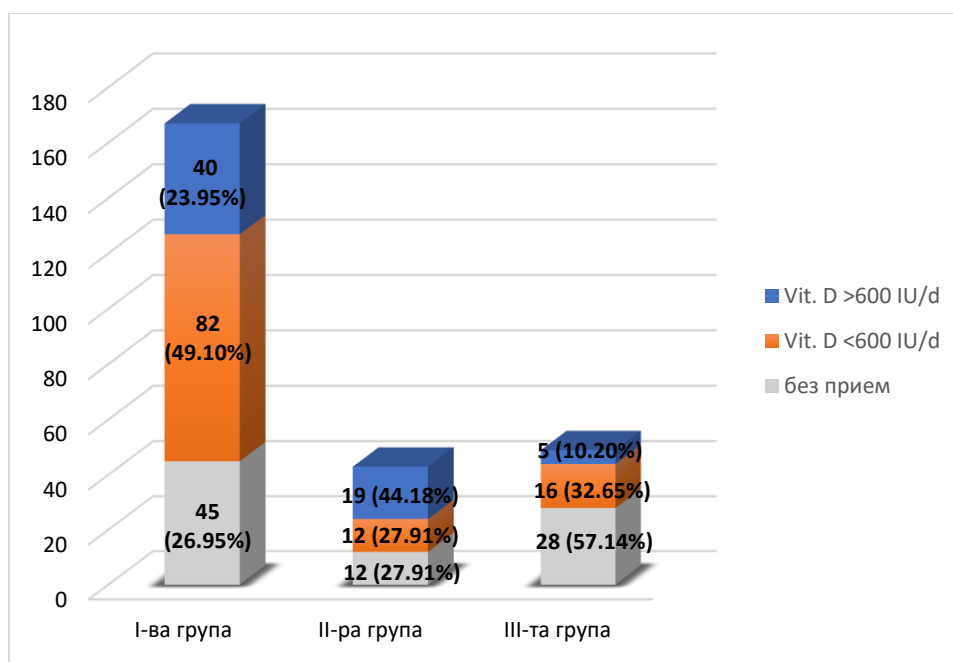
От таблицата се вижда, че най-ниската средна и максимална дневни дози на ежедневен прием на витамин D препарати (IU/ден) се установява в групата на бременните жени с прееклампсия.

Според Института по Медицина към Националната академия на САЩ [147] и съгласно Наредба № 1 на МЗ на Република България от 22 януари 2018 [344] изискуемият минимален дневен прием на витамин D от бременни жени е 600 IU/ден, което послужи и като критерий за подразделяне на суплементираните жени в две допълнителни групи. Доза <600 IU/ден приемат 45.56% (n=118) от участниците и само 21.62% (n=56) получават витамин D в доза >600 IU/ден. Фигура 19 илюстрира честотното разпределение на бременните жени според ежедневния прием на витамин D (IU/d) като фармацевтичен продукт или като елемент от мултивитаминни препарати и хранителни добавки.



**Фиг.19** Разпределение на бременните жени според ежедневния им прием на витамин D (1 – бременни жени без суплементиране с витамин D препарати, 2 – бременни жени със суплементиране с витамин D препарати, 3 – суплементирани с витамин D <600 IU/d, 4 – суплементирани с витамин D >600 IU/d).

Освен това общо разпределение, интерес представлява дали трите основни изследвани групи се различават помежду си според приема на витамин D препарати. Фигура 20 представя честотното разпределение на бременните жени от тези групи според дозата на ежедневния им прием на витамин D продукти. От тази фигура ясно проличават различията между групите по отношение на суплементирането им с витамин D препарати, като прави силно впечатление високият процент на липсата на прием на витамин D в групата на бременните жени с прееклампсия (57.14%). В другите две групи бременни жени делът на несуплементираните е двукратно по-нисък (26.95% и 27.91% съответно за здравите бременни жени и тези с GDM).



**Фиг.20** Разпределение на бременните жени в трите основни групи според ежедневния им прием на витамин D (I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – бременни жени с GDM, III-та група – бременни жени с прееклампсия)

При използване на chi-квадрат анализа се установи статистически значима разлика относно честотното разпределение на жените от трите изследвани групи според приема им на витамин D препарати (липсващ, неадекватен, адекватен),  $\chi^2=26.71$ ,  $p<0.0001$ .

Използвайки вариационния one-way ANOVA анализ установихме, че статистически значими различия между групите има не само по отношение на приема на витамин D, но и по отношение на приеманите единици дневно ( $F=4.16$ ,  $p=0.017$ ) (таблица 30).

**Табл.30** Сравнителен анализ в трите основни групи изследвани жени относно  
ежедневния им прием на витамин D препарати

Витамин D		N	Mean	SD	Min	Max	ANOVA F
Прием на витамин D (IU/d)	I-ва група	167	540.12	706.00	0	3400	<b>F=4.16, p=0.017</b>
	II-ра група	43	677.42	934.46	0	3400	
	III-та група	49	212.25	295.55	0	1200	
	Общо	259	580.31	161.30	0	3400	

I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – бременни жени с GDM, III-та група – бременни жени с преeklampсия, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min – Max range – обхват, заключен между минималната и максимална дози ежедневен прием на витамин D препарати

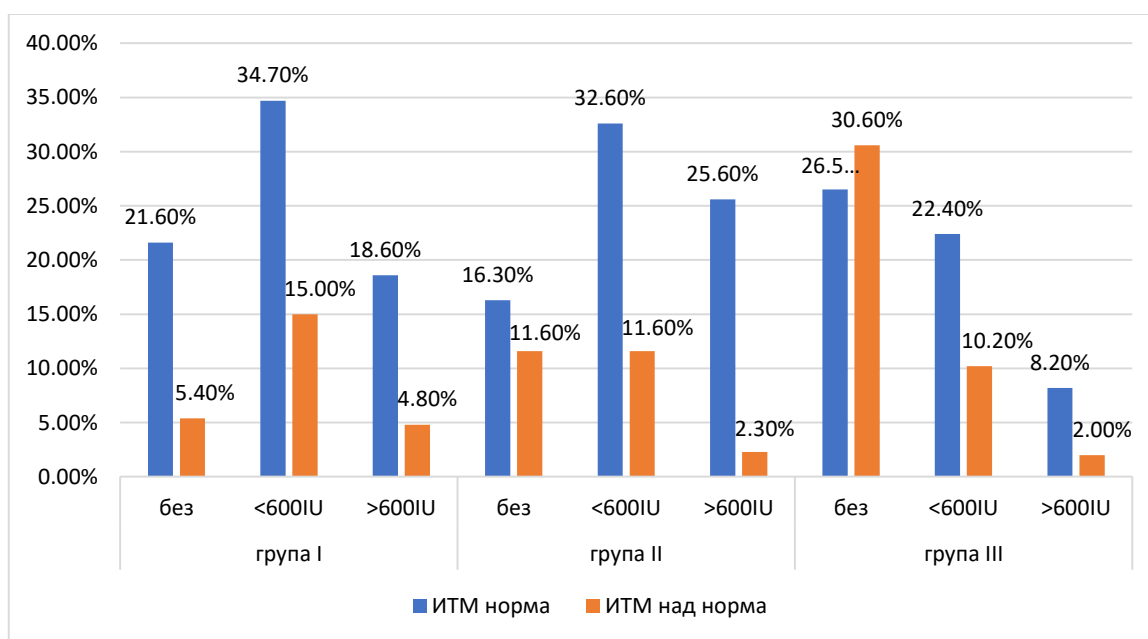
Направеният one way ANOVA анализ по отношение приема на витамин D показва статистически значими разлики между здравите бременните жени и тези с преeklampсия ( $540.12 \pm 706.00$  vs  $212.25 \pm 295.54$  съответно,  $p=0.034$ ), както и между бременните жени с GDM и бременните жени с преeklampсия ( $677.42 \pm 934.46$  vs  $212.25 \pm 295.55$  съответно,  $p=0.014$ ).

В таблица 31 е посочено разпределението на жените според техния прием на витамин D и телесното им тегло. Около една четвърт от бременните жени с нормален BMI ( $n=46$ ) приемат дневно оптимална доза на витамин D ( $\geq 600$  IU), малко под една трета от тях ( $n=56$ ) изобщо не се суплементират, а около 45% приемат неадекватна доза  $< 600$  IU дневно. Що се касае за бременните жени с наднормено тегло, само 10 от тях приемат ежедневно витамин D в оптимална доза ( $\geq 600$  IU), което като дял е почти два пъти по-малко от дела на жените с нормален BMI и суплементирани адекватно. Почти половината от жените с наднормено тегло ( $n=35$ ) примат недостатъчно количество от витамина ( $< 600$  IU), а 29 от тях или близо 40% не се суплементират изобщо. Въпреки че като цяло се остава с впечатлението, че жените с висок BMI имат по-ниска нагласа да се суплементират, непараметричният chi-квадрат анализ не доказва статистически значими различия ( $\chi^2 = 4.50$ ,  $p=0.1054$ ) в честотното разпределение

**Табл.31** Прием на витамин D (IU/ден) при жени с нормално и наднормено тегло в цялата извадка.

ВМІ (kg/m <sup>2</sup> )	Без прием на витамин D N (%)	Прием на витамин D <600IU/ден N (%)	Прием на витамин D ≥600IU/ден N (%)
<25 (n=185)	56 (30.27%)	83 (44.86%)	46 (24.87%)
≥25 (n=74)	29 (39.19%)	35 (47.30%)	10 (13.51%)
Общо (n=259)	85 (32.82%)	118 (45.56%)	56 (21.62%)

Приемът на витамин D според ВМІ в трите основни групи бременни жени е представен на фигура 21. При анализа на резултатите, посочени в тази фигура, отново проличава тенденцията на бременните жени с висок ВМІ да имат по-ниска нагласа към суплементиране, най-ярко проявена в групата на жените с РЕ.



**Фиг. 21** Честотно разпределение на бременните жени в трите основни групи според ВМІ и приема на витамин D препарати, изразен в IU (ИТМ норма – ВМІ <25 kg/m<sup>2</sup>; ИТМ над норма – ВМІ ≥25 kg/m<sup>2</sup>; I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – бременни жени с GDM, III-та група – бременни жени с прееклампсия)

В таблица 32 са представени корелационните зависимости между приема на витамин D, ВМІ при бременни жени с нормално и наднормено тегло и серумните нива на 25(OH)D.

**Табл.32** Корелационни зависимости между приема на витамин D, BMI и серумните нива на 25(OH)D

			BMI категории	Без прием на витамин D	С прием на витамин D	25(OH)D (nmol/l)	
Spearman's rho	BMI категории	rho	1.000	-0.123*	<b>-0.179*</b>	-0.008	
		p	.	0.047	<b>0.023</b>	0.907	
	Без прием на витамин D	rho	-0.0123*	1.000	0.971**	0.512**	
		p	0.047	.	0.000	0.000	
	С прием на витамин D	rho	-0.179*	0.971**	1.000	<b>0.556**</b>	
		p	0.023	0.000	.	<b>0.000</b>	
	25(OH) D nmol/l	rho	-0.008	0.512**	0.0556**	1.000	
		p	0.907	0.000	0.000	.	
	** Корелацията е сигнификантна при 0.05 (2-tailed).						
	* Корелацията е сигнификантна при 0.01 (2-tailed).						

Установява се значима, но слаба отрицателна корелационна зависимост м/у BMI и прием на витамин D (Spearman's rho = -0.179, p = 0.023), както и положителна и значителна по степен корелационна зависимост м/у прием на витамин D и серумни нива на 25(OH)D (Spearman's rho = 0.556, p <0.0001).

### **2.5. Влияние на витамин D статуса относно неблагоприятния изход от бременността по отношение на новороденото и възникването на преждевременно раждане и раждане на дете с ниско тегло при здрави бременни и жени с усложнения на бременността**

В настоящото проучване 32 от общо 257 новородени са преждевременно родени или честотата на бременностите с такъв неблагоприятен изход (РТВ) е 12.45%. Най-висока е честотата на усложнението в групата на бременните жени с прееклампсия – 45.83% (n=22), последвана от 6.98% (n=3) за бременните жени с GDM и 4.21% (n=7) при здравите контроли.

За да оценим ролята на витамин D статуса относно РТВ, първоначално изследвахме честотата на това усложнение в зависимост от приема на витамина като фармацевтичен препарат и/или хранителна добавка (липсващ, <600IU/ден, >600IU/ден) (таблица 33).

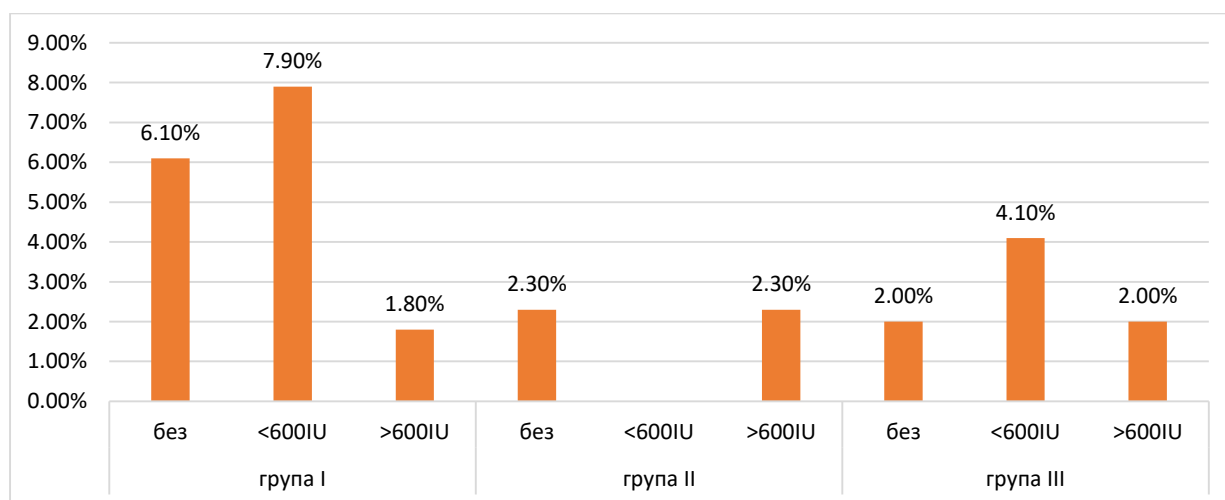


**Табл.33** Честотно разпределение на бременните жени според продължителността на бременността и приема на витамин D препарати за цялата изследвана кохорта

Продължителност на бременността	Без прием на витамин D n (%)	Прием на витамин D <600IU/ден n (%)	Прием на витамин D >600IU/ден n (%)	Общо n (%)
>37 г.с.	73 (32.44%)	101 (44.89%)	51 (22.67%)	225 (100%)
<37 г.с.	12 (37.50%)	15 (46.88%)	5 (15.62%)	32 (100%)

Резултатите, посочени в таблицата, показват, че приблизително еднакъв процент от двете групи жени (родили в термин и такива, родили преждевременно) са суплементирани с витамин D в доза под изискуемия минимум от 600 IU/ден (44.89% vs 46.88% съответно). Делът на несуплементираните е по-висок при преждевременно родилите в сравнение с родилите на термин (37.50% vs 32.44% съответно) и обратно делът на суплементираните с адекватна доза витамин D е по-висок при жените, родили на термин в сравнение с преждевременно родилите 51 (22.67% vs 15.62%, съответно). Провеждането на непараметричен хи-квадрат анализ за установяване на достоверни различия между посочените категории жени не доказва наличие на статистически значими различия ( $X^2=0.879$ ,  $p=0.645$ ).

Проучихме и какъв е приемът на витамин D при жените от трите основни групи, при които е настъпило преждевременно раждане. Резултатите са представени на фигура 22.



**Фиг.22** Честотно разпределение на бременните жени с преждевременно раждане в трите основни групи според приема на витамин D (I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – жени с GDM, III-та група – жени с прееклампсия)

Според честотното им разпределение можем да заключим, че при здрави бременни жени и жени с преекламписия вероятността от настъпване на преждевременно раждане е по-малка при тези от тях, които са суплементирани с адекватна доза витамин D (>600 IU/ден) в сравнение с тези, които са несуплементирани или суплементирани с ниска доза витамин D (<600 IU). Подобна тенденция в групата на жените GDM не се наблюдава.

Проучихме и зависимостта на неблагоприятен изход от бременността като РТВ в трите основни изследвани групи както от приема на витамин D, така и от серумните концентрации на 25(OH)D посредством корелационен анализ по метода на Spearman. Резултатите от анализа са представени в таблица 34 Положителна и умерено силна корелационна зависимост се установи между серумните нива на 25(OH)D и продължителността на бременността при жените с преекламписия ( $\rho=0.358$ ,  $p=0.016$ ), както и между серумните нива на 25(OH)D и прием на витамин D препарати ( $\rho=0.410$ ,  $p=0.014$ ), т.е възможността от настъпване на преждевременно раждане намалява с увеличаване на приема на витамин D и серумните нива на 25(OH)D. Сред здравите бременни жени се установи увеличаващ се риск от РТВ с намаляване на приема на витамин D препарати в периода на бременността ( $\rho=0.273$ ,  $p=0.007$ ), както и умерена корелационна зависимост между прием на витамин D препарати и серумни нива на 25(OH)D ( $\rho=0.498$ ,  $p<0.0001$ ). В групата на бременните жени с GDM се установи силна корелационна връзка между прием на витамин D препарати и серумни нива на 25(OH)D ( $\rho=0.848$ ,  $p<0.0001$ ), но слабо увеличаващият се риск от РТВ с намаляване на приема на витамин D и серумните нива на 25(OH)D не достигна статистическа достоверност ( $\rho=0.167$ ,  $p=0.416$  и  $\rho=0.138$ ,  $p=0.382$  съответно).

**Табл.34** Корелационни зависимости между прием на витамин D, серумни концентрации на 25(OH)D и продължителност на бременността по групи.

Здрави бременни жени			Нормална продължителност/РТВ	С прием на витамин D	25(OH)D (nmol/l)
Spearman's rho	Нормална продължителност/РТВ	rho	1.000	<b>0.273**</b>	0.052
		p	.	<b>0.007</b>	0.524
	С прием на витамин D	rho	0.273**	1.000	<b>0.498**</b>
		p	0.007	.	<b>0.000</b>
	25(OH)D (nmol/l)	rho	0.052	0.498**	1.000
		p	0.524	0.000	.
Бременни жени с GDM			Норма/РТВ	С прием на витамин D	25(OH)D nmol/l
Spearman's rho	Нормална продължителност/РТВ	rho	1.000	0.167	0.138
		p	.	0.416	0.382
	С прием на витамин D	rho	0.167	1.000	<b>0.848**</b>
		p	0.416	.	<b>0.000</b>
	25(OH)D (nmol/l)	rho	0.138	0.848**	1.000
		p	0.382	0.000	.
Бременни жени с прееклампсия			Норма/РТВ	С прием на витамин D	25(OH)D nmol/l
Spearman's rho	Нормална продължителност/РТВ	rho	1.000	0.314	<b>0.358*</b>
		p	.	0.055	<b>0.016</b>
	С прием на витамин D	rho	0.314	1.000	<b>0.410*</b>
		p	0.055	.	<b>0.014</b>
	25(OH)D nmol/l	rho	0.358	0.410*	1.000
		p	0.016	0.014	.
* Корелацията е сигнификантна при 0.05					
** Корелацията е сигнификантна при 0.01					

Подобен подход използвахме и при оценяване влиянието на витамин D статуса на бременните жени относно друг неблагоприятен изход от бременността, а именно раждане на новородено с ниско тегло (LBW).

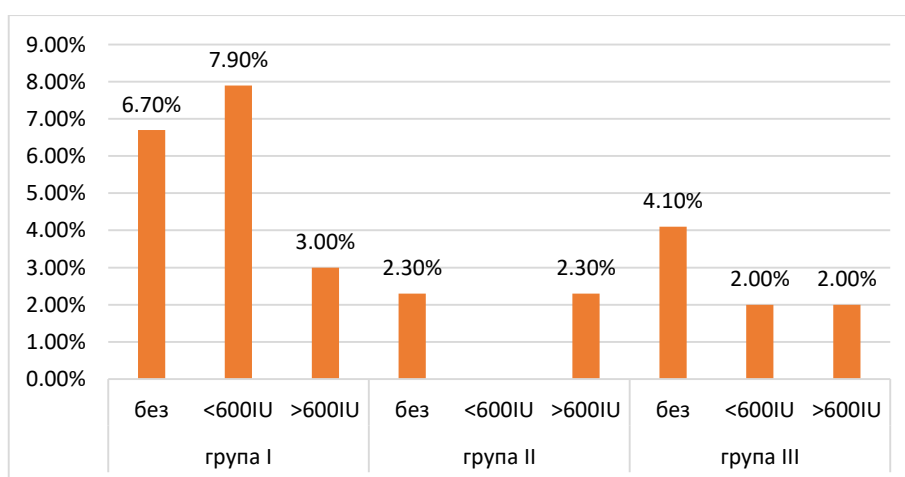
В таблица 35 е показано честотно разпределение на бременните жени според приема на витамин D препарати за цялата изследвана кохорта и теглото на техните новородени.

