

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ**

Д-р Десимира Сотирова Миронова

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ РОЛЯТА НА
ХОРМОНАЛНИТЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ДИСФУНКЦИЯ НА
ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР”
СПЕЦИАЛНОСТ: ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ – 03.01.24

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:
Проф. д-р Надка Бояджиева, д.м.н.
Доц. д-р Теодора Ханджиева-Дърленска, д.м.

София
2022

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| 1. ОБЗОР..... | 5 |
| 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ..... | 34 |
| 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ | 35 |
| А. Експериментални изследвания..... | 35 |
| 3.1 Експериментални животни..... | 36 |
| 3.2. Експериментални модели..... | 37 |
| 3.2.2. Модел на експериментално индуциран хипотиреозидизъм с пропилтиурацил (Propicil 50 mg, ALMEDA LTD)..... | 38 |
| 3.2.3. Модел на експериментално индуциран модел на хипертиреозидизъм с L-тироксин (L-tyroxin 100 µg, Berlin-Chemie)..... | 39 |
| 3.3. Експериментални подходи и режими на хранене и третиране с фармакологични средства..... | 40 |
| 3.4. Биохимични методи..... | 41 |
| 3.4.1. Определяне на глюкозата в кръвта на плъховете..... | 41 |
| 3.5. ELISA (enzyme immunosorbent assay) метод..... | 42 |
| 3.5.1. ELISA метод за определяне на плъши инсулин..... | 42 |
| 3.5.2. ELISA методи за определяне на TSH, FT3 и FT4..... | 42 |
| 3.5.3. ELISA метод за изследване на грелин, лептин и адипонектин..... | 44 |
| 3.6. Определяне на лептин/адипонектин съотношение..... | 46 |
| Б. Клинични изследвания..... | 49 |
| В. Статистически методи..... | |
| 4. РЕЗУЛТАТИ..... | 51 |
| 5. | |
| ДИСКУСИЯ..... | 77 |
| 6. Публикации, свързани с дисертационния труд..... | 84 |
| 7. Участие в научно-изследователски проекти..... | 85 |
| 8. Участия в конгреси, свързани с дисертационния труд..... | 85 |
| 9. Курсове, свързани с дисертационния труд..... | 85 |
| 10. ЛИТЕРАТУРА | |

Използвани съкращения

На кирилица

АДА – американска диабетна асоциация

А/Л индекс- адипонекин/лептин индекс

ЗД тип II- захарен диабет тип II

ИТМ- индекс на телесната маса

НГГ – нарушена гликемия на гладно

НГТ - нарушен глюкозен толеранс

ОГТТ – орален глюкозо толерантен тест

СЗО - Световната Здравна Организация

Т3 - трийодтиронин

Т4 - тироксин

На латиница

BMI - body mass index

ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay

GLP1 agonist- glucagon-like peptide 1

НОМА – homeostatic model assessment

RBP-4 – ретинол свързващ протеин 4

SGLT2 inhibitors- sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors

TBG - thyroxin-binding globulin

TNF- α – туморо-некрозен фактор-алфа

TRAK - TSH-рецепторни антитела

TSH - Thyroid-stimulating hormone

ОБЗОР

ВЪВЕДЕНИЕ

А. ОСНОВНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА И НЕЙНАТА ПАТОЛОГИЯ

Щитовидната жлеза е ключов орган в регулацията на метаболитните процеси при животните и човека. Представлява най-големият изцяло ендокринен орган в човешкия организъм, със средно тегло от 20-25 г, разположена в предната част на шията, в близост до трахея, хранопровод, гълтач, както и вътрешната сънна артерия и вена югуларис. Индивидуалните размери и теглото на жлезата варират като зависят от възрастта (5, 6). Тя нараства бързо до 20 година, след което настъпва период на бавно увеличение. От 40-годишна възраст теглото на жлезата бавно се редуцира. При жените теглото на тиреоидеята е по-високо, сравнено с мъжете. Промени се наблюдават и през периода на бременост, както и при менструация (7). Изградена е от два лоба - ляв и десен, свързани помежду си с тесен провлак, наречен истмус, като тази структура наподобява формата на пеперуда или щит. Той защитава ларинкса и трахеята, откъдето идва и самото име на жлезата, дадено ѝ от Wharton през 1656 година. Основната структурна и функционална единица на жлезата е фоликулът., който има специфична структура съставени от клетки, обграждащо общо пространство, изпълнено с течност, наречена колоид, съставен от гликопротеин-тиреоглобулин. Именно фоликуларните клетки са свързани със синтеза на двата основни хормона на жлезата- трийодтиронин (Т3) и тетрайодтиронин (тироксин, Т4) (7).