**Табл.35** Честотно разпределение на бременните жени според приема на витамин D препарати за цялата изследвана кохорта и теглото на техните новородени.

Тегло при раждане	Без прием на витамин D n (%)	Прием на витамин D <600IU/ден n (%)	Прием на витамин D >600IU/ден n (%)	Общо n (%)
Нормално тегло (>2500g).	58 (26.00%)	113 (50.67)	52 (23.32%)	223 (100%)
Ниско тегло (<2500g)	27 (79.41%)	5 (14.70%)	2 (5.88%)	34 (100%)

Резултатите, посочени в таблицата, показват, че процентът на несуплементираните жени, родили LBW дете е три пъти по-голям от този на жените, родили дете с нормално тегло (79.41% vs. 26.00% съответно). При суплементираните с витамин D препарати <600UI съотношението е точно обратно – 3.45 пъти спада процентът за раждане на дете с ниско тегло (50.67% vs. 14.70%), а при адекватно суплементираните има почти четирикратно спадане на процента (23.32% vs. 5.88%). При провеждане на Chi-квадрат анализа се установи статистическа достоверност между посоченото в таблица 35 честотно разпределение на жените ( $\chi^2=38.02$ ,  $p<0.0001$ ).

Проучихме и какъв е приемът на витамин D при жените от трите основни групи, родили деца с ниско тегло. Резултатите са представени на фигура 23.



**Фиг.23** Честотно разпределение на бременните жени, родили деца с ниско тегло в трите основни групи според приема на витамин D (I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – жени с GDM, III-та група – жени с прееклампсия)

Според честотното им разпределение можем да заключим, че при здрави бременни жени и жени с преекламписия вероятността от раждане на дете с ниско тегло е по-малка при тези от тях, които са суплементирани с адекватна доза витамин D (>600 IU/ден) в сравнение с тези, които са несуплементирани или суплементирани с ниска доза витамин D (<600 IU). Подобна тенденция в групата на жените GDM не се наблюдава.

Направихме и сравнение на средните стойности за витамин D прием и серумните нива на 25(OH)D при бременните жени, родили деца с нормално тегло спрямо тези, родили деца с ниско тегло посредством t-тест за независими извадки (таблица 36).

**Табл.36** Сравнителен анализ относно средните стойности на витамин D прием, серумни концентрации на 25(OH)D при жени, родили новородени с нормално тегло и жени, родили деца с ниско тегло за цялата изследвана кохорта

Категория на новородените според теглото	Прием на витамин D (IU/ден) Mean±SD	95% CI	t-test p-value
Нормално	824.26±2167.65	[-58.7; 11.98]	t=0.667, p=0.506
LBW	525.00±810.39		
Категория на новородените според теглото	25(OH)D (nmol/l) Mean±SD	95% CI	t-test p-value
Нормално	76.17±38.33	[-13.22; 14.94]	t=0.121, p=0.904
LBW	75.31±40.40		

Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, CI – доверителен интервал, LBW – дете с ниско тегло при раждането.

Прави впечатление, че средната стойност на приеманите единици витамин D е ниска (525±810.39) при жените с новородено с ниско тегло в сравнение с тази на жените, родили новородено с нормално тегло (824.26±2167) и е под изискуемия минимален прием от 600 IU/ден. Въпреки това при проведения сравнителен анализ не се установи статистическа значимост в средните стойности на приема между двете сравнявани групи (t=0.667, p=0.506), вероятно дължащо се на твърде голямата стойност на стандартното отклонение. Не се установи и статистически значимо различие между серумните нива на 25(OH)D в така подразделените групи (76.17±38.33 vs. 75.31±40.40, t=0.121, p=0.904).

Проучихме и зависимостта за раждане на дете с ниско тегло както от приема на витамин D, така и от серумните концентрации на 25(OH)D в трите основни изследвани групи посредством корелационен анализ по метода на Spearman. Резултатите от анализа са представени в таблица 37.

**Табл.37** Корелационни зависимости между серумните нива на 25(OH)D, прием на витамина и риск от раждане на новородено с ниско тегло в трите основни изследвани групи.

Здрави бременни жени			Нормално тегло/Ниско тегло	С прием на витамин D	25(OH) nmol/l
Spearman's rho	Нормално тегло/Ниско тегло	rho	1.000	0.165	0.037
		p	.	0.108	0.647
	С прием на витамин D	rho	0.165	1.000	<b>0.498**</b>
		p	0.108	.	<b>0.000</b>
	25(OH) nmol/l	rho	0.037	0.498**	1.000
		p	0.647	0.000	.
Бременни жени с GDM			Нормално тегло/Ниско тегло	С прием на витамин D	25(OH) nmol/l
Spearman's rho	Нормално тегло/Ниско тегло	rho	1.000	0.167	0.138
		p	.	0.416	0.382
	С прием на витамин D	rho	0.167	1.000	<b>0.848**</b>
		p	0.416	.	<b>0.000</b>
	25(OH) nmol/l	rho	0.138	0.848**	1.000
		p	0.382	0.000	.
Бременни жени с прееклампсия			Нормално тегло/Ниско тегло	С прием на витамин D	25(OH) nmol/l
Spearman's rho	Нормално тегло/Ниско тегло	rho	1.000	0.041	0.045
		p	.	0.805	0.769
	С прием на витамин D	rho	0.041	1.000	<b>0.410*</b>
		p	0.805	.	<b>0.014</b>
	25(OH)D nmol/l	rho	0.045	0.410*	1.000
		p	0.769	0.014	.
* Корелацията е сигнификантна при 0.05					
** Корелацията е сигнификантна при 0.01					

Проведеният анализ не доказва корелационни зависимости както между приема на витамин D, така и между серумните нива на 25(OH)D с раждането на дете с ниско тегло.

На таблица 38 са представени средните серумни концентрации на 25(OH)D от обединените резултати, получени при двете групи жени с възникнало усложнение на

бременността (пreekлампсия и GDM), родили новородено с нормално тегло и такива, родили дете с ниско тегло.

**Табл.38** Серумни концентрации на 25(OH)D при бременните жени с усложнения, родили дете с LBW и нормално тегло.

Категория на новородените според теглото	25(OH)D (nmol/l) Mean±SD	SEM (nmol/l)
Нормално телесно тегло	74.74±39.05	6.17
LBW	51.20±22.66	16.02

Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, SEM – стандартна грешка  
LBW – дете с ниско тегло при раждането.

Въпреки че не се доказва статистически значима разлика между измерените средни стойности на серумните нива на 25(OH)D в двете таргетни групи ( $t=0.839$ ,  $p=0.407$ ; 95% CI: -33.18 – 30.25), прави впечатление, че те са с 31.09% по-високи при жените, родили дете с нормално телесно спрямо тези, родили LBW дете.

### 3. Витамин B12 статус на бременните жени

#### 3.1. . Серумни нива на тотален витамин B12, активен витамин B12 и метилмалонова киселина и определяне честотата на витамин B12 дефицит или недостатъчност.

Съгласно съвременния подход за оценка на витамин B12 статуса [54], с цел откриване и доказване на наличен витамин B12 дефицит или недостатъчност, на бременните жени, включени в проучването, са измерени серумните концентрации на тотален витамин B12, активен витамин B12 и метилмалонова киселина. Тъй като нивата на хомоцистеин се повлияват не само от дефицита на кобаламин, но и от дефицита на фолиева киселина, серумните концентрации на параметъра не са определяни.

Измерването на тотален витамин B12 при бременните жени в проучването е извършено чрез автоматизиран имунологичен анализатор ACCESS 2, базиран на принципа на директната хемилуминисценция. Средната стойност на параметъра за цялата изследвана група е  $177.58\pm 90.24$  pmol/l (медиана 429 pmol/l; обхват 76 – 782 pmol/l).

Серумните концентрации на активен витамин B12 на бременните жени в проучването са измерени посредством имунологичен анализатор ARCHИТЕСТ, базиран на принципа на хемилуминисцентен имуноанализ усилен с микрочастици. Средната стойност на holo-TC за всички изследвани лица е  $73.26\pm 53.25$  pmol/l (медиана 273.70 pmol/l; обхват 16.40 – 531 pmol/l).

Серумните концентрации на метилмалонова киселина (ММА) в проучването са измерени посредством селективен хроматографски метод, като средната изчислена стойност на параметъра за всички бременни жени е  $249.53 \pm 154.73$  nmol/l (медиана 584.34 nmol/l; обхват 40.94 – 1127.74 nmol/l).

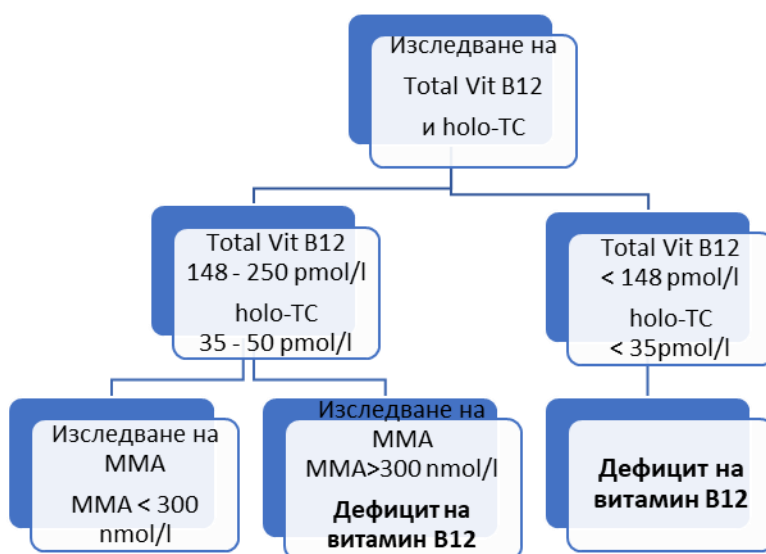
В таблица 39 са представени данни за минимална, максимална, средна стойност и стандартно отклонение за всеки един от посочените параметри при бременните жени по групи – здрави, с GDM и с прееклампсия.

**Табл.39** Стойности на тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА в трите основни групи бременни жени.

Лабораторен параметър	Mean $\pm$ SD			Min – Max Range		
	I-ва	II-ра	III-та	I-ва	II-ра	III-та
Total Vit B12 (pmol/l)	175.43 $\pm$ 87.72	206.32 $\pm$ 113.72	159.68 $\pm$ 68.97	87–782	89–588	76–416
Holo-TC (pmol/l)	69.92 $\pm$ 50.36	88.18 $\pm$ 61.85	71.55 $\pm$ 53.68	17.30–531	16.40–359	18–300
ММА (nmol/l)	250.30 $\pm$ 157.03	245.07 $\pm$ 146.47	250.55 $\pm$ 156.91	40.94–1127.7	82.95–691.35	50.01–594.63

Total Vit B12 – тотален витамин В12, Holo-TC – активен витамин В12, ММА – метилмалонова киселина; Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min-Max Range – референтен интервал; I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – бременни жени с гестационен диабет, III-та група – бременни жени с прееклампсия

За определяне на витамин В12 статуса на включените в проучването бременни жени, първоначално бе избран предложението от Carmel (2006) алгоритъм [55], представен графично на фигура 24.



**Фиг.24** Алгоритъм за определяне на витамин В12 статуса при бременните жени.



В нашето проучване тотален витамин В12 < 148 pmol/l (дефицит) е измерен при 47.87% (n=124) от всички изследвани бременни жени, а стойности между 148 и 250 pmol/l (недостатъчност) са установени при 38.61% (n=100) от участниците. Нива на общ витамин В12 над 250 pmol/l или достатъчност на витамина се откри само при 13.51% (n=35) от участниците.

Активен витамин В12 < 35 pmol/l (дефицит) е измерен при 13.89% (n=36) от бременните жени, а стойности между 35 и 50 pmol/l (недостатъчност) са установени при 22.39% (n=58) от участниците. Преобладават жените с нива на серумен holo-TC над 50 pmol/l – 63.70% (n=165).

По отношение на метаболитния параметър MMA, серумни концентрации над 300 pmol/l, доказващи витамин В12 дефицит са измерени при 31.65% (n=69) от изследваните бременни жени. Участниците с нива на MMA < 300 pmol/l са 68.34% (n=149). В таблица 40 е представена честота на разпространение на витамин В12 дефицит и недостатъчност според критериите на Carmel в трите основни групи бременни жени.

**Табл.40** Честота на разпространение на витамин В12 дефицит и недостатъчност при бременните жени по групи.

Група бременни жени	Total Vit B12 < 148 pmol/l	Total Vit B12 148-250 pmol/l	Holo-TC < 35 pmol/l	Holo-TC 35 - 50 pmol/l	MMA > 300 nmol/l
I-ва група	48.50% (n=81)	38.32% (n=64)	14.97% (n=25)	22.15% (n=37)	28.74% (n=48)
II-ра група	34.88% (n=15)	44.18% (n=19)	9.30% (n=4)	20.93% (n=9)	23.26% (n=10)
III-та група	57.14% (n=28)	34.69% (n=17)	14.28% (n=7)	30.61% (n=15)	22.45% (n=11)

Total Vit B12 – тотален витамин В12, Holo-TC – активен витамин В12, MMA – метилмалонова киселина; I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – бременни жени с гестационен диабет, III-та група – бременни жени с прееклампсия

При провеждане на one way ANOVA анализа за сравнение на трите основни групи бременни жени относно средните измерени стойности на витамин В12 показателите в извадката се установи, че статистически значими различия се откриват единствено за параметъра тотален витамин В12 (F=3.24, p=0.040), както и тенденция за статистически значими различия за MMA (F=5.209, p=0.06), посочени в таблица 41.

**Табл.41** Сравнителен анализ на измерените средни стойности на параметрите тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА в трите основни групи бременни жени.

		Mean	SD	Min	Max	ANOVA F
Total vit B12 pmol/l	Здрави	175.43	87.72	87.00	782.00	<b>F=3.24, p=0.040</b>
	GDM	206.32	113.72	89.00	588.00	
	Прееклампсия	159.68	68.97	76.00	416.00	
	Общо	177.58	90.24	76.00	782.00	
Active vit B12 pmol/l	Здрави	69.92	50.36	17.30	531.00	F=2.05, p=0.130
	GDM	88.18	61.85	16.40	359.00	
	Прееклампсия	71.55	53.68	18.00	300.00	
	Общо	73.26	53.25	16.40	531.00	
ММА nmol/l	Здрави	202.46	166.04	244.91	298.31	<b>F=5.209, p=0.06</b>
	GDM	245.07	89.75	165.81	228.44	
	Прееклампсия	271.61	131.58	155.87	249.12	
	общо	249.53	154.73	228.87	270.18	

Total vit B12 – тотален витамин В12, Active vit B12 – активен витамин В12, ММА – метилмалонова киселина, N – брой, Mean – средна стойност, Min – минимална стойност, Max – максимална стойност, SD – стандартно отклонение

Съпоставимите групови разлики в средните измерени стойности бяха анализирани при всички показатели в изследваните групи, а достоверните различия измерени по метода на Tukey. Резултатите са представени в таблица 42.

**Табл.42** Сравнения между трите основни групи бременни жени по метода на Tukey.

Сравнение между групите бременни жени							
	Диагноза	Диагноза	Средна разлика	SEM	p	95% CI	
						долен	горен
Total vit B12 pmol/l	Здрава	GDM	-30.89	15.29	0.110	-66.95	5.17
		Прееклампсия	15.74	14.53	0.525	-18.51	50.01
	GDM	Здрава	30.89	15.29	0.110	-5.17	66.95
		Прееклампсия	46.64*	18.69	0.035	2.57	90.71
	Прееклампсия	Здрава	-15.74	14.53	0.525	-50.01	18.51
		GDM	-46.64*	18.69	0.035	-90.71	-2.57
Active vit B12 pmol/l	Здрава	GDM	-18.25	9.06	0.111	-39.64	3.12
		Прееклампсия	-1.63	8.61	0.980	-21.94	18.68
	GDM	Здрава	18.25	9.06	0.111	-3.12	39.64
		Прееклампсия	16.62	11.08	0.292	-9.49	42.75
	Прееклампсия	Здрава	1.63	8.61	0.980	-18.68	21.94
		GDM	-16.62	11.08	0.292	-42.75	9.49
MMA nmol/l	Здрава	GDM	74.48*	28.81	0.028	6.47	142.49
		Прееклампсия	69.14*	29.17	0.049	0.2987	137.99
	GDM	Здрава	-74.48*	28.81	0.028	-142.49	-6.47
		Прееклампсия	-5.33	37.09	0.989	-92.89	82.22
	Прееклампсия	Здрава	-69.14*	29.17	0.049	-137.99	-0.29
		GDM	5.33	37.09	0.989	-82.22	92.89

\*. Средната разлика е значителна при 0.05

Total vit B12 – тотален витамин B12, Active vit B12 – активен витамин B12, MMA – метилмалонова киселина, SEM – стандартна грешка; 95% CI – доверителен интервал

Свидетелство за повишен дефицит на витамин B12 сред рисковите групи бременни жени доказваме и с корелационния анализ по Spearman ( $\rho = -0.209$ ,  $p = 0.002$ ). По-високи измерени стойности за метаболитния параметър MMA се откриват при бременните жени с прееклампсия и GDM (таблица 43).

**Табл.43** Корелационни зависимости между измерените концентрации на тотален В12, активен витамин В12 и ММА при бременните жени с усложнения.

		Диагноза	ТВ12 pmol/l	АВ12 pmol/l	ММА nmol/l
Spearman's rho	Диагноза	1.000	-0.018	0.036	-0.209**
		.	0.777	0.568	0.002
	ТВ12 pmol/l	-0.018	1.000	0.589**	-0.057
		0.777	.	0.000	0.405
	АВ12 pmol/l	0.036	0.589*	1.000	-0.019
		0.568	0.000	.	0.783
	ММА nmol/l	-0.209*	-0.057	-0.019	1.000
		0.002	0.405	0.783	.

ТВ12 – тотален витамин В12, АВ12 – активен витамин В12, ММА – метилмалонова киселина; корелационен анализ по Spearman's

### 3.2. Влияние на сезона върху витамин В12 статуса на изследваните бременни жени.

Тъй като биологичният материал на бременните жени е събиран в рамките на 2 години и 6 месеца бе възможно да се отчете влиянието на сезона върху измерените серумни концентрации на тотален, активен витамин В12 и ММА. В нашето проучване по-високи серумни концентрации на тотален и активен витамин В12 са измерени в серума на бременните жени, при които пробовземането е извършено през зимното полугодие. Средните измерени концентрации на метаболитния параметър ММА, са близки в двете полугодия. Резултатите за цялата изследвана кохорта са представени в таблица 44.

**Табл.44** Средни серумни концентрации и стандартно отклонение на тотален, активен витамин В12 и ММА, според месеца на убождане на бременните жени.

Вземане на биологичния материал	Total Vit B12 Mean±SD (pmol/l)	Holo-TC Mean±SD (pmol/l)	ММА Mean±SD (nmol/l)
Зимно полугодие	186.93 ± 100.25	78.02 ± 61.77	248.89 ± 147.21
Лятно полугодие	160.88 ± 64.94	64.78 ± 30.55	250.78± 167.69

Total Vit B12 – тотален витамин В12, Holo-TC – активен витамин В12, ММА – метилмалонова киселина, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение

### 3.3. Влиянието на индекса на телесната маса върху витамин В12 статуса за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи бременни жени.

С цел оценка влиянието на BMI върху статуса на витамин B12, изследваните бременни жени са подразделени в две основни групи: с нормално телесно тегло ( $BMI < 25$ ) – 185 на брой и с наднормено тегло и затлъстяване ( $BMI \geq 25$ ) – 74 на брой. В таблица 45 са посочени серумните нива на параметрите, отразяващи витамин B12 статуса в тези групи:

**Табл.45** Серумни нива на тотален витамин B12, активен витамин B12 и MMA при бременни жени с нормален и наднормен BMI.

BMI	N (%)	Total vit B12 Mean±SD (pmol/l)	Active vit B12 Mean±SD (pmol/l)	MMA Mean±SD (nmol/l)
<25	185 (71.43%)	167.74 ± 82.86	69.98 ± 53.62	266.39 ± 162.76
≥25	74 (28.57%)	202.19 ± 101.88	83.60 ± 50.31	201.90 ± 115.11

Total vit B12 – тотален витамин B12, Active vit B12 – активен витамин B12, MMA – метилмалонова киселина, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение

За да проверим каква е зависимостта между серумните концентрации на параметрите, отразяващи витамин B12 статуса и BMI на бременните жени, извършихме корелационен анализ по метода на Spearman. Резултатите от анализа не откриха статистически значима връзка между показателите ( $p > 0.05$ ) (таблица 46).

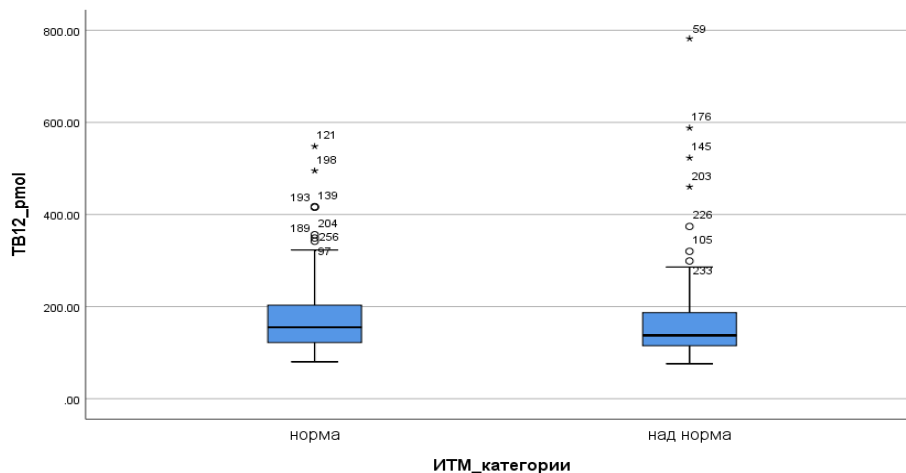
**Табл.46** Корелационни зависимости между показателите отразяващи статуса на витамин B12 и BMI при бременни с нормално и наднормено тегло.

Бременни жени - параметър			TB12 (pmol/l)	AB12 (pmol/l)	MMA (nmol/l)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )
Spearman's rho	TB12 (pmol/l)	rho	1.000	0.589**	-0.057	0-.078
		p	.	0.000	0.405	0.210
	AB12 (pmol/l)	rho	0.589**	1.000	-0.019	0.035
		p	0.000	.	0.783	0.578
	MMA (nmol/l)	rho	-0.057	-0.019	1.000	0.084
		p	0.405	0.783	.	0.214
	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	rho	-0.078	0.035	0.084	1.000
		p	0.210	0.578	0.214	.

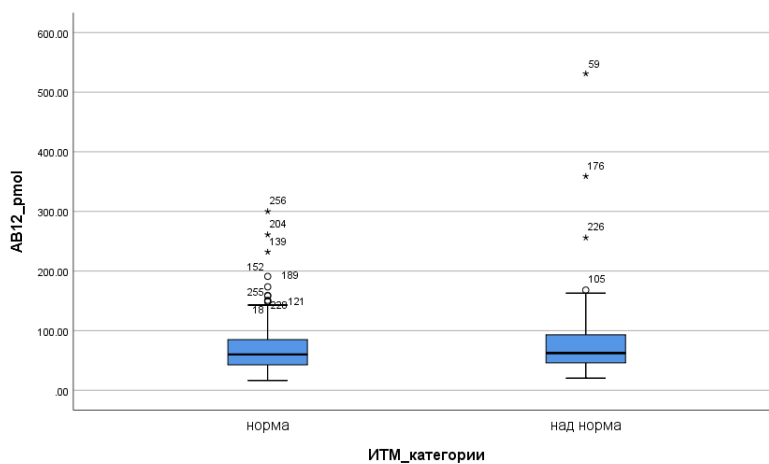
TB12 – тотален витамин B12, AB12 – активен витамин B12, MMA – метилмалонова киселина; корелационен анализ по Spearman's

Сравнителният анализ с box-plot графики потвърди липсата на различия между серумните нива на изследваните показатели ( $p > 0.05$ ). Бременните жени с висок BMI,

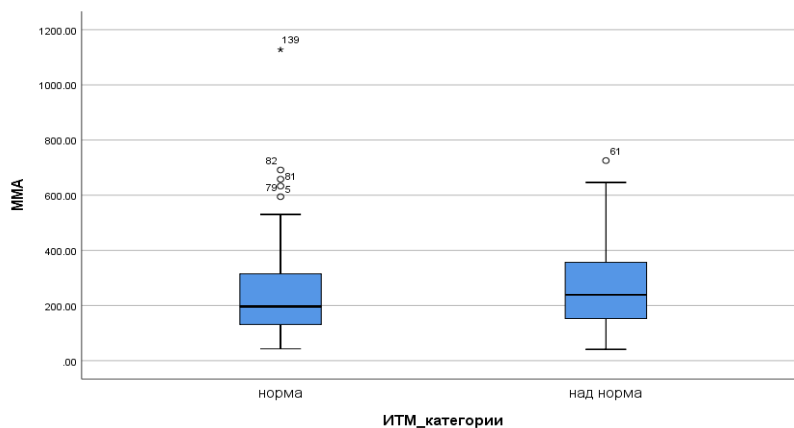
както и тези с нормален имат сходни средни, но ниски нива по отношение на показателите тотален и активен витамин В12 (фигури 25 и 26 ) и сходни средни, но по-високи нива по отношение на метаболитния параметър ММА (фигура 27).



**Фиг.25** BMI и средни измерени концентрации на тотален витамин В12 pmol/l.



**Фиг.26** BMI и средни измерени концентрации на активен витамин В12 pmol/l.



**Фиг. 27** BMI и средни измерени серумни концентрации на ММА pmol/l.

В таблица 47 са посочени средните серумни концентрации на показателите тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА в трите основни групи бременни жени, подразделени според индекса на телесната им маса.

**Табл.47** Серумни нива на тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА при здрави бременни жени и жени с GDM и прееклампсия, подразделени според индекса на телесната им маса

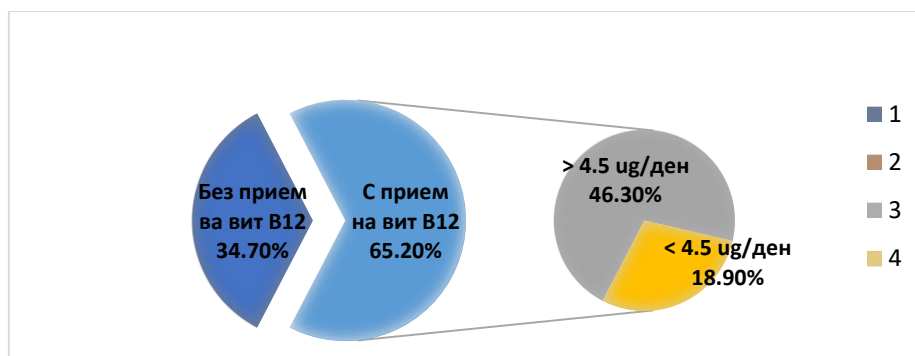
Група бременни жени	N (%)	Total Vit B12 Mean±SD (pmol/l)	Active Vit B12 Mean±SD (pmol/l)	MMA Mean±SD (nmol/l)
I-ва група BMI<25	125 (74.85%)	189.34 ± 106.31	77.81 ± 60.06	229.75 ± 149.82
BMI≥25	42 (25.15%)	193.17 ± 86.95	84.05 ± 56.00	191.15 ± 107.09
II-ра група BMI<25	32 (74.42%)	153.65 ± 47.33	62.08 ± 30.08	307.64 ± 159.29
BMI≥25	11 (25.58%)	144.33 ± 54.65	55.10 ± 25.63	317.16 ± 192.89
III-та група BMI<25	28 (57.14%)	151.59 ± 64.91	67.81 ± 49.66	304.53 ± 154.46
BMI≥25	21 (42.86%)	165.62 ± 141.93	57.81 ± 32.76	254.23 ± 141.93

I-ва група – здрави бременни жени, II-ра група – бременни жени с GDM, III-та група – бременни жени с прееклампсия, Total vit B12 – тотален витамин В12, Active vit B12 – активен витамин В12, ММА – метилмалонова киселина, N – брой, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение

В групата на бременните жени с GDM средните измерени серумни концентрации на параметрите тотален и активен витамин В12 при участниците с наднормено тегло и затлъстяване (BMI≥25) са малко по-ниски, а тези на метаболитния параметър ММА, съответно малко по-високи, в сравнение с групата на бременните жени с нормален BMI. За групата на здравите контроли и при жените с прееклампсия, подобна зависимост в нивата на изследваните параметри не се установи.

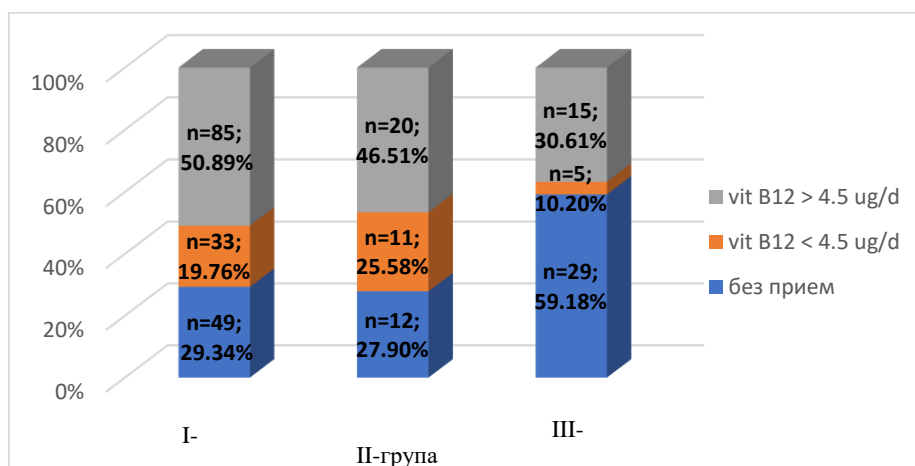
#### **3.4. Зависимост на витамин В12 статуса от приема на хранителни добавки, съдържащи витамина, за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи.**

Съгласно препоръките на МЗ на Република България, препоръчителният дневен прием на витамин В12 за периода на бременността е 4.5 ug/ден, а за периода на кърмене – 5 ug/ден [344]. От включените в настоящото проучване бременни жени 34.75% (n=90) не съобщават за суплементация с витамина. Останалите участници потвърждават прием на хранителни добавки, като 46.33% (n=120) се суплементират с доза над 4.5 ug/ден. Фигура 28 представя употребата на хранителни добавки, съдържащи витамин В12 (ug/ден) в общата група на изследваните бременните жени.



**Фиг.28** Прием на хранителни добавки съдържащи витамин В12 (ug /ден)

Фигура 29 илюстрира честотата на суплементация с хранителни добавки, съдържащи витамин В12 в трите основни групи бременни жени – здрави, с GDM и с прееклампсия.



**Фиг. 29** Честотно разпределение на бременните жени от трите основни изследвани групи според приема на хранителни добавки, съдържащи витамин В12. (I-ва група– здрави, II-ра група – с GDM, III-та група – с PE)

Между трите основни групи участници в проучването се очертаха процентни разлики в употребата на витамина, които са статистически значими ( $\chi^2= 16.80, p=0.002$ ). Статистически значимо по-висок процент на несуплементирани жени и жени, приемащи неадекватно количество витамин В12 се наблюдава при жените с GDM и прееклампсия.

За да изследваме съществуващата зависимост между групата на бременните жени и суплементацията с витамин В12, приложихме корелация по метода на Spearman. Резултатите от анализа показаха слаба, но положителна връзка между двата показателя ( $\rho=0.178, p=0.001$ ). Налице са данни за увеличаване на вероятността за по-нисък прием или липса на такъв при бременни жени, развили усложнения на бременността (GDM и прееклампсия).

В таблица 48 са представени данни за минималната, максималната и средна доза на витамин В12 прием при бременните жени по групи – здрави, с GDM и с прееклампсия.



Най-ниска средна и най-ниска максимална дневна доза на витамин В12 от хранителни добавки се установи в групата на участниците с прееклампсия.

**Табл.48** Витамин В12 прием в трите групи бременни жени – минимална, максимална, средна доза и стандартно отклонение.

Група бременни жени	Прием на витамин В12 Mean $\pm$ SD (ug/ден)	Прием на витамин В12 Min-Max Range (ug/ден)
I-ва група	11.06 $\pm$ 77.24	0 – 1000
II-ра група	50.53 $\pm$ 212.21	0 – 1000
III-та група	4.88 $\pm$ 10.56	0 – 54

I-ва група – здрави; II-ра група – жени с гестационен диабет; III-та група – жени с прееклампсия; Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, Min-Max Range – референтен уинтервал

Информация за измерените серумни концентрации на параметрите тотален, активен витамин В12 и ММА при суплементирани и несуплементирани бременни жени в трите основни изследвани групи е представена в табличен вид (таблица 49).

**Табл.49** Средни серумни концентрации на параметрите отразяващи витамин В12 статуса в трите основни изследвани групи.

Група	ТВ12 (pmol/l)		АВ12 (pmol/l)		ММА (nmol/l)	
	Без витаминен прием	С витаминен прием	Без витаминен прием	С витаминен прием	Без витаминен прием	С витаминен прием
I-ва	165.84	179.42	59.60	74.22	244.64	252.70
II-ра	198.16	209.48	84.43	88.73	239.13	246.91
III-та	153.95	168.00	68.96	73.36	273.16	218.91

I-ва група – здрави; II-ра група – жени с гестационен диабет; III-та група – жени с прееклампсия; ТВ12 – тотален витамин В12; АВ12 – активен витамин В12; ММА – метилмалонова киселина

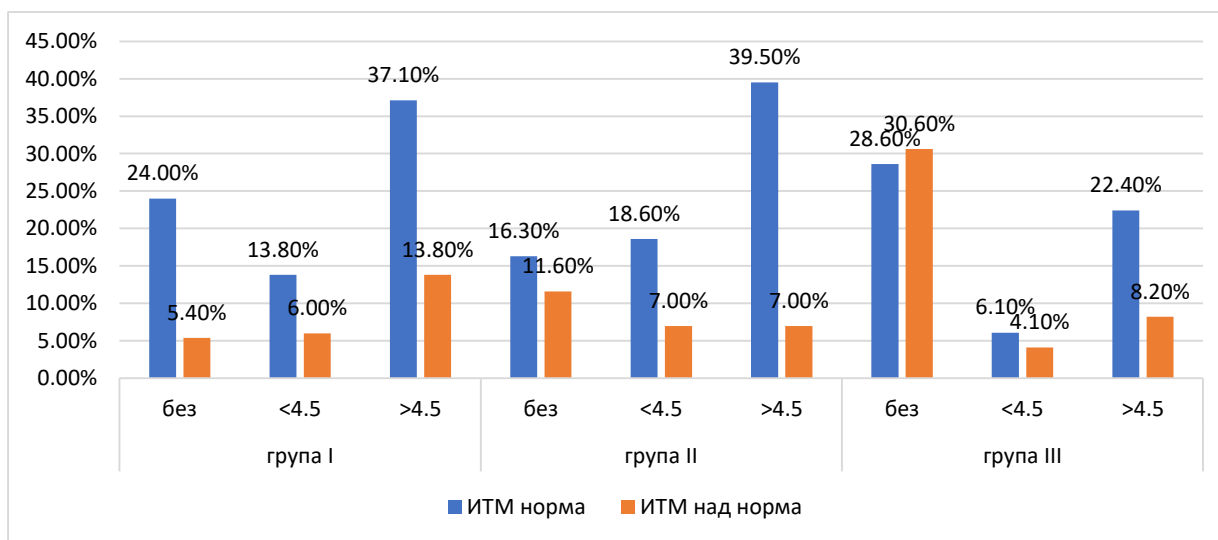
Решихме да съпоставим и приема на витамин В12 от хранителни добавки при бременните жени с нормално тегло (ВМІ<25) и тези с наднормено тегло и затлъстяване (ВМІ $\geq$ 25). Установихме, че 39.19% от жените с наднормено тегло не се суплементират, 20.27% са с ниски нива на суплементация (<4.5ug/ден) и 40.54% (по-малко от половинта) приемат витамина в препоръчаната за периода на бременността доза ( $\geq$ 4.5ug/ден). Сравнително сходно е и разпределението при бременните жени с нормален ВМІ, като 51.35% са бременните жени без или с ниски нива на витамин В12 прием (<4.5ug/ден), а 48.65% се суплементират с доза  $\geq$ 4.5/ugден. Посредством непараметричен хи-квадрат анализ на категории данни изследвахме каква е честотата на витамин В12 прием при участниците в извадката. Отчетените процентни разлики не показаха статистическа

достоверност ( $\chi^2= 1.438, p=0.487$ ), но установихме, че повече от половината (59.46%) от бременните жени с наднормено тегло и затлъстяване имат недостатъчен прием на витамин В12 (таблица 50).

**Табл.50** Суплементация с витамин В12 при бременни жени с нормално и наднормено тегло в цялата извадка

ВМІ	Прием на витамин В12 Без прием	Прием на витамин В12 < 4.5ug/ден	Прием на витамин В12 ≥ 4.5ug/ден
< 25	32.97% (n=61)	18.38% (n=34)	48.65% (n=90)
≥ 25	39.19% (n=29)	20.27% (n=15)	40.54% (n=30)
Общо	34.75% (n=90)	18.92% (n=49)	46.33% (n=120)

Допълнително съпоставихме и честотното разпределение на суплементацията с витамин В12 във всяка една от изследваните групи бременни жени (фигура 30). Въпреки, че статистическа достоверна разлика между трите основни групи и приема на витамина не се откри, резултатите ясно очертаха една картина на недостатъчна суплементация сред всички бременни жени.



**Фиг.30** Честотно разпределение на приема на витамин В12 според ВМІ при бременните жени по групи (I-ва група – здрави; II-ра група – жени с GDM; III-та група – жени с PE; ИТМ норма – ВМІ<25; ИТМ над норма – ВМІ≥25)

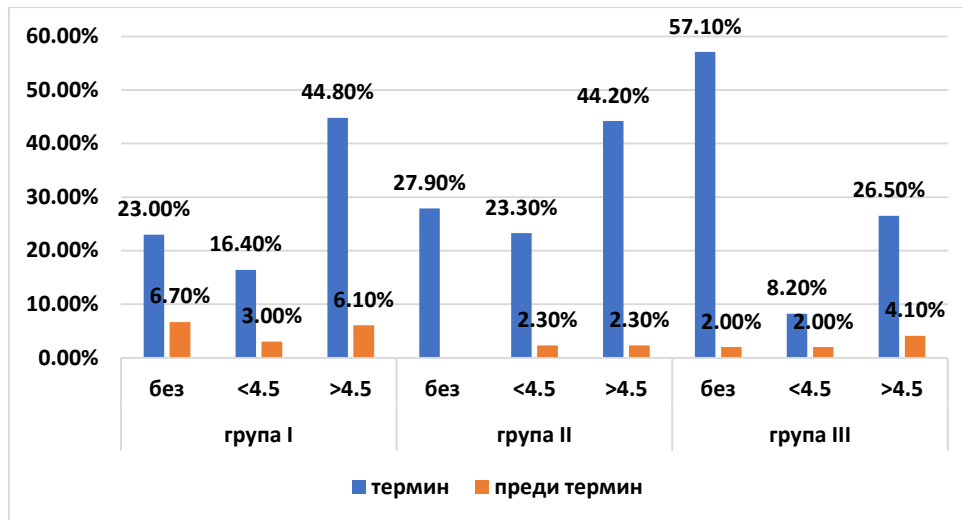
### 3.5. Влияние на витамин В12 статуса относно неблагоприятния изход от бременността по отношение на новороденото и възникването на преждевременно раждане и раждане на дете с ниско тегло при здрави бременни и жени с усложнения на бременността.

За да оценим ролята на витамин В12 статуса относно неблагоприятния изход от бременността като преждевременно раждане (РТВ), първоначално изследвахме честотата на това усложнение в зависимост от приема на витамина като хранителна добавка – без витамин В12 прием, прием < 4.5ug/ден, прием > 4.5ug/ден (таблица 51).

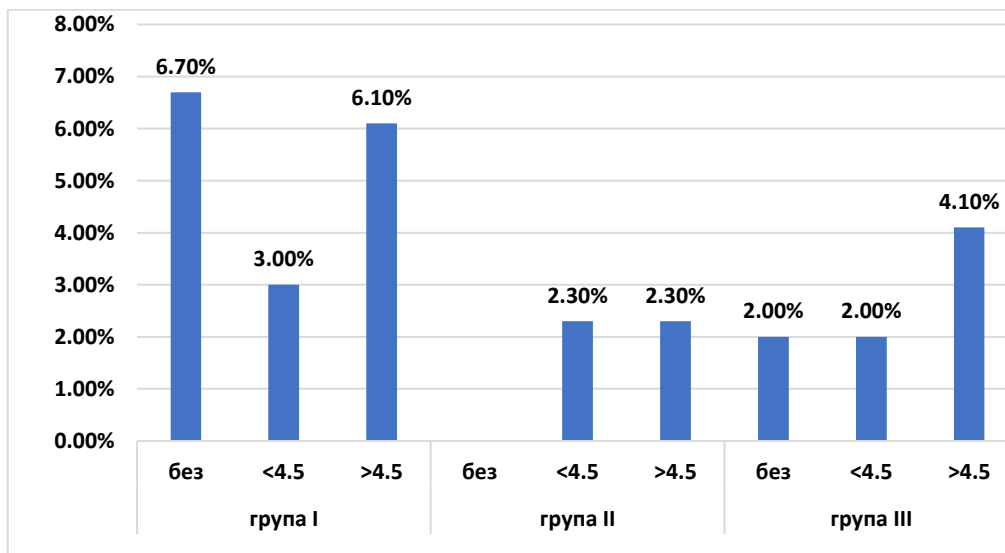
**Табл.51** Прием на витамин В12 при бременни жени според продължителността на бременността.