Хормоните на жлезата имат ефект върху почти всички клетки в организма, свързайки се с нуклеарни рецептори и по този начин стартират каскада от реакции, водещи до експресия на различни генни продукти (9). За нормалното развитие в пренаталния период- както за мозъка, така и за соматичните клетки на фетуса, е необходимо майката да има здрава и правилно функционираща тиреоидея. При

възрастния организъм, ролята на жлезата е свързана с метаболизма на протеини, мазнини и въглехидрати, което ѝ определя ключова роля при изясняване заболявания, свързани с дисрегулация на описаните процеси (9).

Физиологична роля на периферните хормони **трийодтиронин (Т3) и тироксин (Т4)** се свързва също с редица процеси – растеж, развитие; повлияване на кислородната консумация и телесната температура, като по този начин, участват в усилването на базалния метаболизъм; повлияват глюконеогенезата в черния дроб; стимулират калциевата и фосфатната обмяна; на ниво мастна обмяна– засилват липолизата (стойностите на серумния холестерол са понижени при тиреотоксикоза и повишени – при хипотиреозидизъм) (10).

За правилната синтеза на щитовидните хормони е необходимо достатъчно йод, участващ в структурата на хормоните. Изчислено е, че необходимото количество приет с храната йод трябва да е средно по 200 мг дневно, за да се осигурни синтезата на тироксин (9). Йодидите, приети с храната се абсорбират от гастроинтестиналния тракт, след което попадат в кръвообръщението и подложени на трансформация се натрупват в клетките на щитовидната жлеза- тиреоцити, където се окисляват до елементарен йод. Следващия етап в синтезата на щитовидните хормони се определя като купелуване (сдвояване) на тирозина до йодтиронини (трийодтиронин и тетрайодтиронин), които се излъчват в кръвното русло (9).

Правилното функциониране на щитовидната жлеза и адекватната ѝ секреция се контролират **на ниво хипоталамус- хипофиза**. В хипофизата се секретира тиреостимулиращ хормон (Thyroid-stimulating hormone, TSH). Той стимулира щитовидната жлеза в производството на Т3 и Т4 и представлява гликопротеин, който се произвежда от тиреотропните клетки в предния дял на хипофизата. Секретирането на TSH също подлежи на контрол, което се реализира на ниво хипоталамус, където се произвежда тиреотропин-освобождаващ хормон (TRH), който стимулира хипофизата да произвежда TSH. В хипоталамуса се образува и хормон с противоположно действие- соматостатин, който има отрицателен ефект върху производството на TSH от хипофизата — намалява или инхибира освобождаването му (10). Действието на TSH върху секрецията на щитовидната жлеза, също се реализира чрез рецепторен

механизъм. Нивата на TSH и T3 и T4, са подчиняват на правилата за обратна връзка (11).

Основната част от щитовидните хормони, произведени от фоликуларните клетки попадат в циркулацията, но част от тях се складира в тиреоидеята (12).

Към метаболитното действие на щитовидните хормони се включват ефекти върху различни обменни процеси (Таблица 1).

Диагностиката на заболяванията на щитовидната жлеза също търпят прогрес и прецизност в методите. Най-чувствителният лабораторен параметър за функцията на жлезата е концентрацията на TSH. При нормални стойности- 0,3-3,5 mU/L, се говори за еутиреоидна функция на жлезата (12). Когато TSH е под долна граница, а периферните хормони са повишени говорим за изява на тиреотоксикоза. При обратната констелация говорим за хипотиреоидизъм.