Продължителност на бременността	Без прием на витамин В12,	Прием на витамин В12 <4.5ug/ден	Прием на витамин В12 >4.5ug/ден
> 37 г.с.	34.67% (n=78)	18.22% (n=41)	47.11% (n=106)
< 37 г.с. (РТВ)	37.50% (n=12)	21.86%(n=7)	40.63% (n=13)
Общо	35.02% (n=90)	18.68% (n=48)	46.30% (n=119)

От всички бременни жени родили преждевременно, 37.50% не съобщават за допълнителен витамин В12 прием от хранителни добавки, 21.86% са суплементирани с доза, под изискуемия минимум за страната по време на бременност, а 40.43% са приемали доза според препоръките – 4.5ug/ден [344]. За да установим има ли зависимост между витамин В12 статуса на бременните жени и възникването на преждевременно раждане, първо описахме честотата на РТВ съгласно приема на хранителни добавки в периода на бременността (прием на витамин В12<4.5ug и >4.5ug). За установяване на достоверни различия между категориите витаминен прием, използвахме кростабулация и непараметричен хи-квадрат анализ ( $\chi^2= 0.519$ ,  $p=0.771$ ). На фигура 31 е демонстриран честотния сравнителен анализ между групите бременни жени и приема на витамин В12 от хранителни добавки. Графичното представяне на данните показва, че бременните жени без или с недостатъчна суплементация с витамина се срещат и сред трите основни групи (здрави, с GDM, с прееклампсия), но от фигура 32, изобразяваща само приема сред родилите преди 37г.с., става ясно че процентът на бременните жени, родили преждевременно и суплементирани с оптимална доза витамин В12 е много малък.



**Фиг. 31** Честотно разпределение на бременните жени според витамин В12 приема и продължителността на бременността по групи (I-ва група – здрави; II-ра група – жени с GDM; III-та група – жени с PE)



**Фиг. 32** Честотно разпределение на бременните жени според прием на витамин В12 и РТВ в трите основни изследвани групи (I-ва група – здрави; II-ра група – жени с GDM; III-та група – жени с PE)

На следващ етап разгледахме и сравнихме и средните стойности на серумните концентрации на тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА при бременните жени с нормална продължителност на бременността и с РТВ (таблица 52).

**Табл.52** Серумни нива на тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА при бременните жени с нормална продължителност на бременността и РТВ.

Параметър	Продължителност на бременността	Mean±SD	t-test/p-level	95% CI
ТВ12 pmol/l	Нормална	179.31±93.92	t=0.899, p=0.370	-18.27; 48.98
	РТВ	163.96±58.39		
АВ12 pmol/l	Нормална	74.06±55.16	t=0.929, p=0.354	-10.45; 29.13
	РТВ	64.72±35.94		
ММА nmol/l	Нормална	247.45±157.07	t=-0.448, p=0.655	-78.52; 49.44
	РТВ	261.99±141.05		

ТВ12 – тотален витамин В12, АВ12 – активен витамин В12, ММА – метилмалонова киселина, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, 95% CI – 95% доверителен интервал

Въпреки разликите в измерените средни серумни концентрации на показателите тотален, активен витамин В12 и ММА при бременни жени с РТВ и нормална продължителност на бременността, статистическа достоверност между групите не се установи.

Опитахме се да потвърдим ролята и важността на витамин В12 за продължителността на бременността като използвахме корелационен анализ по метода на Spearman, но резултатите не откриха статистическа достоверност между изследваните фактори ( $p > 0.05$ ). Тестваните корелационните зависимости са представени в таблица 53.

**Табл.53** Корелационни зависимости между серумните нива на тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА и продължителността на бременността.

Здрави бременни жени						
			Нормална /РТВ	ТВ12 pmol/l	АВ12 pmol/l	ММА nmol/l
Spearman's rho	Нормална /РТВ	rho	1.000	0.014	-0.104	0.011
		p	.	0.862	0.185	0.891
	ТВ12 pmol/l	rho	0.014	1.000	0.574**	-0.076
		p	0.862	.	0.000	0.354
	АВ12 pmol/l	rho	-0.104	0.574**	1.000	-0.042
		p	0.185	0.000	.	0.611
	ММА nmol/l	rho	0.011	-0.076	-0.042	1.000
		p	0.891	0.354	0.611	.
Бременни жени с GDM						
			Нормална /РТВ	ТВ12 pmol/l	АВ12 pmol/l	ММА nmol/l
Spearman's rho	Нормална /РТВ	rho	1.000	-0.089	0.018	-0.186
		p	.	0.570	0.910	0.291
	ТВ12 pmol/l	rho	-0.089	1.000	0.618**	0.005
		p	0.570	.	0.000	0.977
	АВ12 pmol/l	rho	0.018	0.618**	1.000	0.035
		p	0.910	0.000	.	0.846
	ММА nmol/l	rho	-0.186	0.005	0.035	1.000
		p	0.291	0.977	0.846	.
Бременни жени с прееклампсия						
			Нормална /РТВ	ТВ12 pmol/l	АВ12 pmol/l	ММА nmol/l
Spearman's rho	Нормална /РТВ	rho	1.000	-0.129	0.190	0.277
		p	.	0.376	0.192	0.119
	ТВ12 pmol/l	rho	-0.129	1.000	0.556**	-0.079
		p	0.376	.	0.000	0.663
	АВ12 pmol/l	rho	0.190	0.556**	1.000	-0.015
		p	0.192	0.000	.	0.935
	ММА nmol/l	rho	0.277	-0.079	-0.015	1.000
		p	0.119	0.663	0.935	.

ТВ12 – тотален витамин В12, АВ12 – активен витамин В12, ММА – метилмалонова киселина

Значими статистически зависимости между продължителността на бременността и параметрите, отразяващи витамин В12 статуса на бременните жени от двете сравнявани групи (с нормална продължителност на бременността и с РТВ), не се откриха ( $p > 0.05$ ).

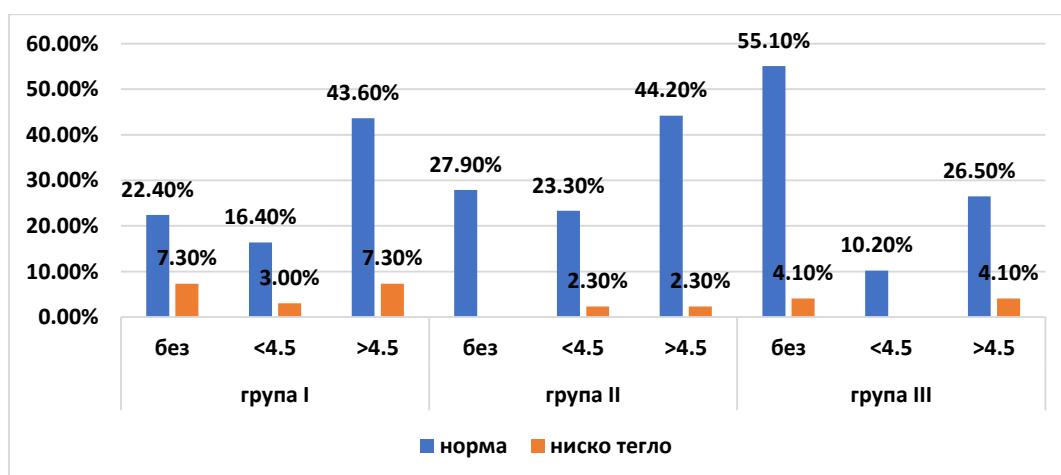
Подобен на описания вече подход използвахме и при оценка влиянието на витамин В12 статуса на бременните жени относно друг неблагоприятен изход от бременността, а именно – раждането на новородено с ниско тегло (<2500g).

В таблица 54 е представена информация за процентното разпределение на бременните жени, родили новородени с нормално и ниско тегло в зависимост от приема на витамин В12 от хранителни добавки – без прием, с витамин В12 прием < 4.5ug/ден и с витамин В12 прием >4.5ug/ден.

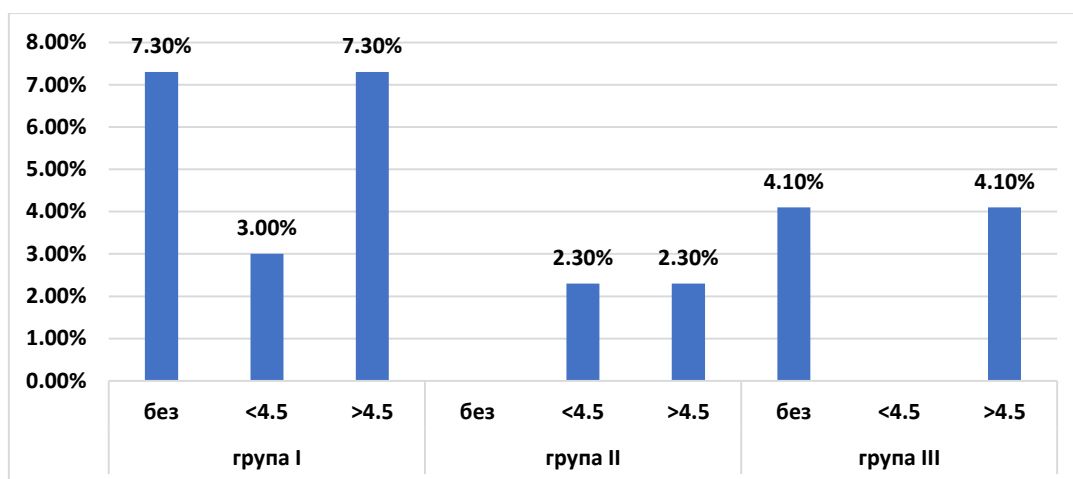
**Табл.54** Честота на суплементация с витамин В12 при бременни жени, според теглото на новороденото при раждане.

Тегло на новороденото при раждане	Без прием на витамин В12,	Прием на витамин В12 <4.5ug/ден	Прием на витамин В12 >4.5ug/ден
Нормално тегло (>2500g)	76 (34.08%)	39 (17.49)	108 (48.43%)
Ниско тегло (<2500g)	12 (35.29%)	10 (29.41%)	12 (35.29%)
Общо	88 (34.24%)	49 (19.07%)	120 (46.69%)

От участниците включени в проучването, родили новородено с ниско тегло, 35.29% не съобщават за допълнителен прием на витамин В12, а 29.41% приемат доза, по-ниска от препоръчаната за периода на бременността. За да установим има ли зависимост между витамин В12 статуса на участниците и раждането на дете с ниско тегло, първоначално приложихме честотен сравнителен анализ между групите бременни жени и тяхната суплементация с витамина (фигура 33). Графичното представяне показва липса или недостатъчен прием на витамин В12 сред всички бременни жени, като най-силно представяне се наблюдава сред майките родили деца с LBW в групата на здравите – 7.3% и сравнителни сходно представяне при бременните жени, развили прееклампсия – 4.10% и GDM – 2.3% (фигура 34).



**Фиг. 33** Честотно разпределение на бременните жени според витамин В12 приема и раждането на новородено с LBW и нормално тегло сред бременните жени в трите основни групи ( I-ва група – здрави; II-ра група – жени с GDM; III-та група – жени с прееклампсия).



**Фиг. 34** Честотно разпределение на бременните жени според витамин В12 приема и раждането на дете с ниско тегло в трите основни групи (I-ва група – здрави; II-ра група – жени с GDM; III-та група – жени с PE).

Посредством t-тест за независими извадки, направихме сравнение между средните измерени концентрации на показателите тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА. При жените родили деца с тегло под 2500 g, средните серумните концентрации на параметрите тотален и активен витамин В12 са малко по-ниски, а средните серумни концентрации на матаболита ММА, съответно малко по-високи, в сравнение с тези при жените, родили новородени с нормално тегло (таблица 55), но резултатите между двете сравнявани групи не показаха достоверна статистическа значимост.

**Табл.55** Средни измерени стойности на показателите тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА при жени родили новородени с нормално тегло и с LBW.

Параметър	Тегло	Mean	SD	t-test/p-level	95%CI
ТВ12 pmol/l	Нормално	179.71	94.24	t=1.033, p=0.303	[-15.5; 49.31]
	LBW	162.74	58.58		
АВ12 pmol/l	Нормално	75.09	55.49	t=-1.668, p=0.091	[-2.90; 35.06]
	LBW	59.01	32.41		
ММА nmol/l	Нормално	244.69	154.40	t=-1.050, p=0.295	[-90.81; 27.70]
	LBW	276.24	158.47		

ТВ12 – тотален витамин В12, АВ12 – активен витамин В12, ММА – метилмалонова киселина, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение, 95% CI – 95% доверителен интервал, LBW – ниско тегло при раждане

Доколко ниското тегло при новородените има връзка с принадлежността на бременните жени към определена рискова група, проверихме посредством корелация по метода на Spearman. Резултатите са представени в таблица 56. Силна и положителна зависимост между вероятността за раждане на новородени с LBW при увеличаващ се дефицит на тотален витамин В12 установихме при жените, развили прееклампсия



(rho=0.499, p=0.009). Слаба, но значима връзка между активния витамин В12 и риска от раждане на дете с ниско тегло се доказва в групата на здравите контроли (rho=-0.157, p=0.044).

**Табл.56** Корелационни зависимости между серумните нива на тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА и риск от LBW.

<b>Здрави бременни жени</b>						
			Тегло	ТВ12 pmol/l	АВ12 pmol/l	ММА nmol/l
Spearman's rho	Тегло	rho	1.000	0.011	-0.157*	-0.011
		p	.	0.886	0.044	0.894
	ТВ12 pmol/l	rho	0.011	1.000	0.574**	-0.076
		p	0.886	.	0.000	0.354
	АВ12 pmol/l	rho	<b>-0.157*</b>	0.574**	1.000	-0.042
		p	<b>0.044</b>	0.000	.	0.611
	ММА nmol/l	rho	-0.011	-0.076	-0.042	1.000
		p	0.894	0.354	0.611	.
<b>Бременни жени с GDM</b>						
			Тегло	ТВ12 pmol/l	АВ12 pmol/l	ММА nmol/l
Spearman's rho	Тегло	rho	1.000	-0.089	0.018	-0.186
		p	.	0.570	0.910	0.291
	ТВ12 pmol/l	rho	-0.089	1.000	0.618**	0.005
		p	0.570	.	0.000	0.977
	АВ12 pmol/l	rho	0.018	0.618**	1.000	0.035
		p	0.910	0.000	.	0.846
	ММА nmol/l	rho	-0.186	0.005	0.035	1.000
		p	0.291	0.977	0.846	.
<b>Бременни жени с преeklampсия</b>						
			Тегло	ТВ12 pmol/l	АВ12 pmol/l	ММА nmol/l
Spearman's rho	Тегло	rho	1.000	-0.192	0.000	0.449**
		p	.	0.185	1.000	0.009
	ТВ12 pmol/l	rho	-0.192	1.000	0.556**	-0.079
		p	0.185	.	0.000	0.663
	АВ12 pmol/l	rho	0.000	0.556**	1.000	-0.015
		p	1.000	0.000	.	0.935
	ММА pmol/l	rho	<b>0.449**</b>	-0.079	-0.015	1.000
		p	<b>0.009</b>	0.663	0.935	.

ТВ12 – тотален витамин В12, АВ12 – активен витамин В12, ММА – метилмалонова киселина

## VI. ДИСКУСИЯ

### 1. Бременност и рискови фактори за възникване на усложнения на бременността.

Бременността е физиологичен процес, по време на който в женския организъм настъпват изменения в почти всички органи и системи. Здравето и начинът на живот на жените в детородна възраст са важни детерминанти за нормалното протичане на бременността и раждането. В световен мащаб се полагат големи усилия за разработване на програми за оптимизиране на майчиното здраве, с цел подобряване резултатите от бременността и раждането [24]. Добрата перинатална грижа, здравословният начин на живот и пълноценната диета, снижават до минимум евентуалните рискове от развитие на усложнения и са от съществено значение за благоприятното развитие и състояние на потомството в момента на раждане и в бъдеще [32].

#### 1.1. Възраст на бременната жена.

В последните години се наблюдава обща тенденция за увеличаване на средната възраст към момента на раждане на новороденото. Така например в Италия, като страна с добър социо-икономически статус, средната възраст при раждане се е увеличила от 25.2 години през 1981 г. до 31.7 години през 2015 г. [185]. Средната детородна възраст на жените от Швеция е по-висока в сравнение с тази на жените в Китай ( $30.9 \pm 5.6$  години vs  $28.6 \pm 4.6$  години), а в Индия през 2020 г. възрастта на жената при раждане е още по-ниска – 27.4 години [349]. Според най-нови данни на Националния статистически институт на Република България, средната възраст на бременните жени в страната за 2021 година е 29.0 години [350], а през 2010 е била 26.2 [348]. Това доказва, че темпът на нарастване на средната възраст, наблюдаван в останалите европейски страни, е характерен и за нашата страна. В настоящото проучване, средната изчислена възраст на всички изследвани бременни жени е  $30.51 \pm 5.35$  години (обхват: 19 – 49 години) и надскача средната възраст, съобщена за страната.

По литературни данни с нарастване възрастта на бъдещата майка нараства и честотата на възникналите в хода на бременността и раждането усложнения. В нашето проучване се наблюдава статистическа достоверна разлика (one-way ANOVA:  $F=4.027$ ,  $p=0.019$ ) между средните стойности на трите основни изследвани групи. Най-ниска средна възраст е установена за групата на здравите бременни жени ( $29.84 \pm 4.79$  години), а най-висока за групата на бременните жени с прееклампсия ( $32.12 \pm 7.14$  години), като различието помежду им е статистически значимо ( $p=0.023$ ).

В научната литература е общоприето бременните жени да се делят по възрастов признак на млади (под 35 годишна възраст) и такива в напреднала възраст (над 35 години, advanced maternal age) [132]. Проучвания сред европейски и американски популации показват, че процентът на жените, родили над 35 години се е увеличил 4–8 пъти за последните 30 – 40 години [115]. В нашето проучване 15.44% от включените в проучването бременни жени са над 35 години. Процент, по-висок от среднестатистическия за страната и характерен за големите градове, където жените с висше образование преобладават. Прави впечатление, че при здравите бременни жени процентът на жените в напреднала възраст е 12.57%, за групата с GDM е 16.28%, а при жените с прееклампсия достига почти една четвърт (24.49%). Това е в съгласие с доказаните в множество проучвания наблюдения, че рискът от възникване на усложнения на бременността се увеличава с възрастта. Достига се до заключението, че възрастта на бременната жена е независим рисков фактор за възникване както на усложнения в хода на бременността, така и на неблагоприятни акушерски и перинатални резултати [185, 236].

## **1.2. BMI на бременната жена, изчислен към момента на забременяване и гестационно наддаване на тегло**

Рисков фактор за възникване на неблагоприятни усложнения при бременните жени и техните новородени е и повишеният BMI. Според WHO, разпространението на затлъстяването по време на бременност варира от 1.8 до 25.3% [109]. Съгласно проучената литература честотата на наднорменото тегло и затлъстяването сред жените в детородна възраст нараства с епидемична скорост, а бременните жени с наднормено тегло и затлъстяване са изложени на по-висок риск от възникване на усложнения. [47, 253]. Големи кохортни проучвания отчитат трикратно увеличен риск за развитие на GDM [85], прееклампсия, сърдечно-съдови заболявания, дефекти на невралната тръба и вродени малформации [253] при майки с висок BMI. Съгласно препоръките на Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG), теглото и BMI на жените в детородна възраст трябва стриктно да се следят, като се налага задължителната препоръка да се оптимизират още преди забременяването [85].

В зависимост от регионални и етнически особености се наблюдават различия в честотата на жените с наднормено тегло и затлъстяване. Така например в Швеция BMI на жените в детородна възраст е 24.6, докато в Китай – 21.9 [325]. В нашето проучване средният изчислен BMI за цялата група бременни жени е  $23.08 \pm 3.93$  (медиана 30.11;

обхват от 15.24 до 44.98), като заема едно междинно място между страна от Западна Европа с висок жизнен стандарт и страна от Азия с по-нисък стандарт на живот.

Наблюдава се покачване на средната стойност на BMI в трите основни изследвани групи ( $22.69 \pm 3.69$ ,  $23.06 \pm 4.91$ ,  $24.25 \pm 3.66$ ) съответно за здравите бременни и тези с GDM и прееклампсия. One-way ANOVA тестът установи тенденция към статистическо различие ( $F=2.752$ ,  $p=0.065$ ), като различието между здравите и бременните жени с прееклампсия почти достигна статистическа достоверност ( $p=0.051$ ). Въпреки че няма значимо различие в средните стойности на BMI между здравите бременни жени и тези с GDM, интересен е фактът, че най-високата максимална стойност на BMI (44.98) се наблюдава именно в групата на жените с GDM.

Друг важен за нормалното протичане на бременността и раждането фактор е GWG. Данните от проучванията са обезпокоителни, а световните тенденции сочат, че при приблизително половината от бременните жени е налице надхвърляне на допустимото наддаване на килограми за съответния срок на бременността [296]. В проведеното от нас проучване получените данни са сходни на описаните в литературата. Общо, за цялата изследвана кохорта, бременните жени с GWG, надвишаващо допустимия диапазон за съответната гестационна възраст, са общо 105, т.е. достига се един сравнително висок процент – 40.54%. Очаквано, този процент е по-висок при жените с възникнали усложнения на бременността – 51.09% (от общо 92 участника с GDM или прееклампсия при 47 е налице GWG над допустимото), като в групата на бременните жени с прееклампсия този процент е още по-висок – 63.3%. Чрез непараметричен хи-квадрат анализ проверихме дали усложненията по време на бременност са по-вероятни при жени с наднормено тегло и затлъстяване ( $BMI \geq 25$ ) преди зачеването и с GWG над допустимото за съответната г.с. Резултатите от честотното разпределение на данните показаха достоверни статистически зависимости и за двата показателя – BMI и GWG ( $\chi^2=6.046$ ,  $p<0.049$ ). Близко половината от жените с  $BMI \geq 25$  (43.3%) и малко над една трета от бременните с GWG над допустимото (35.9%) са с риск да развият усложнения в хода на бременността. Проверихме и доколко силна е връзката между показателите BMI и GWG и вероятността от възникване на усложнения. За целта използвахме корелационен анализ по метода на Spearman, който доказа, че съществува положителна, пропорционална зависимост между високия BMI ( $\geq 25$ ) и вероятността за развитие на GDM и прееклампсия ( $\rho=0.124$ ,  $p=0.046$ ). Допълнително установихме, че GWG е значим утежняващ фактор, защото паралелно с увеличаването на BMI, нараства и GWG,

а в резултат расте и риска за състоянието на бременната жена ( $\rho=0.134$ ,  $p=0.031$ ). Получените от нас данни подкрепят описаните в проучената литературата, в които се установява, че майчините и неонаталните усложнения са доказано свързани с наднорменото тегло и затлъстяването преди бременността и абнормалното GWG по време на бременност [172, 294].

В заключение може да се обобщи, че изчисленият към момента на зачеването BMI и прекомерното GWG са важни рискови фактори за появата на неблагоприятни последици за бременната жена и потомството [296], а усилията на съвременното общество за оптимизиране теглото на жените в детеродна възраст трябва да продължават.

### 1.3. Сезонност

Рисков фактор за възникване на усложнения в периода на бременността би могъл да бъде и сезонът. Около две трети от всички, включени в изследването бременни жени (64.09%), са изследвани през зимното полугодие, като това съотношение приблизително се запазва в трите основни групи. Докато първите две групи са съставени от амбулаторно проследявани жени на гестационна възраст основно между 24-та и 28-ма г.с. включително, то групата с прееклампсия е представена от жени, хоспитализирани по повод на развиващо се усложнение, заплашващо бременността, независимо от гестационната възраст. Интересен е фактът, че това тежко хипертензивно усложнение, придружено или не с албуминурия, се проявява точно в зимния период. Получените резултати съответстват на голяма част от публикуваните данни в литературата, където се обсъжда повишена честота на заболяването в студените и влажни месеци на годината [162]. Причините за наличие на сезонни вариации във възникването на прееклампсията са все още недостатъчно изяснени и известни. Тъй като патофизиологията на заболяването се свързва с вазоконстрикция, повишената честота през студените месеци на годината може да се обясни с ефекта на температурата и влажността върху спазъма на кръвоносните съдове и секрецията на вазоактивни вещества [162, 273]. Допълнителен фактор за проявата на сезонност при възникване на заболяването може да бъде и витамин D дефицитът или недостатъчността. Серумните концентрации на витамина в периода на бременността изпълняват важна роля в патогенезата на усложнението. Поддържайки имунната хомеостаза, витамин D се намесва в регулацията на кръвното налягане чрез ренин-ангиотензин-алдостероновата системата като предотвратява плацентарната вазоконстрикция, регулирайки пролиферацията на ендотелните и гладко-

мускулните съдовите клетки и в крайна сметка преекламписията [146]. В тази връзка сезонни промени в честотата на възникване на преекламписията може да се очакват и във връзка с различното слънчево огряване и различното излагане на слънчева светлина. Rohr Thomsen и съавт. (2020) установяват значителни сезонни колебания в развитието на хипертоничните разстройства на бременността и смятат, че сезонните промени на витамин D статуса могат да обяснят причинно-следствената връзка. [260].

За разлика от преекламписията, честотата на възникване на GDM като усложнение на бременността не варира значително в различните периоди на годината. В проучената литература все пак има автори, които установяват сезонност в диагностицирането на заболяването [276]. В нашето проучване амбулаторно проследяваните бременни жени, включени в проучването – здрави и с гестационен диабет, са почти двукратно повече през зимните месеци на годината (съответно 64.67% и 62.79%), отколкото през лятното полугодие. Липсата на различие в наблюдаваната сезонна честота при тези две групи би могла да подкрепи идеята, че по-голямата честота на GDM, установен през студените месеци на годината в сравнение с тази, установена през топлия сезон (37.21%) е по-скоро резултат на случайни фактори, отколкото на закономерни явления, доказано и с помощта на проведения  $\chi^2$ -квадрат анализ, отхвърлящ сезонността като статистически значим фактор, определящ по-висок риск от възникване на GDM през зимата.

При търсенето допълнително на корелационна връзка между сезонност и вероятност за развитие на усложнение на бременността като GDM и преекламписия също не доказва наличие на закономерност (Spearman  $\rho=0.024$ ,  $p=0.641$ ) при нашата кохорта изследвани бременни жени.

## **2. Витамин D статус на бременните жени.**

В последните десетилетия се обръща особено голямо внимание на широкото разпространение на витамин D дефицита или недостатъчността сред населението. Като основна причина за това наблюдавано явление се счита променения начин на живот и хранене. Важно е да се подчертае, че витамин D дефицитът или недостатъчността се обвързват все повече с развитието на разнообразни здравни проблеми и заболявания. Проучените литературни данни показват, че ниските серумни нива, измерени посредством 25(OH)D, са често срещани не само сред общата популация, но са широко разпространени и сред бременните жени [227].

### **2.1. Оценка на серумните нива на 25(OH)D в изследваната кохорта**

За рутинната клинично-лабораторна практика измерването на 25(OH)D като златен стандарт за определяне на витамин D статуса се осъществява основно чрез имунологични методи, поради по-лесната им приложимост и възможност за изработване на големи серии от проби. В последните години LC-MS/MS методите, приети като дефинитивни/референтни, намират все по-широко приложение в световен мащаб [62].

В проведеното от нас проучване с 259 бременни жени от Североизточна България, серумните нива на 25(OH)D са изследвани посредством течна хроматография с мас-спектрометрична детекция (LC-MS). Средната измерена стойност на 25(OH)D при всички 259 бременни жени е  $76.26 \pm 38.27$  nmol/l (медиана 107.24 nmol/l с обхват от 10.25 nmol/l до 204.23 nmol/l). В таблица 57 са посочени данни, публикувани в последните години, относно витамин D статуса на български жени.

**Табл.57** Данни за серумни нива на 25(OH)D за български популации жени.

Проучване, година на публикуване	N; възраст (Min – Max range или Mean $\pm$ SD в години)	Физиологично състояние на жените	Сезон и година на изследване	25(OH)D [nmol/l] Mean $\pm$ SD	Метод
Borissova, 2013 [44]	n=1076; *20-80	Неуточнено	Януари-Февруари, 2012	36.29 $\pm$ 17.16	LC-MS/MS
Генова, 2022 [343]	n=29; 20-40 n=24; 24 $\pm$ 7	Здрави небременни Здрави бременни	Февруари-Май, 2018	41 $\pm$ 13 60 $\pm$ 22	LC-MS/MS
Borissova, 2020 [45]	n=547; 18-47 (30 $\pm$ 5)	Здрави бременни	**25.09 - 06.11, 2019	***64.65 $\pm$ 23.6 5	CLIA

\*41.4% (n=446) от изследваните жени са във възрастовия диапазон 20-44 години

\*\*Дизайнът на изследването е планиран за провеждане през октомври (подходящ, според авторите, месец за определяне на витамин D статуса преди началото на зимния сезон)

\*\*\*Данните в оригиналната статия са посочени в ng/ml (25.86 $\pm$ 9.46)

(Min – Max range – възрастов диапазон, обхващащ минималната до максимална съобщена възраст, Mean – средна стойност, SD – стандартно отклонение)

От таблицата се вижда, че едно от проучванията е осъществено изцяло през зимния сезон [44], следващото е направено основно, но не изцяло през същия сезон [343], а третото в края на лятното полугодие [45]. В настоящото проучване през зимния период са изследвани около две трети от жените и тяхната средна стойност на 25(OH)D е  $71.40 \pm 36.15$  nmol/l. Твърде изненадващ е фактът, че тази стойност е почти двукратно по-висока от цитираната стойност ( $36.29 \pm 17.16$  nmol/l) от проучването на Борисова и съавт. [44], въпреки че и при двете проучвания са използвани хроматографски методи за

определяне на 25(OH)D. В цитираното проучване изследваната кохорта е подразделена на три възрастови групи (20-44, 45-69 и  $\geq 60$  години), но не са открити възрастови отличия в средните стойности на 25(OH)D между посочените групи. Като се има и предвид факта, че жените от първата възрастова група съставляват 41.4% от всички изследвани жени и възрастта им е сравнима с тази от нашето проучване, не би могло възрастта да се разглежда като определящ фактор за наблюдаваното различие между двете проучвания. Физиологичното състояние на изследваните жени не е упоменато (наличие на хронични заболявания и/или на бременност), а също липсват и данни за суплементиране с витамин D препарати. Освен тези фактори, важно е да се отбележи, че като голямо популационно изследване, то обхваща жени от големи и малки градове и селища с различен социо-икономически статус, докато при нашето изследване преобладават жените от голям град (Варна), с добър социален статус. Всички тези факти биха могли да обяснят това съществено различие в средните зимни стойности на 25(OH)D между двете проучвания. Изследването на Генова и съавт. [343] обхваща сравнително малка група изследвани жени (29 здрави небременни и 24 здрави бременни жени), като липсват данни за социално-икономическия им статус. Проведено е в края на зимния период на 2018 година, но обхваща и един от по-топлите месеци (май), като методологично отново е сравнимо с нашето проучване (използван е хроматографски метод за определяне на 25(OH)D). Интересен факт от това проучване е, че средната стойност на 25(OH)D за здравите небременни жени е статистически значимо по-ниска в сравнение с тази на бременните жени ( $41 \pm 13$  nmol/l vs  $60 \pm 22$  nmol/l съответно,  $p < 0.001$ ) и се доближава до тази, посочена при първото за страната ни популационно проучване относно витамин D статуса на изследователския екип на проф. д-р Анна-Мария Борисова [44]. Данни за суплементиране на здравите небременни жени липсват. Средната стойност на 25(OH)D за здравите бременни жени се доближава до тази за здравите бременни жени от нашето проучване за зимния период ( $60 \pm 22$  vs  $72.95 \pm 37.95$  nmol/l), но отново е по-ниска, вероятно поради по-ниския процент на суплементираните жени (33% за проучването на Генова и съавт. vs. 67% за настоящето проучване). В третото българско проучване [45], обхващащо сравнително голям брой изследвани бременни жени ( $n=547$ ) от 10 града и прилежащите им села (общо 84 селища) пробовземането и изследването на 25(OH)D е осъществено през месец октомври на 2019 година и се счита, че отразява натрупването на витамин D в организма на изследваните жени през летния сезон. Отново се открива значимо различие между средната стойност



за 25(OH)D, получена в това проучване в сравнение с тази за лятното полугодие от настоящото проучване ( $64.65 \pm 23.65$  nmol/l vs  $85.30 \pm 40.63$  nmol/l). Това различие би могло да се обясни със сравнително по-ниския процент на суплементиране, установено в посоченото проучване в сравнение с нашето (50.82% vs 67.18% съответно), вероятно отново отразяващо различния социо-икономически статус на жените, включени в тези две проучвания. Освен това съществува и методологично различие – серумните нива на 25(OH)D са определени с различни по тип методи, съответно с имунохимичен метод в проучването на Борисова и съавт. (2020) и хроматографски метод в настоящото проучване, което в известна степен затруднява сравнението.

Сравнението на нашите резултати с данни за средни нива на 25(OH)D от други страни и региони на света е още по-сложно и нееднозначно. В систематичния обзор на Saraf и съавт. [266] се обобщават данни от 95 проучвания, обхващащи различни и дефинирани от WHO региони по света (Северна и Южна Америка, Европа, Източно Средиземноморие, Югоизточна Азия, Западен Пасифик и Африка). Освен че са проведени в различни региони по света, те обхващат един много широк времеви диапазон – от 1959-та до 2012-та година, като 33% са осъществени преди 2000-та година, а 66% след това. Всичко това обуславя голяма вариация в начина на живот и жизнен стандарт на изследваните индивиди, което в голяма степен значимо повлиява нивата на 25(OH)D на организмово ниво (биологична вариация), но също така съществува и предпоставка за съществена аналитична вариация, тъй като през годините е имало различна възможност за използване на различни методи за определяне на 25(OH)D, някои от които с не особено добра аналитична надеждност. Така например само в девет от 95-те проучвания се използва LC-MS/MS метод. Данните за средните стойности на 25(OH)D за различните региони са обобщени в таблица 58.

**Табл.58** Серумни нива на 25(OH)D в проучвания от различни региони на света.

Регион	Брой проучвания	Времеви период за провеждане на проучванията	25(OH)D [nmol/l]
Северна и Южна Америка	24	1959-2007	52-60
Европа	33	1978-2010	15-72
Източно Средиземноморие	13	1997-2009	13-60
Югоизточна Азия	7	1997-2007	20-52
Западен Пасифик	16	1980-2012	42-72
Африка	2	2000-2004	92

Докато стойностите за Северна и Южна Америка варират в сравнително тесен интервал, то силно впечатление правят големите вариации за Европа, с най-ниски измерени стойности за Обединеното кралство през 80-те години ( $15\pm 13$  nmol/l) и доста по-високи през следващото десетилетие –  $50\pm 15$  nmol/l. Най-високи средни стойности за Европа са посочени за Дания ( $56^\circ$ с.ш.) за периода 2008-2010 година –  $73.3\pm 30.7$  nmol/l, измерени с помощта на LC-MS/MS [290]. Именно с тези стойности са сравними резултатите от нашето проучване.

Що се отнася до серумните нива на 25(OH)D в изследваните от нас три основни групи: здрави бременни жени ( $76.72\pm 37.14$  nmol/l), жени с GDM ( $73.98\pm 37.96$  nmol/l) и жени с PE ( $76.85\pm 42.92$  nmol/l) не установихме статистически значими различия между тях. В литературата се откриват противоречиви данни. Така напр. Burris и съавт. посочват в своя обзор от 2014 година, че в няколко проучвания от Иран, Австралия, Съединените щати и др. са установени значимо по-ниски серумни нива на 25(OH)D при жените с GDM в сравнение със здрави бременни жени, докато в други проучвания, проведени в Индия, Обединеното кралство и Северна Каролина подобно различие не е установено [51]. Трябва да се отбележи, че при по-задълбочен преглед на проучванията, посочени от Burris, се откриват както различия относно критериите за поставяне на диагнозата GDM, така и използване на различни методи за определяне на 25(OH)D. Подобни затруднения имахме и по отношение сравнение на нашите данни за средни стойности на 25(OH)D при здрави бременни жени и такива с прееклампсия с тези от

литературата. В обстойния обзор на Кагрова и съавт. [157] са посочени резултати от множество проучвания, в част от които има неразличаващи се средни стойности за 25(OH)D при двете обследвани групи, а дори и леко по-високи при жените с РЕ (основно за I-ви триместър от бременността, но с налични примери и за останалите триместри). В друга част от проучванията са установени значими различия (по-високи стойности при здравите бременни в сравнение с тези на жените с РЕ), като това различие е особено подчертано, когато се сравняват здравите бременни с жените с тежка форма на РЕ. Подобни разнопосочни резултати могат да се обяснят с различния дизайн на проучванията, различния брой и характеристики на подбраните за тях участници, различните критерии за поставяне на диагнозата РЕ и подразделянето ѝ на тежка и лека форма и др. Като пример, подкрепящ тези наблюдения, биха могли да се посочат резултатите на Васа и съавт.(2016) – за здравите бременни жени е получена средна стойност за 25(OH)D 64.6 (95% CI, 64.4–64.8) nmol/L, а за жените с преeklampсия – 57.8 (95% CI, 57.3–58.3) nmol/L. В същото време се подчертава, че при здравите жени преобладават тези от бялата раса, с нормално тегло и частно здравно осигуряване, докато при жените с РЕ преобладават жени с афро-американски произход, с по-висок BMI, по-ниска степен на образование и социален статус, всеизвестни фактори, повлияващи серумните нива на 25(OH)D [20]. Авторите заключават, че витамин D дефицитът увеличава риска от преeklampсия. За разлика от всички посочени проучвания, изследваните жени от нашето проучване са със значително по-хомогенна характеристика в социален аспект и по отношение на етноса.

## **2.2. Определяне на витамин D статуса и установяване честотата на витамин D дефицит и/или недостатъчност за цялата кохорта, както и за трите изследвани групи.**

Относно степените на насищане с витамин D в нашето проучване сме приложили предложената от Hollis (2011) скала, според която нива над 80 nmol/l се считат за оптимални, нива между 50-80 nmol/l са субоптимални и определят недостатъчност на витамин D, нива между 25-50 nmol/l говорят за изразена недостатъчност, а нива под 25 nmol/l определят витамин D дефицит. Според тази скала 54.05% от цялата изследвана кохорта са с нива под оптималните 80 nmol/l, т.е. малко повече от половината жени са с различна степен на витамин D недостатъчност и дефицит. Обезпокояващ е фактът, че една четвърт от всички изследвани жени (25.09%) са с изразена недостатъчност и дефицит, т.е. с нива под 50 nmol/l. Резултатът ни не се отличава съществено от този,

публикуван в проучването на Borissova и съавт. (2020) [45]. За жените с нива  $<50 \text{ nmol/l}$ , те установяват честота 27.06%, но да припомним, че тяхната изследвана кохорта е с разнообразен социален статус. В световен мащаб честотата на разпространение на витамин D дефицита в различните страни е различна и варира в широки граници, като нива на  $25(\text{OH})\text{D} <50 \text{ nmol/l}$  се доказват при 24% от населението на САЩ, 37% за Канада и 40% за Европа [ 61, 63, 267, 270]. Интересно наблюдение за нашия континент е установяването на по-високи серумни концентрации на  $25(\text{OH})\text{D}$  в по-северните страни, отколкото в по-южните страни и по-високи нива в западните, отколкото в източните страни [300]. Явлението се обяснява с приема на фортифицирани с витамин D храни, както и с приема на витамин D препарати и хранителни добавки в страните с по-добър витамин D статус. В сравнение с тези литературни данни ние се нареждаме сред страните с относително по-нисък дял на бременните жени с изразена недостатъчност и дефицит.

При определяне на витамин D статуса на бременните жени от трите основни изследвани групи се установи, че делът на жените с оптимални нива на  $25(\text{OH})\text{D} >80 \text{ nmol/l}$  е най-висок в групата на здравите бременни жени (47.31%), докато при жените с прееклампсия е по-нисък – 44.89%, а най-нисък е делът жените с GDM – 39.53%. Нива на  $25(\text{OH})\text{D} <50 \text{ nmol/l}$  (най-често използвани в литературата, когато става въпрос за сравнение на здрави бременни жени с жени с настъпило усложнение на бременността) се срещат в 24.55% за групата на здравите бременни жени, 26.53% при жените с PE и 27.91% при жените с GDM. От така анализирани данни, се установява, че най-добър витамин D статус имат здравите бременни жени, с по-неблагоприятен статус са жените с PE и с най-неблагоприятен статус са жените с GDM, но разликите между отделните групи не достигат статистическа значимост. В противовес на нашите данни са публикуваните от Zang и съавт. [334] резултати за американска извадка от бременни жени, които сочат статистически достоверни различия във витамин D статуса на здравите жени, от които само 14% са с със серумни нива на  $25(\text{OH})\text{D} <50 \text{ nmol/l}$  в сравнение с жените с GDM, при които делът на жените с нива  $<50 \text{ nmol/l}$  е около 2,5 пъти по-висок (33%,  $p < 0.001$ ). Авторите заключават, че изразените витамин D недостатъчност и дефицит могат да се асоциират с повишен риск от развитие на GDM. До обратни резултати достигат Farrant и съавт. [100]. Тяхната кохорта от изследвани лица е съставена от различни етноси с различен социоикономически статус и вероизповедание (индуси – 57%, мюсюлмани – 34%, християни – 9%, съответно с

медиани на 25(OH)D 40.0 nmol/l, 37.5 nmol/l и 41.0 nmol/l), между които не откриват статистически значими различия и с характерната особеност, че 66% от тях са с нива на 25(OH)D <50.0 nmol/l. Делът на жените с GDM за цялата изследвана група е 7%, абсолютно идентичен с този на жените с GDM с нива на 25(OH)D <50.0 nmol/l (7%), поради което изказват тезата си, че липсва асоциация между витамин D статус и възникване на GDM. При проучването на Makgoba и съавт. [190] не се откриват статистически значими различия както за средните стойности на 25(OH)D при здравите жени и тези с GDM, съответно  $47.6 \pm 26.7$  и  $47.2 \pm 26.7$  ( $p=0.863$ ), така и за процентния дял на здравите жени с нива на 25(OH)D <50.0 nmol/l и този при жените с GDM (57.0% vs. 62.2% съответно,  $p=0.502$ ). Тъй като тази популация от Обединеното кралство е твърде хетерогенна по етническа принадлежност и BMI, е направена допълнителна статистическа обработка на данните за ажустиране на  $p$  стойностите, но това не довежда до промяна в значимостта. Важно е да се подчертае, че и при трите цитирани проучвания критериите, според които е поставена диагнозата GDM, са различни от препоръчаните към настоящия момент критерии на IADPSG (International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups), както са използвани и различни методи за определяне на 25(OH)D. В по-скорошно проучване, отнасящо се до жени от Саудитска Арабия, при което са спазени критериите на IADPSG, се заключава че има повишен риск от развитие на GDM при тези от тях с нива на 25(OH)D <50.0 nmol/l, посочвайки че делът на здравите жени с такъв неблагоприятен витамин D статус е значимо по-нисък от този при жените с GDM (съответно 82.5% vs 93.1%,  $p=0.006$ ) [5].