Патологията на щитовидната жлеза е една от водещите ендокринопатии (4). Първите данни за структурата, функцията и разстройствата във функцията на щитовидната жлеза, датират от дълбока древност. Едни от най-ранните папируси посочват, че именно Гален (II в.н.е.) е бил сред първите, които споменават жлезата, а Везалий (XVI в.) я описва сравнително напълно. Първото твърдение, че е жлеза с вътрешна секреция принадлежи на King (1836 г.). Опитите за експериментално изясняване на функцията на жлезата чрез тиреоидектомия проведени от Schiff през 1855 г., а след това и от Hoffmaister през 1894 г., първоначално довеждат до погрешно заключение, поради едновременното отстраняване и на паращитовидните жлези, които дотогава на са били известни (4).

Най-точните данни за функцията на жлезата идват от клиничните наблюдения, описани от лекарската практика. В средата на XIX в. Curling (1850), а по-късно и Fagge (1871), Guli (1874) и Ord (1878) описват под названието "спорадичен кретенизъм" клиничната картина на микседема. По същото време швейцарските хирурзи Th. Kocher и J. L. и A. Reverdin, наблюдавайки след струмектомия т. нар. cachexia strumipriva, отбелязват пълното съвпадение на признаците на това заболяване с тези на микседема (1883) (5). С тези наблюдения, които са подкрепени и с експерименталните данни на

Schiff (1884) са положени основите на съвременното познание за функцията на щитовидната жлеза. Познанието за тиреоидеята се доразвива и от данните получени от Vassale (1890) и Murray (1891), които показват мощният терапевтичен ефект на препарати, изолирани от тиреоидеята (4).

Следващите десетилетия отбелязват забележителен прогрес в изясняването на тиреоидната физиология и патофизиология. През 1894 г. Vaumann доказва високата концентрация на йод в щитовидната жлеза, свързан с органично съединение, което представлява активната й субстанция (4) През 1899 г. Oswald установява, че това е йодсъдържащ глобулин и го нарича "йодтиреоиглобулин". Почти едновременно през 1900 г. Gley и Bourcet наличието на органични йодни съединения в кръвната плазма, свързани с плазмените протеини. Пълното изясняване на естеството на тиреоидните хормони се свързва с името на Kendall , който през 1915 г. изолира в кристална форма тироксина от щитовидната жлеза, а Harington изяснява химическата му структура и успява да го изолира през 1926 г. Откриването на втория хормон (трийодтиронин), става значително по-късно от Leblond, Gross и Pitt-Rivers (1951-1952 г.) и с това се дадоха допълнителни познания, относно структурата и регулацията на тиреоидната хормоносинтеза, биологичното действие и метаболизма на щитовидните хормони в норма и патология.

Фармакологичното повлияване на отделните компоненти на описаните метаболитни нарушения, е сред стратегиите за разработване на нови перспективни медикаменти, целящи овладяване на посочените патофизиологични изменения. Сравняването на ефектите на лекарства от групата на бигванидите (метформин) и инхибиторите на натриево-глюкозния ко-транспортен 2- SGLT2 инхибитори (емпаглифлозин), може да се използва при оценката на риска от големи нежелани сърдечно-съдови събития (Major Adverse Cardiac Events, MACE) (3,1) чрез проследяване на динамиката на отделните сърдечно-съдови биомаркери. Оценката на съотношението между адипонектин и лептин, е потенциален нов биомаркер, за оценка на посочените компоненти.

Дисфункцията на жлезата може да се разглежда като **хиперфункция** (хипертиреозидизъм) или **хипофункция** (хипотиреозидизъм), което определя излишъка или недостига на периферните хормони (Таблица 1).

| | ХИПЕРТИРЕОИДИЗЪМ | ХИПОТИРЕОИДИЗЪМ |
|---|--|---|
| ОТ СТРАНА НА СЪРДЕЧНО-СЪДОВАТА СИСТЕМА | тахикардия, често съпроводена с ритмично-проводни нарушения | брадикардия, с нарушен ритъм |
| НЕРВНА СИСТЕМА | психо-моторни нарушения | усещане за напрежение и нарушения в съня; често депресивни епизоди |
| ОСНОВНА ОБМЯНА | редукция на телесно тегло | покачване на телесно тегло |
| ЕФЕКТ ВЪРХУ ВЪГЛЕХИДРАТНАТА ОБМЯНА | хипергликемии (без съществено увеличаване на инсулиновата резистентност) | хипогликемии (на она на силно изразена инсулинова резистентност) |
| ЕФЕКТИ ВЪРХУ ЛИПИДНАТА ОБМЯНА | понижаване концентрацията на общия холестерол и LDL-холестерола | повишени стойности на общия холестерол, LDL-холестерол и триглицеридите |
| НАРУШЕНИЯ В МЕНСТРУАЛНИЯ ЦИКЪЛ | нарушения в менструалния цикъл (олигаменорея) | промени в менструалния цикъл - обилни и болезнен |