По отношение на прееклампсията и витамин D статуса нашите данни не доказват съществени различия – както средните стойности на 25(OH)D, така и делът на жените с нива <50.0 nmol/l при здравите и тези с PE са приблизително еднакви. За разлика от нас Baker и съавт. (2010) доказват значими различия както за средните нива (98 nmol/l vs 75 nmol/l съответно за здравите и тези с PE,  $p<0.01$ ), така и за процента на жените под <50.0 nmol/l – здравите жени са два пъти и половина по-малко от тези с PE (10% vs. 26% съответно,  $p<0.01$ ) [24]. За разлика от Baker и съавт., и подобно на данните от настоящото проучване, Shand и съавт. (2010), изследвайки канадска популация, и Fernández-Alonso и съавт. (2012), изследвайки испанска популация, не намират асоциации между витамин D статуса и риск от възникване на прееклампсия [274, 104]. Едно от възможните обяснения за липсата на различия във витамин D статуса при нашето изследване би могло да бъде, че в нашето проучване пробовзимането при

амбулаторно проследяваните здрави жени е вземано основно в 24-та – 28-ма г.с., докато при жените с РЕ е осъществено на по-късен етап, в момента на тяхната хоспитализация (основно в 34-та – 36-та г.с.) и е възможно нарастване на 25(OH)D нивата в хода на бременността. В подкрепа на тази хипотеза е проучването на Bärebring и съавт. (2016), които установяват покачване на 25(OH)D нивата в последния триместър, по-изразено за жените с шведски произход, отколкото за жените с неевропейски произход [27]. В множество проучвания се твърди, че липсват подобни промени в хода на бременността, а Fernández-Alonso и съавт. (2012), дори констатираат, че 25(OH)D нивата намаляват значимо от първи към трети семестър [104].

### **2.3. Оценка влиянието на сезона върху витамин D статуса на изследваната кохорта.**

Сезонът е добре известен фактор, който повлиява серумните нива на 25(OH)D при изследваните индивиди. В настоящето проучване средната измерена стойност на 25(OH)D при всички бременни жени, изследвани през зимното полугодие, е  $71.40 \pm 36.15$  nmol/l, която е статистически значимо различна от средната измерена стойност на 25(OH)D при всички бременните жени, изследвани през лятното полугодие ( $85.30 \pm 40.63$  nmol/l,  $p=0.0109$ ), т.е. сезонните вариации са установени и важат за цялата изследвана кохорта жени. Вече коментирахме факта, че установените от нас средни стойности от резултатите на цялата кохорта, независимо от сезона, се отличават от тези, констатирани в другите български проучвания. Що се касае за сезонните различия в нашето проучване през летния сезон се достигат оптимални нива на витамин D, докато в проучването на Борисова и съавт. [45], са значително по-ниски ( $64.65 \pm 23.65$  nmol/l) и са сравнително доста отдалечени от оптималната граница от 80 nmol/l. Това отдадохме както на различния социален статус на изследваните жени от двете проучвания, така и на по-ниския процент на прием на витамин D суплементи (50.82% vs. 67.18%), така и на различните използвани методи за определяне на витамин D. Що се отнася до зимния период за нашата страна, можем да се сравним само с проучването на Генова и съавт. [343]. Средната стойност на 25(OH)D за здравите бременни жени се доближава до тази от нашето проучване за зимния период ( $60 \pm 22$  vs.  $72.95 \pm 37.04$  nmol/l), но отново е по-ниска, вероятно поради твърде малкия брой изследвани бременни жени в посоченото проучване, както и поради по-ниския процент на суплементираните жени (33% vs 67%).

Не е изненадващ фактът, че в настоящото проучване и честотното разпределение на бременните жени по отношение на витамин D статуса им е зависим и по-благоприятен

през лятното полугодие, отколкото през зимното. Жените с оптимален статус на 25(ОН)D (>80 nmol/l) са с 15.55% (или 1.4 пъти) повече през летния период отколкото през зимния период и обратно, жените с критичните нива на 25(ОН)D <25 nmol/l са почти трикратно повече в процентно отношение през зимното полугодие в сравнение с лятното полугодие (6.02% vs 2.15%).

От така анализирани факти може да се обобщи, че сезонът е съществен фактор, определящ серумните нива на 25(ОН)D с по-високи средни нива през лятното полугодие както за цялата изследваната кохорта, така и за трите основни групи. Благоприятният летен сезон подобрява и честотното разпределение на жените според техния витамин D статус.

Многобройни са литературните източници от всички региони на света, в които също са доказани сезонни вариации в серумните нива на 25(ОН)D при бременните жени. Повисоките серумни нива през летния сезон естествено се обясняват с по-продължителното излагане на бременните жени на слънце, чиито лъчи в този период на годината падат и по по-подходящ ъгъл спрямо земната повърхност. Интригуваща в това отношение е публикацията за канадски бременни жени на Shand и съавт. (2010), които не откриват статистически значими различия в серумните нива на 25(ОН)D през отделните периоди на годината [274], вероятно поради факта, че 96% от изследваните от тях жени са суплементирани с витамин D препарати, като 49% от тях са ги приемали и преди настъпването на бременността.

#### **2.4. Оценка влиянието на индекса на телесната маса върху витамин D статуса за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи.**

Както вече се отбеляза в т.1.2. от дискусията един от рисковите фактори за възникване на неблагоприятни усложнения на бременността както за майката, така и за новороденото, е и повишеният ВМІ. По нива на средния изчислен ВМІ за цялата група изследвани бременни жени от нас ( $23.08 \pm 3.93 \text{ kg/m}^2$ ) заемаме едно междинно място измежду различните страни по света, характеризиращи се с различни темпове на нарастване на ВМІ всред бременните жени.

Vitner и съавт. [305] обобщават данни относно честотата на наднормено тегло и затлъстяване при бременни жени за предходните две десетилетия, съобщени от различни асоциации на акушер-гинеколози по света (таблица 59):

**Табл.59** Честота на наднормено тегло и затлъстяване при бременни жени по света

<b>RANZCOG</b> (Royal Australian and New Zealand College of Obstetricians and Gynecologists)	<b>RCOG</b> (Royal College of Obstetrics and Gynecology, UK)	<b>SOGC</b> (Society of Obstetrics and Gynecologists of Canada)
50% (включени са жени с наднормено тегло и затлъстяване)	16-19% (включени са само жени със затлъстяване)	10.2% (включени са само жени със затлъстяване)

Общата честота на жените с наднормено тегло и затлъстяване в нашето проучване е 28.57%, а на тези със затлъстяване е 4.63%. В сравнение с развитите страни честота на затлъстяване в изследваната от нас кохорта е от два до четири пъти по-ниска. От единственото засега популационно проучване за витамин D статус и бременни жени за нашата страна, са публикувани данни относно BMI на бременните жени на последния Национален симпозиум на Българското дружество по ендокринология [347]. В този доклад делът на жените с  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$  е 30.3%, по-висок от този, наблюдаван в нашата кохорта изследвани жени – 28.57%. Интересно е, че делът на бременните жени със затлъстяване от това проучване е повече от два пъти по-висок в сравнение с този от настоящото проучване (10.2% vs. 4.63%, съответно) и идентичен с този в Канада. Все още не са съобщени зависимости между BMI и серумните нива на витамин D от цитираното популационно проучване. Що се касае за нашето изследване, ние не установихме значими различия в серумните нива на 25(OH)D в групата с нормално телесно тегло и тази с наднормено тегло ( $76.59 \pm 39.53 \text{ nmol/L}$  vs  $74.43 \pm 34.91 \text{ nmol/L}$  съответно,  $p=0.907$ ). Интересно е, да се отбележи, че когато се изследват тези зависимости в трите основни групи се откриват статистически значими различия за здравите бременни жени ( $p=0.035$ ) и при тези с прееклампсия ( $p=0.011$ ), за разлика от групата с GDM, в която не се достига до статистическо значимо различие. Евентуално обяснение за находката при групата с GDM е не само, че тя е най-малобройната, но и че жените от тази група приемат най-висока ежедневна доза от витамин D препарати в сравнение с останалите две групи. Друг интересен факт е, че междугруповите различия са статистически значими при жените с наднормено тегло, като най-ниски са стойностите при жените с PE, чийто среден BMI е най-висок и почти достига достоверно различие с този на здравите бременни жени ( $24.25 \text{ kg/m}^2$  vs.  $22.69 \text{ kg/m}^2$  съответно,  $p=0.051$ ). Междугруповите различия при жените с нормално телесно тегло не са статистически достоверни. Би могло да се заключи, че увеличеният BMI е неблагоприятен фактор относно витамин D статуса на изследваните бременни жени.



Сравнението на нашите данни по отношение на BMI и витамин D статуса с данни от световната литература е отново затруднено поради ред причини, част от които вече изтъкнати: различни методи за измерване на серумните нива на 25(OH)D, различни критерии за определяне на витамин D дефицит, а дори и различни критерии на WHO относно BMI за различните региони на света. Така например WHO определя като критерий за наднормено тегло за жените с азиатски произход стойност на BMI  $\geq 24$  kg/m<sup>2</sup>. Любопитно е изследването на Shand и съавт. [274] относно канадска популация бременни жени, в която не се открива статистически достоверна разлика относно медианите на серумните нива на 25(OH)D при жените с различен BMI, като отново е необходимо да се припомни високото ниво на суплементация при тази популация. Обратно Zhang и съавт. [335] откриват статистически значимо различие в BMI при китайски жени с достатъчни според тях нива на 25(OH)D  $\geq 50$  nmol/l в сравнение с тези от тях с нива на 25(OH)D  $< 50$  nmol/l ( $20.71 \pm 2.58$  kg/m<sup>2</sup> vs.  $21.09 \pm 2.73$  kg/m<sup>2</sup> съответно,  $p < 0.0001$ ).

## **2.5. Оценка зависимостта на витамин D статуса от приема на витамин D като фармацевтичен продукт и/или хранителни добавки, съдържащи витамина, за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи.**

Вследствие на многобройните научни изследвания и публикации от последните две и повече десетилетия, разкриващи от една страна некалциемичните ефекти на витамин D, а от друга повсеместното разпространение на неговия дефицит или недостатъчност, се достигна до промяна в нагласата относно нуждата от суплементиране с витамин D препарати на различни таргетни групи – от здрави индивиди до индивиди, засегнати от хронични метаболитни, инфекциозни, автоимунни и неопластични заболявания. Това важи в голяма степен и за бременните жени. В настоящото проучване над две трети от изследваните бременни жени се суплементират и средната стойност на измерените им серумни нива на 25(OH)D ( $86.41 \pm 38.50$  nmol/l) е в зоната на оптималния витамин D статус. За разлика от тях несуплементираните жени имат значимо по-ниска средна стойност ( $56.05 \pm 29.78$  nmol/l), която се намира близо до граничната стойност от 50 nmol/l, диференцираща изразената витамин D недостатъчност от по-леката степен на витамин D недостатъчност. Естествено е суплементирането с витамин D препарати да доведе и до различия в честотното разпределение на жените според витамин D статуса им. При суплементиране процентът градивно расте с подобряване на витамин D статуса – около 12% са в състояние на дефицит и изразена недостатъчност (т.е.  $< 50$  nmol/l), а

близо 60% са в състояние на достатъчност, докато при несуплементираните жени над 50% са в състояние на дефицит и изразена недостатъчност и само 21% са в състояние на достатъчност. Вече споменахме, че в проучването на Борисова и съавт. [45] процентът на суплементираните бременни жени е по-нисък в сравнение с нашето (50.82% vs 67.18% съответно), което води и до разлики и в честотното разпределение на жените според витамин D статуса им в двете проучвания. Така например процентът на суплементираните жени, достигнали състояние на достатъчност от цитираното проучване е почти двукратно (1.86 пъти) по-малък от този в настоящото проучване (31.29% vs. 58.05% съответно), както и жените със стойности под 50 nmol/l са 21.94% спрямо 12.06% от настоящото проучване, отново почти двукратна разлика (1.82 пъти). В посоченото проучване е посочен единствено процентът на суплементираните жени, като не е дадена информация относно ежедневния им прием на витамин D препарати. Предполагаме, че по-ниският социален статус на жените от това проучване, обхващащо както големи, така и малки селища, определя и по-ниски дози на приеманите суплементи, което би могло да обясни наблюдаваните различия в двете проучвания.

По отношение на ежедневния прием на витамин D препарати, в нашето проучване той варира в доста широки граници от 0 IU до 3400 IU, като среднодневният прием се отличава при трите основни изследвани групи и ако за здравите бременни жени и тези с GDM е сравнително еднакъв, то за жените с PE е почти трикратно по-нисък. В тази група и честотата на жените, неприемащи изобщо витамин D препарати, е почти двукратно по-висока от тази в другите две изследвани групи. Посочените различия са статистически значими.

Изследвано е и честотното разпределение на жените както според ежедневния им прием на витамин D препарати, така и според телесното им тегло. При съпоставяне на данните от таблица 31 на стр. 48, отнасяща се за цялата изследвана кохорта, се оставя с впечатлението, че жените с висок BMI имат по-ниска нагласа да се суплементират, но непараметричният Chi-квадрат анализ не доказва статистически значими различия ( $\chi^2=4.50$ ,  $p=0.1054$ ) между така подразделените групи. На фигура 22 от стр. 49 е показано честотното разпределение на бременните жени в трите основни групи според BMI и приема им на витамин D препарати, на която ясно се вижда, че жените с наднормено тегло и в трите изследвани групи имат по-ниска нагласа да се суплементират с витамин D препарати, особено проявена при групата бременни жени с PE. Трябва да се отбележи съществения факт, че при групата бременни жени с PE съотношението на жените с

наднормен BMI спрямо нормален BMI, както и с гестационно наддаване над допустимото в сравнение с нормално GWG е двукратно по-голямо от това в групите на здравите жени и тези с GDM. Освен това средната възраст на жените от тази група е най-висока, значимо различна от тази на здравите бременни жени. Всички тези фактори и неадекватното суплементиране с витамин D препарати в тази основна група изследвани жени определят значимо по-ниска средна стойност на серумните нива на 25(OH)D при тези от тях с наднормен BMI в сравнение с жените с нормален BMI ( $60.47 \pm 31.85$  vs.  $91.19 \pm 46.73$  съответно,  $p < 0.011$ ).

По отношение на суплементирането с витамин D препарати бихме могли да твърдим, че имаме регионални различия в страната и че един по-добър социоекономически статус на жените предопределя по-съзнателно отношение и нагласа към суплементиране с витамин D препарати, в дози често надскачащи препоръчителните към този момент от здравните регулатори 600 IU/дневно.

По отношение на нагласите за суплементиране с витамин D на бременните жени от различните етноси в страни от Западна и Северна Европа, както и в Северна Америка има многобройни публикации. Така например в проучването на Eggemoen и съавт. [95] се посочва за Норвегия, че две трети от европейките и жените с произход от Източна Азия приемат витамин D препарати, докато само 50% от жените от останалите етнически групи се суплементират. Серумните нива на 25(OH)D варират в широк диапазон от  $< 12$  pmol/l до 148 pmol/l със съществени различия между отделните етноси. Така честотата на стойности  $< 50$  pmol/l при жени с произход от Южна Азия е 84%, от Средния Изток – 79%, от Африка – 75%, от Източна Азия – 43% и от Западна Европа – 20%. Като основни фактори, водещи до тези съществени различия между бременните жени от различните етноси и посочени от авторите са освен сезона, но и образованието и суплементирането с витамин D препарати. В сравнение с така изнесените данни от посоченото проучване, данните от настоящото проучване относно витамин D суплементирането се доближават до резултатите за жените с европейски произход в Норвегия, като само една трета не се суплементират, а две трети приемат витамин D препарати (85 спрямо 174 жени съответно).

## **2.6. Оценка влиянието на витамин D статуса относно неблагоприятния изход от бременността по отношение на новороденото и възникването на преждевременно раждане и раждане на дете с ниско тегло при здрави бременни и жени с усложнения на бременността**

Преждевременното раждане (РТВ) е най-честата причина за неонатална смърт в световен мащаб и втората по честота причина за смърт при деца под 5 годишна възраст [312]. Според Agarwal и съавт. витамин D дефицитът в периода на бременността и свързаната с него потисната имунна функция, биха могли да повлияят патологичните механизми за възникване на РТВ [4]. Резултатите от проучванията в областта отново са противоречиви. В мета-анализ на Lian и сътр. (2021), корелацията между дефицита на витамин D при бременните жени през първи, втори или трети триместър на бременността и развитието на РТВ не е статистически значима. В този мета-анализ 13 от общо 24 обсервационни проучвания ясно съобщават за липса на зависимост между ниските серумни нива на 25(OH)D в периода на бременността и възникването на усложнението [177]. От друга страна има и проучвания, които откриват връзка между дефицитните нива на витамина при майката и РТВ [21,160] или доказват 60% по-нисък риск от РТВ при бременни жени с достатъчност на витамина (25(OH)D>100nmol/l) [4, 196]. В нашето проучване честотата на РТВ е 12.45% или от общо 257 новородени 32 са преждевременно родени, като приблизително две трети от тях (n=22) са родени от жените с PE. От проведения корелационен анализ за зависимостта на настъпване на усложнението РТВ от приема на витамин D и от серумните концентрации на 25(OH)D, най-съществена зависимост се установи в групата на бременните жени с PE. В тази група се установи и най-ниска нагласа за суплементиране с витамин D препарати (57.14% от тях изобщо не се суплементират), както и това е групата с най-високата средна стойност на BMI. Почти половината от жените с PE (42.86%) са с BMI≥25, при които са установени и най-ниските стойности на медианата и IQR – 53.80 (42.23 – 67.05). Освен това според Tamblын и съавт. (2017) съществува ускорен метаболизъм на 25(OH)D в плацентата на жените с PE, превръщайки го в неактивния му метаболит 24,25(OH)2D и/или епимеризирайки го до 3-epi-1,25(OH)2D. Последният има възможност да се свърже с VDR, но не е способен да задейства VDR сигнализацията в същата степен както активния хормон 1,25(OH)2D. Всички тези наблюдения в известна степен изясняват поне част от свързаните с витамин D патологични механизми, развиващи се при прееклампсията [295].

Друг неблагоприятен изход от бременността е раждане на дете с ниско тегло, т.е. <2500 g. Разнообразни фактори биха могли да обусловят такъв изход от бременността, като в редица проучвания се изследва връзката между серумните нива на 25(OH)D на бременната жена и теглото на новороденото при раждане. Тъй като витаминът играе

важна роля във феталния растеж чрез регулиране на калциевата хомеостаза и нивата на PTH [142], ниската концентрация на 25(OH)D при майката би могла да доведе до неоптимален размер и плътност на костите и да причини раждане на новородено с LBW [303]. Друг възможен механизъм, обясняващ корелацията между нивата на витамин D и теглото на новороденото при раждане, би могъл да бъде противовъзпалителният ефект на витамина и ролята му в регулацията на плацентарното възпаление [74]. В свое проучване Chen и съавт. (2015) предполагат, че дефицитът на витамин D, чрез намаляване нивата на IGF-1, би могъл да се асоциира с раждане на новородено с LBW [75]. В няколко проучвания майчините нива на 25(OH)D се тестват в различни периоди на бременността и се установява наличие на положителна корелация между концентрациите на витамина и теглото на новороденото при раждане [209]. Други проучвания в областта не доказват съществуването на подобна връзка [11, 258].

Честотата на LBW сред новородените в нашето изследване е 13.23% (n=34). Най-висок процент на усложнението се откри при бременните жени с прееклампсия – 33.33% (n=16). Честотата на LBW при участниците с GDM е 13.95% (n=6), а при здравите – 7.23% (n=12). Интересен факт е, че честотно разпределение на бременните жени според приема на витамин D препарати за цялата изследвана кохорта и теглото на техните новородени показва, че приемът на витамин D е значим фактор за раждане на дете с ниско тегло ( $\chi^2=38.02$ ,  $p<0.0001$ ). Това се потвърди и когато проследихме честотното разпределение в трите основни групи изследвани бременни жени, особено ясно проявено при здравите бременни жени и тези с PE. При сравняване на средните стойности на прием на витамин D при бременните жени, родили деца с нормално тегло спрямо тези, родили деца с ниско тегло се установява, че при първата група приемът е  $824.26\pm 2167.65$ , а при втората е  $525.00\pm 810.39$ , отличаващ се над 1.5 пъти. До статистическа достоверност на това различие не се достигна, вероятно поради твърде големите вариации в приеманите единици на витамин D суплементи. За съжаление не се достигна до различие в измерените серумни нива на 25(OH)D при така подразделените две групи ( $76.17\pm 38.33$  nmol/l vs  $75.31\pm 40.40$  nmol/l съответно,  $t=0.121$ ,  $p=0.904$ ). Тази липса на различие предполагаме, че се дължи на множеството фактори, които влияят на серумните нива на 25(OH)D като сезонност, BMI, начин на живот и др. Майките на сравнително малката група родени деца с LBW не биха могли да бъдат подразделени в зависимост от всички тези фактори, за да се опитаме да установим, кой от всички тях

повлиява невъзможността да открием очакваното от нас различие в серумните нива на 25(OH)D.

Доказателства от немалкото на брой рандомизирани контролирани проучвания относно суплементирането с витамин D и ефекта върху теглото на новородените са разнопосочни, но това най-вероятно се дължи на хетерогенността на проучванията. В повечето систематични прегледи и мета-анализи обаче, като например този на Maugeri и съавт. (2019) се потвърждава позитивната асоциация между витамин D суплементирането на майките и теглото на техните новородени [195].

Дали дефицитните серумни нива на витамин D имат отношение към възникването на усложнения на бременността и раждането като прееклампсия, GDM, РТВ и LBW е въпрос, който подлежи на допълнителни проучвания. Погледнато в исторически план, суплементирането с този важен микронутриент е довело до значимо постижение през миналия век, като преодоляването на проблема с рахита в световен мащаб. Понастоящем остава да се потвърдят по-категорично некалциемичните ефекти на витамин D за общото здраве на индивидите, включително това на бременните жени и новородените. Промяната на начина на живот и суплементирането с витамин D биха могли да допринесат съществено за подобряване на общественото здраве.

### **3. Витамин В12 статус на бременните жени.**

#### **3.1. Серумни нива на тотален витамин В12, активен витамин В12 и метилмалонова киселина. Витамин В12 статус на бременните жени и честотата на витамин В12 дефицит и/или недостатъчност за цялата кохорта, както и за трите основни изследвани групи.**

В съвременното общество консумацията на продукти от животински произход често е ограничена, а това предопределя възникването и по-широкото разпространение на витамин В12 дефицит или недостатъчност [117]. Освен от приема с храни и добавки, нивата на витамина зависят и от абсорбцията му в червата. Малабсорбцията на витамин В12 също може да бъде причина за недостатъчност или дефицит и свързаните с тях неблагоприятни клинични прояви [297]. Широкото разпространение на субклиничен витамин В12 дефицит в общата популация, предоставя достатъчно силен аргумент, че статусът на витамина може да бъде компрометиран и в периода на бременността, както и от повишените метаболитни изисквания за плода. Бременните и кърмещите жени, следващи вегетарианска или веганска диета, включително и тези от развиващите се региони на света, с лош достъп до храни от животински произход, са изложени на

сравнително висок риск от развитие на витамин В12 дефицит [252]. Тъй като витаминът заема централна роля в процесите на неврална миелинизация и развитие на мозъка, адекватните концентрации по време на бременност са от първостепенно значение за нормалните растеж и развитие на плода [31, 291, 292, 328, 330].

Литературните данни за разпространението на витамин В12 дефицита и недостатъчността често са противоречиви и различни, в зависимост от лабораторния параметър избран за проследяване. Това не е изненадващо, тъй като всеки един от маркерите, определящ статуса на витамина, реагира по специфичен начин на етапа на дефицит и възрастта на пациента. Като първоначален скринингов маркер за дефицит на кобаламин в практиката се използва тоталният серумен витамин В12. Това е и най-често анализираният лабораторен параметър. При нужда от последващо доуточняване на статуса на витамина, се препоръчва определянето на допълнителни показатели – активен витамин В12, ММА и хомоцистеин. В съответствие с проучената литература, наличен витамин В12 дефицит се приема при серумни концентрации на тотален витамин В12 < 148 pmol/l, а недостатъчност на витамина или граничен дефицит, при концентрации от 148 pmol/l до 250 pmol/L [8, 56]. В нашето проучване средните измерени стойности на параметъра тотален витамин В12 за цялата кохорта са 177.58±90.24 pmol/l или концентрации попадащи в областта на недостатъчност на витамина. По литературни данни, нивата на общ витамин В12 в хода на бременността намаляват с приблизително 20% от 20 до 36 г.с., но това изолирано понижение на стойностите във втори и трети триместър на бременността не се дължи на истинско изчерпване на витамина [126]. Понижението в концентрациите на параметъра се обяснява чрез промененото свързване на кобаламина с белтъка хаптокорин. Интересно е, че не се установяват промени в нивата на активния витамин В12 в хода на бременността [145]. Последният представлява 20 – 30% от нивата на общия серумен витамин и се приема като потенциално по-добър маркер за адекватност и преценка на метаболитните функции на кобаламина. При стойности на активния В12 (holo-TC) между 35 и 45 pmol/l в практиката се дефинира състояние на наличен витамин дефицит. При индивиди с увредена бъбречна функция е установено, че концентрациите на параметъра активен витамин В12 се увеличават, но при състояние на бременност нивата не се променят и могат да се използват като добър лабораторен маркер за определяне статуса на бременните жени [8]. Във връзка с изложеното до тук, наличен витамин В12 дефицит при участниците в нашето проучване се реши да се приема при серумни концентрации на активен витамин В12 <35 pmol/l.

Средните измерени стойности за параметъра holo-TC при всички жени, включени в проучването са  $73.26 \pm 53.25$  pmol/l или концентрации попадащи в областта на достатъчност на витамина.

При нива на holo-TC в диапазона между 35 и 50 pmol/l, под внимание се взеха и получените резултати за функционалния параметър – MMA. Метаболитът не се влияе от концентрациите на фолат или други витамини от групата В и представлява относително специфичен и чувствителен биомаркер за определяне витамин В12 статуса на организма. При наличен витамин В12 дефицит серумните концентрации на MMA се повишават [125]. Във връзка с проучената литература при серумни концентрации на MMA > 300 pmol/l се прие витамин В12 дефицит, а при участниците с активен витамин В12 > 50 pmol/l и MMA > 300 pmol/l – състояние на недостатъчност на витамина. В нашето проучване средните измерени стойности на MMA за цялата кохорта бременни жени са  $249.53 \pm 154.73$  pmol/l, или концентрации отново попадащи в областта на достатъчност на витамина.

В връзка с поставените нови критерии за определяне витамин В12 статуса (holo-TC < 35 pmol/l или holo-TC 35 – 50 pmol/l и MMA > 300 pmol/l) в общата група на изследваните от нас бременни жени се установи витамин В12 дефицит при 22.78% (n=59), а недостатъчност (holo-TC > 50 pmol/l и MMA > 300 pmol/l) при 10.42 % (n=27).

В световен мащаб разпространението на витамин В12 дефицита в хода на бременността е различно. В югоизточен регион на Турция, дефицит на витамин В12 е докладван при 72% от майките и 41% от новородените, а тежък дефицит при 48% от жените и 23% от децата [252]. В САЩ дефицитът на витамина варира от 6% до 25% в зависимост от етническата принадлежност [8], в Обединеното кралство – около 20% [2], а в Канада съобщават за 10% до 21% от бременните жени в 16 г.с. и съответно от 23% до 35% при жените в 36 г.с. [317]. В проучване на Finkelstein и съвт. (2017), проведено сред бременни жени в Индия, разпространението на дефицита е още по-високо – 51% от майките са с дефицит, а при 42% се установява нарушен витамин В12 статус [108]. Данни за разпространението на витамин В12 дефицита сред бременните жени в България до този момент не са публикувани. Доколкото ни е известно проведеното от нас изследване е първото за страната. Получените резултати за честота на витамин В12 дефицит и недостатъчност (съответно 22.78% и 10.42%) подреждат България на място сред развитите страни по света, в които начинът на живот и хранене на бременните жени



са съобразени с изискванията и световните препоръки, а грижите за бъдещото потомство са от първостепенно значение.

Наличието на витамин В12 дефицит в периода на бременността се свързва с появата на различни усложнения при бременните жени, като развитието на прееклампсия остава едно от най-тежко протичащите [237]. Известно е, че ниските нива на кобаламин и фолат, причиняващи хиперхомоцистеинемия, способстват за повишаване на оксидативния стрес и ендотелното увреждане [271] и могат да се свържат с възникването на усложнението [192]. В проучването на Serrano и съавт. (2018) изследователите установяват, че повишените серумни концентрации на хомоцистеин в периода на бременността са рисков фактор за появата на РЕ, но връзката между дефицитния витамин В12 статус на бременните жени и усложнението остава неизяснена [271]. В наскоро проведен мета-анализ, обхващаш общо 21 проучвания за 3211 бременни жени (1390 случая и 1821 контроли) се установява, че серумните концентрации на тотален витамин В12 при жените с прееклампсия са значително по-ниски, в сравнение с нивата при здравите контроли, но отделните проучвания, събрани в мета-анализа, съобщават и разнопосочни резултати [192]. В нашето проучване средната измерена стойност на параметъра тотален витамин В12 при участниците с прееклампсия е  $159.68 \pm 68.97$  pmol/l (медианата 246 pmol/l; обхват 76 – 416 pmol/l). Малко по-високи са резултатите получени при здрави –  $175.43 \pm 87.72$  pmol/l (медиана 434.5 pmol/l; обхват 87 – 782 pmol/l). Средните серумни концентрации за параметъра holo-TC са близки при двете изследвани групи, а за MMA има тенденция за различие, като средната стойност за жените с прееклампсия (271.61 nmol/l) доближава cut-off стойността от 300 nmol/l. В съображение с избраните нови критерии за приемане на витамин В12 дефицит, по-висок процент на състоянието се установява при жените с прееклампсия – 26.53%, спрямо 23.95% за групата на здравите контроли. В проведеното от нас проучване за витамин В12 статуса на бременни жени статистически достоверна разлика между средните измерени серумни концентрации за активен витамин В12 не се установи при групата с прееклампсия и здравите контроли, докато за MMA има тенденция за статистическо различие. Подобни резултати се съобщават и от други изследователи. Най-вероятно развитието на усложнението не зависи само от измеримия дефицит на витамина, но и от съвкупността на много други и различни етиологични и патогенетични фактори.

Освен с появата на хипертензивни усложнения, витамин В12 дефицитът в периода на бременността се свързва и с развитието на GDM. И в тази област на изследване,

данните в литературата са спорни и нееднородни [167]. При проследяване резултатите от 15 клинични проучвания, Chen и съавт. (2022) не установяват връзка между развитието на усложнението и дефицитния статус на витамин В12 през I-ви триместър на бременността, но откриват, че измерените през II-ри или III-ти триместър ниски нива на витамина са пряко свързани с повишен риск от възникване на заболяването [73]. Подобни резултати са получени и в друг мета-анализ [307]. В проучването на Li и съавт. (2019), сред бременни жени в Китай, авторите установяват, че най-висок риск за поява на GDM съществува при майки с комбинация от дефицит на витамин В12 и високи серумни нива на фолиева киселина (OR=3,08), а високите концентрации на кобаламин самостоятелно, водят до намаляване на вероятността за възникване на усложнението (OR=0.30) [176]. В същото клинично проучване се доказва, че по-голям риск от GDM има при участниците, при които високият фолат и дефицитният витамин В12 статус са придружени от допълнителни фактори, като напреднала възраст на бременните жени и по-висок BMI преди зачеването. При нас средната измерена стойност на параметъра тотален витамин В12 в групата на бременните жени с GDM е  $206.32 \pm 113.72$  pmol/l (медиана 338.5 pmol/l; обхват 89 – 588 pmol/l), тази на holo-TC е  $88.18 \pm 61.85$  pmol/l (медиана 187.7 pmol/l; обхват 16.40 – 359 pmol/l), а на метаболитния параметър MMA е  $245.07 \pm 146.47$  nmol/l, (медиана 387.15 nmol/l; обхват 82.95 – 691.35 nmol/l). Средните измерени концентрации за тотален и активен витамин В12, получени при здравите контроли са по-ниски от тези, измерените при участниците с GDM, а честотата на витамин В12 дефицит в групата на здравите бременни жени (23.95%) е по-висока от честотата на дефицит при бременните жени, развили усложнението (18.60%). Така връзка между витамин В12 дефицитния статус на участниците и появата на гестационен захарен диабет в нашето проучване не се доказва. Подобни резултати получават и други изследователи [71]. Данните по отношение връзката на витамин В12 статуса на бременните жени и развитието на GDM продължават да са противоречиви. Вероятно хранителните дисбаланси действат не самостоятелно, а синергично с останалите майчини рискови фактори, водещи до увеличаване риска за възникване на усложнението [188].

### **3.2. Оценка влиянието на сезона върху витамин В12 статуса на изследваните бременни жени.**

В литературата се откриват оскъдни данни относно влиянието на сезона върху нивата на параметрите, отразяващи статуса на витамин В12. В човешкия организъм

витами́нът постъпва основно чрез храната и хранителните добавки. Тъй като основните източници на витамин В12 са главно хранителните продукти с животински произход, то статусът на витамина ще се повлиява основно от приема на тези храни. В проучването на Tong (2021) и съавт., изследователите установяват по-високи серумни концентрации на витамин В12 през зимните месеци на годината и съответно по-ниски нива на витамина, измерени през лятото и есента ( $p < 0.05$ ) [297]. По аналогичен начин в нашето проучване, измерените средни стойности на лабораторните маркери тотален и активен витамин В12 на бременните жени включени в проучването, са по-високи през зимното полугодие, в сравнение с лятното полугодие на годината ( $186.93 \pm 100.25 \text{ pmol/l}$  и  $78.02 \pm 61.77 \text{ pmol/l}$  vs  $160.88 \pm 64.94 \text{ pmol/l}$  и  $64.78 \pm 30.55 \text{ pmol/l}$ ), но измерените средни серумни концентрации на метаболитния параметър ММА не се различават ( $248.89 \pm 147.21 \text{ nmol/l}$  vs  $250.78 \pm 167.69 \text{ nmol/l}$ ). Получените данни показват тенденция към по-добър витамин В12 статус на участниците, включени в проучването през студените месеци на годината, в сравнение с лятното полугодие. Тъй като витамин В12 не може да се синтезира в човешкия организъм и нивата му зависят изцяло от набавянето му чрез екзогенни източници и тяхното усвояване [10], по-добрият витамин В12 статус на бременните жени, включени в проучването през зимното полугодие може да се обясни с промени в модела на хранене в посока повишен прием на храни от животински произход, в които съдържанието на кобаламин е високо.

### **3.3. Оценка влиянието на индекса на телесната маса върху витамин В12 статуса за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи бременни жени.**

В световен мащаб, във всички възрастови групи се наблюдава тенденция за увеличаване на наднорменото тегло и затлъстяването. Увеличаването на теглото в репродуктивната възраст на населението, също нараства с относително бързи темпове. В проучената литература се откриват множество доказателства, подкрепящи твърдението, че дефицитът на микроелементи играе важна роля в процеса на адипогенезата [2]. Известно е, че при окислението на мастните киселини на митохондриално ниво, витамин В12 действа като коензим, необходим за превръщането на метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА. Дефицитът на витамина инхибира процеса и води до по-усилена липогенезата. Получените от мастната тъкан циркулиращи микроРНК се променят и от своя страна медираат адипогенен и инсулинорезистентен фенотип, който довежда до прекомерно натрупване на липиди и развитие на затлъстяване [3]. Във връзка с посочените механизми в литературата се оформя

предположението, че индивиди с витамин В12 дефицит имат по-голяма склонност към затлъстяване, в сравнение с индивиди с нормален витаминен статус. Няколко наблюдателни и епидемиологични проучвания проведени сред възрастни пациенти доказват, че ниските серумни нива на витамин В12 са свързани с висок ВМІ [3], а серия от проучвания в периода на бременността, откриват наличието на интригуваща връзка между дефицита на кобаламин при бременните жени и развитието на затлъстяване [164, 291, 292]. В неотдашното проучване на Knight и съавт. (2015), изследователите установяват, че ниските серумни концентрации на параметъра тотален витамин В12 (<150pmol/l), измерени в 28 г.с. са тясно свързани с високия ВМІ на бременните жени ( $r = -0.25$ ;  $p < 0.001$ ), а нормалните нива на параметъра, съответно с нормален ВМІ. Авторите допускат, че за всяко увеличение на ВМІ с 1% ще се очаква 0.6% намаление на циркулиращия тотален витамин В12 и обсъждат две възможни тълкувания на получените резултати – витамин В12 дефицитът способства за развитието на затлъстяване или затлъстяването причинява намаляване на серумните концентрации на тотален витамин В12 [164]. За разлика от откритите в проучената литература зависимости между ВМІ и състоянието на витамин В12 статуса, в нашето проучване бременните жени с висок и нормален ВМІ, имат сходни средни нива за показателите тотален витамин В12 ( $167.74 \pm 82.86 \text{ pmol/l}$  vs  $202.19 \pm 101.86 \text{ pmol/l}$ ), активен витамин В12 ( $69.88 \pm 41.86 \text{ pmol/l}$  vs  $81.36 \pm 73.46 \text{ pmol/l}$ ) и ММА ( $266.83 \pm 162.76 \text{ nmol/l}$  vs  $201.79 \pm 115.11 \text{ nmol/l}$ ). Най-вероятно броя на включените в проучването участници, както и неравномерното им разпределение в двете подгрупи имат отношение към невъзможността за доказване на статистически значима достоверност на резултатите. Лабораторните параметри, отразяващи витамин В12 статуса на двете групи бременни жени бяха съпоставени по метода на Spearman, но статистически значима корелация не се установи ( $p > 0.05$ ).

Освен в общата група на бременните жени, връзка между ВМІ и витамин В12 статуса на участниците, беше потърсена и в трите основни изследвани групи – здрави контроли, жени с GDM и с прееклампсия. Единствено за групата на участниците, развили гестационен захарен диабет беше установено, че бременните жени с наднормено тегло и затлъстяване имат по-лош витамин В12 статус в сравнение с бременните жени с нормален ВМІ. Получените стойности са както следва: за тотален витамин В12 –  $144.33 \pm 54.65 \text{ pmol/l}$  vs  $153.65 \pm 47.33 \text{ pmol/l}$ , за активен витамин В12 –  $55.10 \pm 25.63 \text{ pmol/l}$  vs  $62.08 \pm 30.08 \text{ pmol/l}$  и за ММА –  $317.16 \pm 192.89 \text{ nmol/l}$  vs  $307.64 \pm 159.29 \text{ nmol/l}$ . Независимо от откритите разлики в средните измерени

концентрации на лабораторните параметри, отразяващи витамин В12 статуса, статистическа достоверност между получените резултатите при участниците от двете подгрупи, не беше установена ( $p > 0.05$ ). Въпреки това, с оглед на проучената литература, би било добре витамин В12 статуса при жени, планиращи бременност, особено с наднормено тегло и затлъстяване, да се оценява.

#### **3.4. Оценка зависимостта на витамин В12 статуса от приема на хранителни добавки, съдържащи витамина, за цялата кохорта, както и в трите изследвани групи.**

Витамин В12 е от решаващо значение за нормалното делене и диференциация на клетките и е необходим за развитието и миелинизацията на централната нервна система. Общите нужди на плода за периода на бременността се оценяват на 50  $\mu\text{g}$ , а запасите в майчиния организъм при жени със смесена диета са повече от 1000  $\mu\text{g}$  [252]. Пълноценно и здравословно хранените бременни жени, имат достатъчни телесни запаси от кобаламин, за да отговорят адекватно и оптимално на повишените нужди в периода на бременността. Изложени на висок риск от дефицит на витамина са бременните и кърмещите жени, следващи вегетарианска или веганска диета, както и тези от развиващите се региони на света с лош достъп до храни от животински произход [252]. Въпреки съобщенията, че концентрациите на витамин В12 при бременната жена и плода корелират има автори в проучената литература, които предполагат, че приемът на кобаламин в периода на бременността е по-важен и определящ фактор за статуса на витамина в развиващия се детски организъм [92]. Съгласно действащите препоръки в Република България, дневният прием на витамин В12 за периода на бременността и кърменето е по-висок от този за небременни жени и е съответно 4.5  $\mu\text{g}/\text{ден}$  и 5.0  $\mu\text{g}/\text{ден}$  [344].