Таблица 1. Основни клинични характеристики на хипо- и хиперфункцията на щитовидната жлеза, <https://www.researchgate.net/>

Тиреотоксикозата е клиничен синдром, определящ редица нарушения, обусловени от повишеното ниво на щитовидни хормони в циркулацията и ефектите им върху метаболизма и функциите на организма. Това може да доведе до редица усложнения в отделните органи и тъкани. Тиреотоксикозата най-често е резултат от тиреозидни заболявания с трайно повишена функция на жлезата- хипертиреозидизъм (13). Едно от основните заболявания на щитовидната жлеза протичащо с хиперфункция на жлезата е болестта на Базедов- Грейвс (14). Заболяването се характеризира с аутоимунно обусловен хипертиреозидизъм, с хронично или рецидивиращо потичане и с дифузна

хиперплазия на щитовидната жлеза (14). Засяга всички възрасти, но честотата ѝ е най-висока между 40 и 50 години. От етиологична гледна точка редица екзогенни и ендогенни фактори играят роля в развитието на Базедова болест, чието често съчетание определя мултифакторния характер на заболяването. Генетичните детерминанти могат да се унаследят по рецесивен или доминантен път. Към последните най-добре е проучена ролята на стреса (15). Вирусите и бактериалните инфекции са вторият по значимост етиологичен фактор (16). Друг добре проучен екзогенен фактор е тютюнопушенето.

Хипотиреоидизмът, може да се наблюдава сред индивиди от всяка възрастова група, ангажиращи редица органи и системи. Представява патологично състояние, дължащо се на трайно понижена до липсваща функция на щитовидната жлеза (17).

Клиничната изява на това състояние се дължи на определени морфологични промени в жлезата. Към заболявания, протичащи с хипофункция на жлезата се отнасят и ендемичната гуша и кретенизъм. Редица фактори на средата могат да обусловят развитието на патологията- радиационен фон, екзогенен внос на радиоактивен йод. Извън вродените дефекти съществуват състояния, също водещи до разгънатата клинична картина на хипотиреоидизъм - лимфоцитарен аутоимунен тиреоидит; тиреоидит на Хашимото, който е най-честата причина за изява на хипотиреоидизъм; атрофичен спонтанен тиреоидит (18). Аблацията на щитовидната жлеза - оперативно и с радиоактивен йод; хипопитуитаризъм, както и злоупотребата с тиреостатично лечение, също могат да доведат до хипотиреоидизъм (18). За развитието на хипотиреоидизмът от значение са както факторите на околната среда, така и генетичните компоненти. Екзогенните фактори също имат важна роля в отключването на първичния хипотиреоидизъм. Това включва редица химически агенти, лекарствени средства, възпалителни заболявания, провеждане на лъчелечение, както и травматично въздействие или следоперативно състояние, при тотална или субтотална резекция на жлезата (19).

Йодът има важна роля в индукцията на състоянието. При дефицит, липсва основният субстрат, необходим за синтеза на щитовидните хормони. Обратното- при прекален внос на йод, се наблюдава блокиране на йодните помпи (ефект на Wolff-

Chaikoff), с което могат да се активират автоимунни реакции, поради промяна в антигенната характеристика на тиреоцитите (19).

За патофизиологията на хипотиреозидизмът е важно да е отбележи, че в резултат на промените на хормоналната активност, се наблюдават тежки усложнения, от страна на сърдечно-съдовата система, централна и периферна нервна система, както и промяна в метаболитните функции на организма (20), (Таблица 1).

Роля на тиреоидните хормони върху въглехидратния метаболизъм

Ролята на тиреоидните хормони върху въглехидратния метаболизъм се описва чрез директния ефект върху глюкозния метаболизъм, както и върху инсулиновата секреция и чувствителност (21), което се свързва с въздействието им върху β - клетките на панкреаса – отговорът им е повишен към глюкозата и катехоламините при хипертиреозидизъм, поради повишената маса на β - клетките (19). Хипертиреозидизмът се асоциира с епизоди на хипергликемия, поради повишената глюкозна абсорбция от гастроинтестиналния тракт, резултат от повишения кръвен ток от вена порта и увеличеното стомашно изпразване (22). При това състояние полуживотът на инсулина е редуциран (23), освен това се установява секреция на биологично неактивни инсулинови прекурсори (13, 24). На ниво глюкозен транспорт, също се открива повлияване, като при хипертиреозидизма нарастват серумните нива на GLUT2 (основният глюкозен транспортер в черния дроб) (25), което води до активиране на глюконеогенезата с влошен гликемичен контрол, което определя повишаването на инсулинова резистентост в периферните органи (на ниво черен дроб) (13). От друга страна хипотиреозидизмът, както в клиничната, така и в субклинична форма, има определящ механизъм в инсулиновата резистентост (26). При тази дисфункция на щитовидната жлеза, са установни промени в адренергичната активност и намаление на глюкозната абсорбция от тънките черва, което се развива паралелно с намаление на гликогенолизата в черния дроб и мускулите, както и в глюконеогенезата и в базалната секреция на инсулина (27). *In vitro* и *in vivo* проувания показват, че това се дължи на влошеното инсулиново действие, което определя и промените в глюкозната утилизация. Това дава обяснение за връзката между тиреоидната дисфункция и затлъстяването (27).

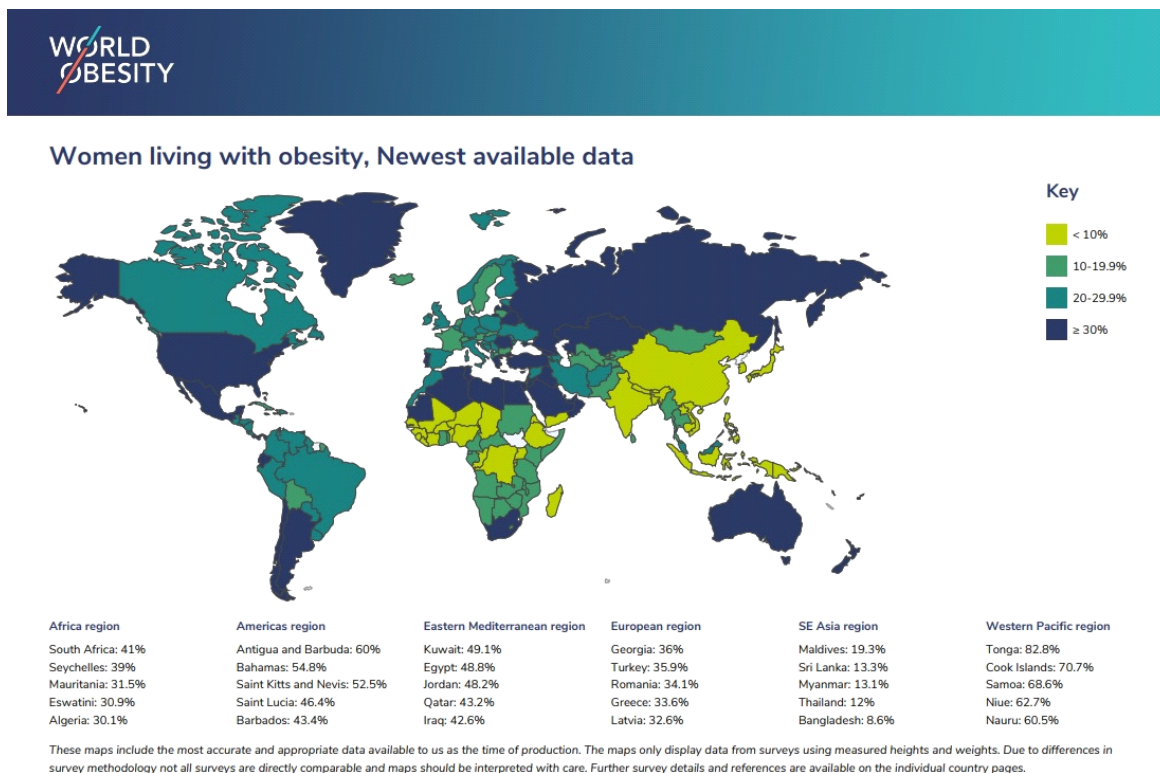
Б. ОСНОВНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЗАТЛЪСТЯВАНЕТО, ПРЕДИАБЕТА И ЗАХАРНИЯ ДИАБЕТ ТИП 2