Различни проучвания изследват ефекта от ежедневната перорална добавка на витамин В12 върху серумните нива на витамина, включително и в периода на бременността. В рандомизираното, плацебо-контролирано клинично изпитване на Duggan и съавт. (2014), изследователите установяват, че, бременните жени, приемащи добавки с кобаламин в сравнение с тези от тях, които са на плацебо, имат значително по-високи серумни нива на тотален витамин В12 както през II-ри (216  $\text{pmol}/\text{l}$  vs 111  $\text{pmol}/\text{l}$  съответно,  $p < 0,001$ ), така и през III-ти триместър на бременността (184  $\text{pmol}/\text{l}$  vs 105  $\text{pmol}/\text{l}$  съответно,  $p < 0.001$ ) [92]. В проучването на Knight и съавт. (2015), по

аналогичен начин, измерените концентрации на тотален витамин В12 са по-високи при бременните жени, приемали витаминни добавки в периода на бременността в сравнение с несуплементираните (224 pmol/l vs 195 pmol/l съответно,  $p < 0.001$ ) [164]. В нашето проучване приблизително една трета от участниците не съобщават за витамин В12 суплементация (34.75%,  $n=90$ ). Останалите бременни жени потвърждават суплементация с витамина, като доза  $\geq 4.5$ ug/ден приемат 46.33% ( $n=120$ ) от участниците. Както в цитираната литература, така и в нашето изследване, средната измерена стойност за параметъра тотален витамин В12 в групата на участниците със суплементация е по-висока в сравнение с измерената за групата на участниците, неприямащи хранителни добавки (тотален витамин В12 189.48pmol/l vs 155.25pmol/l). Аналогични резултати са получени и за параметъра активен витамин В12 (активен витамин В12 76.26pmol/l vs 67.34pmol/l), а за функционалния лабораторен показател ММА, съгласно очакванията, в групата на суплементираните участници са получени по-ниски средно измерени стойности (ММА 191.57nmol/l vs 290.29nmol/l). В проучването на Bhowmik и съавт. (2021), витамин В12 дефицит (тотален витамин В12  $< 148$ pmol/l) от 15% в контролната група, намалява до 5% в интервенционалната група, приемаща добавки с кобаламин [35]. Суплементацията с витамин В12 в периода на бременността се отразява благоприятно на витаминния статус на бъдещата майка и най-вероятно по аналогичен начин и на феталните нива на витамина. Последните, както вече беше споменато, са от изключителна важност за неврологичното развитие и когнитивната функция на бъдещото поколение [67], затова стремежът е да се поддържат в оптимални концентрации.

Освен за общата група на бременните жени, честотата на суплементиране с витамин В12 беше проучена и в трите основни изследвани групи. При здравите контроли 29.34% от участниците ( $n=49$ ) не съобщават да са приемали витамин В12 във вид на добавки, а във втората група на жените с GDM, процентът е малко по-нисък – 27.90% ( $n=12$ ). Най-висок процент несуплементирани бременни жени се откри в групата на участниците с прееклампсия – 59.18% ( $n=29$ ). Между трите основни групи участници в проучването се очертаха процентни разлики в употребата на витамина, които са статистически значими ( $\chi^2 = 16.80$ ,  $p=0.002$ ). По аналогичен начин, както за общата група, така и за трите основни изследвани групи, средните измерени стойности на параметрите тотален и активен витамин В12 са съответно по-ниски при несуплементираните, в сравнение със суплементираните бременни жени. За параметъра ММА връзка между приема на

витамин В12 от хранителни добавки и измерените стойности при участниците се установи единствено за групата на бременните жени с прееклампсия.

При изследване на честотното разпределение на жените както според приема на витамин В12, така и според ВМІ, установихме, че повече от половината (59.46%) от бременните жени с наднормено тегло и затлъстяване имат недостатъчен прием на витамин В12.

### **3.5. Оценка влиянието на витамин В12 статуса относно неблагоприятния изход от бременността по отношение на новороденото и възникването на преждевременно раждане и раждане на дете с ниско тегло при здрави бременни и жени с усложнения на бременността.**

В литературата се откриват редица доказателства, подкрепящи твърдението, че витамин В12 статуса на бременните жени, повлиява растежа и развитието на новородените. Съществуват предположения, че дефицитът на витамина оказва влияние върху продължителността на бременността и се свързва с възникването на преждевременно раждане [259], но проведените изследвания са с разнопосочни резултати. Оптималният витамин В12 статус на жената преди зачеването се свързва с по-нисък риск от поява на преждевременно раждане в едно китайско проучване [263], но други изследователи не потвърждават тази зависимост [259]. Мета-анализ на Rogne и съавт. (2017), обхващащ 18 клинични проучвания, разглеждащи връзката между витамин В12 статуса на бременните жени и продължителността на бременността, също посочва разнопосочни резултати. Така например в едно от тях измерените по-високи концентрации на тотален витамин В12 при бъдещите майки се свързват с нормална продължителност на бременността и намален риск от възникване на РТВ. Недостатък на проучването е, че размерът на извадката е малък. В друго проучване авторите не установяват достоверна доказателствена връзка между измерените серумни концентрации на тотален витамин В12 и продължителността на бременността [259]. В нашето проучване също беше потърсена зависимост между нивата на параметрите отразяващи витамин В12 статуса на бременните жени и вероятността за възникване на РТВ. Установихме разлики в измерените средни стойности на изследваните параметри, като по-добър витамин В12 статус се откри при жените с нормална продължителност на бременността – по-високи средни серумни концентрации на параметъра тотален витамин В12 ( $179.31 \pm 93.92 \text{ pmol/l}$  vs  $163.96 \pm 58.39 \text{ pmol/l}$ ,  $p=0.37$ ), аналогични резултати за параметъра активен витамин В12 ( $74.06 \pm 55.16 \text{ pmol/l}$  vs  $64.72 \pm 35.94 \text{ pmol/l}$ ,  $p=0.35$ ) и

по-ниски средни стойности за метаболитния параметър ММА ( $247.45 \pm 157.07 \text{ nmol/l}$  vs  $261.99 \pm 141.05 \text{ nmol/l}$ ,  $p=0.65$ ). Въпреки откритите разлики в измерени нива на параметрите, статистическа достоверност между групите не се установи ( $p>0.05$ ). Най-вероятната причина за липсата на достоверни разлики се крие в сравнително малкия брой участници, включени в проучването и развили усложнението.

Освен с преждевременно раждане, дефицитът на витамин В12 при бременните жени се свързва и с ниското тегло на новородените при раждане [259]. Данните от изследванията отново са противоречиви. В наскоро проведен мета-анализ линейна зависимост между серумните концентрации на тотален витамин В12 в периода на бременността и теглото на новородените при раждане не се установява, но се потвърждава връзката на дефицита на витамина (тотален витамин В12  $<148 \text{ pmol/L}$ ) с високия риск от раждане на новородено с LBW [259]. В друго проучване изследователите установяват, че деца с тегло при раждане  $<2500 \text{ g}$  и  $2500\text{-}2999 \text{ g}$  имат по-ниски стойности на тотален витамин В12, измерен от пъпната връв, непосредствено след раждането, в сравнение със стойностите, измерени при контролната група новородени, с тегло при раждане  $>3000 \text{ g}$  ( $194.83$  и  $197.78 \text{ pmol/l}$  vs  $236.16 \text{ pmol/l}$  съответно,  $p=0.02$ ) [31]. В същото проучване авторите установяват и съществуваща корелация между серумните концентрации на витамин В12 при бременните жени през втори и трети триместър на бременността и стойностите на витамина, получени от пъпната връв на новороденото при раждане. Във връзка с проучената литература потърсихме зависимости между нивата на показателите тотален витамин В12, активен витамин В12 и ММА, измерени в хода на бременността при бременните жени в нашето проучване и раждането на новородено с LBW. Посредством t-тест за независими извадки, сравнихме средните измерени стойности на показателите, отразяващи витамин В12 статуса на бременните жени, но получените резултати не показаха статистическа значимост между двете сравнявани групи (LBW/нормално тегло на новороденото). Въпреки това установихме, че средните измерени стойности на серумните концентрации на показателите тотален витамин В12 и активен витамин В12 при жените, родили деца с тегло под  $2500 \text{ g}$ , са по-ниски в сравнение с получените при жените, родили новородени с нормално тегло (общ витамин В12  $162.74 \pm 58.58 \text{ pmol/l}$  vs  $179.71 \pm 94.24 \text{ pmol/l}$ ,  $t=1.033$ ,  $p=0.303$ ; активен витамин В12  $59.01 \pm 32.41 \text{ pmol/l}$  vs  $75.09 \pm 55.49 \text{ pmol/l}$ ,  $t=1.668$ ,  $p=0.091$ ). За метаболитния параметър ММА, в потвърждение на получените по-горе резултати, бяха открити малко по-високи средни стойности при жените, родили деца с



ниско тегло, в сравнение с тези, родили новородени с нормално тегло ( $276.2 \pm 158.47$  nmol/l vs  $244.69 \pm 154.40$  nmol/l;  $t=1.050$ ,  $p=0.295$ ).

Доколко ниското тегло при новородените има връзка с принадлежността на бременните жени към определена рискова група, проверихме и чрез корелация по метода на Spearman. Силна и положителна зависимост между вероятността за раждане на новородени с LBW при увеличаващ се дефицит на витамин В12 открихме за групата на бременните жени, развили преекламписия ( $\rho=0.499$ ,  $p=0.009$ ). Получените данни съответстват на описаните в литературата. В проведеното голямо проспективно кохортно проучване на Liu (2021) и съавт. се установява, че по-висок процент на LBW се открива сред бременните жени, развили хипертензивни усложнения и преекламписия, в сравнение със здравите контроли [183]. Преекламписията като спешно състояние в акушерството често изисква индукция на раждането с цел опазване живота на родилката и новороденото, а това от своя страна е свързано с по-голям риск за раждане на дете с ниско тегло.

Според Duggan и съавт (2014) е възможно суплементирането с витамин В12 с последващо намаляване на серумните концентрации на хомоцистеин да доведе до достигане на оптимално тегло на новородените при раждане и нормална продължителност на бременността [92]. В две рандомизирани контролирани проучвания обаче, свързани с добавяне на кобаламин по време на бременност, авторите съобщават за по-високи серумни нива на тотален витамин В12 в групата на жените, приемащи хранителни добавки, но не отчитат намаляване на измерените нива на хомоцистеин в хода на изследването. Изследователите не откриват и разлики в теглото на новородените при раждане, продължителността на бременността или честотата на ражданията с ниско телесно тегло и преждевременни раждания в групата на бременните жени, приемащи витамин В12 добавки в сравнение с контролната група и в двете клинични проучвания [92, 277].

Известно е, че добавянето на витамин В12 в периода на бременността оказва благоприятен ефект върху невро-когнитивното развитие на потомството и води до намаляване на риска от възникване на дефекти на невралната тръба. С помощта на допълнителни проучвания с голям брой включени бременни жени е вероятно да се докаже и ефекта на витамина върху продължителността на бременността и теглото на новородените при раждане. Суплементирането с кобаламин в периода на бременността и кърменето би допринесло до увеличаване на ползите за обществото.

## VI. ИЗВОДИ

*Бременност и рискови фактори за възникване на неблагоприятни усложнения:*

1. Възрастта на бременните жени, BMI, изчислен към момента на забременяване, и гестационно наддаване на тегло са важни рискови фактори за възникване на неблагоприятни усложнения на бременността като GDM и прееклампися.
2. Сезонът може да се разглежда като потенциален рисков фактор за възникване на неблагоприятни усложнения на бременността, основно за състоянието прееклампися.

*Витамин D статус и бременни жени:*

1. Витамин D статусът на бременните жени от гр. Варна и региона е доста по-добър от витамин D статуса, определен за други области на нашата страна, и е сравним с витамин D статуса на жените с по-добър социален статус от развитите държави по света.
2. Установена е сезонна зависимост на серумните нива на 25(OH)D в изследваната кохорта с оптимални нива през лятно полугодие и със субоптимални нива през зимното полугодие.
3. Установи се, че увеличеният BMI е неблагоприятен фактор относно витамин D статуса на изследваните бременни жени.
4. Не се установи различие както в средните стойности на серумните нива на 25(OH)D за трите основни групи изследвани бременни жени, така и по честотното им разпределение според витамин D статуса.
5. Над две трети от изследваните жени се суплементират с витамин D препарати като почти 22% приемат дози в пъти надвишаващи препоръчителните от здравните регулатори 600 IU/дневно, което значимо подобрява витамин D статуса им.
6. Според нагласата си за суплементиране с витамин D препарати бременните жени от гр. Варна и региона показват по-осъзнато отношение в сравнение с бременни жени от други региони на страната и се доближават до жените от развитите държави по света с по-добър социален статус.
7. Жените с прееклампися и с наднормено тегло са с по-ниска нагласа за суплементиране с витамин D препарати, което предопределя и значимо по-лошият им витамин D статус.

8. Най-висока честота и риск от преждевременно раждане се установи при жените с прееклампсия, корелативно обвързан както със серумните нива на 25(OH)D, така и с приема на витамин D препарати.
9. Най-висока честота и риск от раждане на дете с ниско тегло се установи при жените с прееклампсия, като приемът на витамин D е значим фактор за раждане на дете с ниско тегло.

*Витамин В12 статус и бременни жени:*

1. Честотата на витамин В12 дефицит и недостатъчност, установена при изследваната кохорта, е сравнима с тези, наблюдавани в развитите страни в света.
2. Установи се, че зимният сезон е по-благоприятният по отношение на витамин В12 статуса и параметрите, които го определят.
3. ВМІ не предопределя статистически значими различия в параметрите, определящи витамин В12 статуса.
4. Две трети от жените в изследваната кохорта приемат витамин В12 суплементи, като при около половината от тях приеманата доза е над препоръчителния дневен прием.
5. При жените с прееклампсия не се установява значимо различие между серумните концентрации за активен витамин В12 с тези при здравите контроли, докато за ММА съществува тенденция за статистическо различие.
6. Риск от възникване на гестационен захарен диабет в зависимост от витамин В12 статуса не се установи.
7. Средните измерени стойности на параметрите, отразяващи витамин В12 статуса, не се отличават при бременните жени, родили преждевременно, в сравнение с жените с нормална продължителност на бременността.
8. Средните измерени стойности на параметрите, отразяващи витамин В12 статуса, не се отличават при бременните жени, родили дете с ниско тегло, в сравнение с жените с нормална продължителност на бременността, но се установи статистически значимо увеличаващ се риск за раждане на дете с ниско тегло с влошаване на В12 статуса при жените с прееклампсия.

## **VII. ПРИНОСИ**

### **Приноси с оригинален характер**

1. За първи път в България е проведено проучване за изследване витамин D статуса на бременни жени – здрави и с патологични усложнения на бременността, чрез изследване на серумните концентрации на 25(OH)D посредством високоефективна течна хроматография с маспектрометрична детекция (LC-MS).
2. За първи път у нас се проучват евентуалните взаимовръзки между витамин D дефицит и/или недостатъчност и развитие на неблагоприятни усложнения при бременните жени като прееклампсия и гестационен захарен диабет, както и развитието на неблагоприятни усложнения при новороденото като РТВ и LBW.
3. За първи път у нас се определя витамин B12 статус на определена таргетна група чрез три взаимосвързани лабораторни параметъра – тотален витамин B12, активен B12 и метилмалонова киселина, последната определена посредством високоефективна течна хроматография с маспектрометрична детекция (LC-MS).
4. За първи път в България е проведено проучване за изследване витамин B12 статуса на бременни жени – здрави и с патологични усложнения на бременността.
5. За първи път у нас се проучват евентуалните взаимовръзки между витамин B12 дефицит и/или недостатъчност и развитието на неблагоприятни усложнения при бременните жени като прееклампсия и гестационен захарен диабет, както и развитието на неблагоприятни усложнения при новороденото като РТВ и LBW.

### **Приноси с практико-приложен характер**

1. Получиха се данни за витамин D статуса на бременните жени в Североизточна България, които до този момент липсваха.
2. Получиха се данни за витамин B12 статуса на бременните жени в Североизточна България, които до този момент липсваха.
3. Потвърдена е сезонната зависимост на серумните концентрации на 25(OH)D, което трябва задължително да се има предвид при анализ на резултатите.
4. Резултатите от проучването ще позволят задълбочаване на познанията за ролята на витамин D и витамин B12 за нормалното протичане на бременността, развитието на плода и раждането на новороденото.

5. Резултатите от проучването могат да бъдат основание за промяна стандарта за наблюдение по време на бременност, като към задължителния панел лабораторни изследвания се добавят и тестове за определяне нивата на витамин D и витамин B12.
6. Резултатите от проучването могат да бъдат основание за суплементация с хранителни добавки, съдържащи витамин D и витамин B12, възможно най-рано след потвърждение на бременността, с цел избягване вероятността за развитие на неблагоприятни усложнения при бременните жени и техните новородени.

## **VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ**

1. **Todorova M.**, Gerova D., Galunska B. “Vitamin D Deficiency During Pregnancy”, Scripta Scientifica Medica, 2021
2. **М. Тодорова**, Д. Герова, Б. Галунска, „Ефекти на витамин В12 дефицит или недостатъчност върху бременността“, сп. Медицинфо, Август 2022
3. **М. Тодорова**, Ст. Фъртунов, „Гестационен захарен диабет и витамини“, сп. Варненски медицински форум т.12, 2023, online first

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

1. Ст. Фъртунов, Я. Стефанов, П. Косев, **М. Тодорова**, Ж. Русева, С. Христова, В. Александрова, Р. Алексовска, В. Маджова. „Хипертония при бременност в общата медицинска практика“, XI-та Научна среща – Обучение на СОИБОМ, 27 – 29.09.2019г., х-л Метрополитан, София
2. **М. Тодорова**, Д. Герова, Ст. Фъртунов, „Статус на витамин В12 при бременни жени“, XII Национална Конференция по Клинична Лаборатория 4 – 6 Октомври 2019, Ахелой, България
3. **Todorova M**, Gerova D. „Vitamin D levels in adult outpatients for a period of 8 months“, XXVIII Balkan Clinical Laboratory Federation Meeting and XIII National Conference of Clinical Laboratory, National Palace of Culture, Sofia, Bulgaria, 08 – 11 September 2021
4. **Todorova M**, Gerova D, Galunska B. “Vitamin D status during pregnancy and the role of some modifiable factors”, 6th International Vitamin Conference, Copenhagen, 22 – 24 September 2021
5. **Todorova M**, Gerova D, Fartunov S. “Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus”, IXth International Conference of Young Scientists, 14 – 15 July 2022, Plovdiv, Bulgaria
6. **М. Тодорова**, Д. Герова. „Витамин В12 статус при бременни жени и връзката му със затлъстяване и развитие на гестационен захарен диабет“, XVI Национална Конференция по Клинична Лаборатория, 14 – 16 Октомври 2022, Пловдив, България

## **ФИНАНСИРАНЕ**

Извършените дейности по настоящото проучване са подкрепени от Фонд „Наука“, МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, финансирал научен проект № 20005 „Метилмалонова киселина и 25-хидрокси витамин D3 като нови биомаркери за определяне на функционални дефицити на витамин В12 и витамин D3 в хода на бременността“.

## IX. БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на всички, които допринесоха за реализирането на този дисертационен труд:

- Благодаря на научния си ръководител доц. д-р Даниела Герова, д.м., за доверието да бъда неин докторант и предоставената възможност да се уча, за търпението, отделеното време и за оказаната подкрепа при научното ръководство.
- Благодаря на ръководителя на Катедра Клинична лаборатория, проф. д-р Яна Бочева, д.м., за подкрепата и доверието в мен.
- Благодаря на проф. Бистра Галунска за високия професионализъм и неоченимата помощ при хроматографското определяне на серумните нива на 25(OH)D и MMA.
- Благодаря на доц. Силвия Николова за помощта при статистическата обработка на резултатите.
- Благодаря на проф. Валентина Маджова и д-р Калин Цонев за разбирането, съдействието и подкрепата.
- Благодаря на специалистите АГ и неонатолози от СБАГАЛ „Проф. д-р Д. Стаматов“ Варна, МБАЛ „Св. Анна“ Варна, ДКЦ „Св. Марина“ Варна и АСС МЦ Варна за оказаното съдействие.
- Благодаря на д-р Снежан Снегаров от МДЛ „Лабorexпрес“ – Варна за оказаното съдействие при изработването на пробите за активен витамин В12.
- Благодаря на лаборантите от ДКЦ “Св. Марина“ Варна и АСС МЦ Варна за оказаното съдействие.
- Благодаря на колегите от Катедра Клинична лаборатория при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна за коректните взаимоотношения и подкрепата.
- Благодаря на бременните жени, които се включиха в проучването.
- И не на последно място, благодаря на моите приятели и на моето семейство, на съпруга ми и на двете ми деца за подкрепата, съпричастността и вярата, че ще успея, за това че ги има, че са до мен и че ме обичат!