- Епидемиологични данни

В своето историческо развитие, обществото неведнъж е променяло представата си за значението на телесното тегло - от признак на благополучие през Средновековието до основен здравен рисков фактор през XXI век (28), водещ до развитието на захарен диабет тип II, сърдечно-съдови заболявания, остеоартит, някои видове рак (карцином на ендометриума, гърдата) (29). СЗО определя затлъстяването като епидемията на XXI век, като статистиките показват непрекъснато нарастване, което наложи налагането на глобални стратегии и мерки за овладяването на проблема и неговите дълготрайни последствия, върху физическото и ментално здраве на засегнатото население (3).

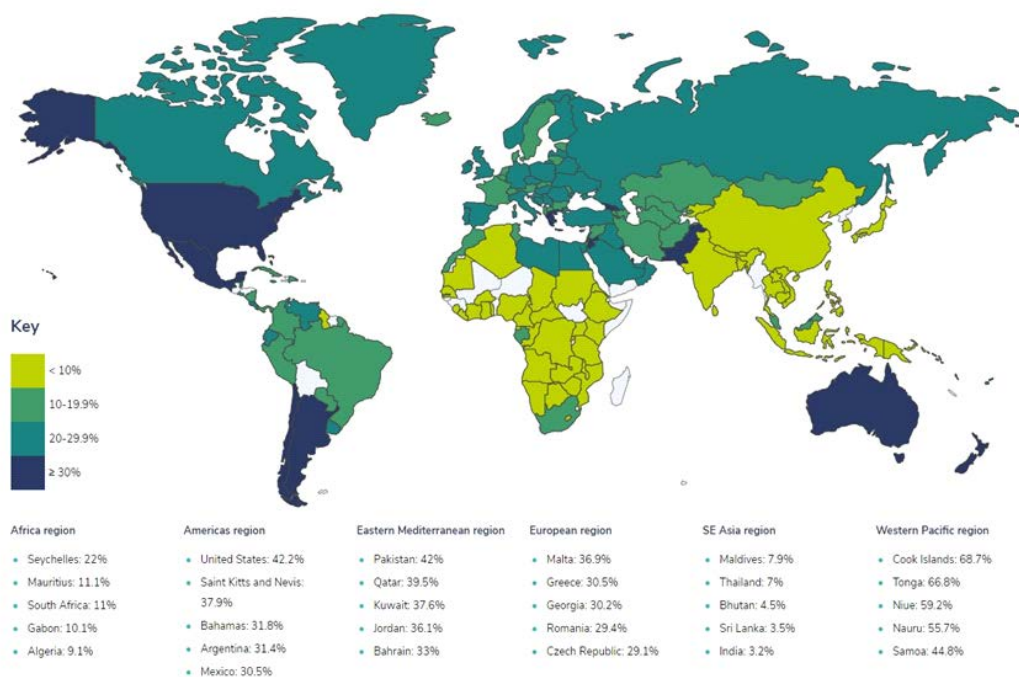
Според СЗО, към 2008 година броят на възрастните (над 20 годишна възраст) с наднормено тегло, надхвърля 1,5 милиарда души, като от тях над 200 милиона мъже и приблизително 300 милиона жени, страдащи от затлъстяване (1). Най-значителни промени в статистиката на обезитетата се наблюдават в периода след 2016 г., като данните сочат достигане на заболяемост от затлъстяване при до 39% от световното население. Последните данни показват, че в света има 366 милиона души със захарен диабет, като се очаква до 2030 г. броят им да достигне 522 милиона (Фигура 3). С всяка година броят нараства с 10 милиона души, които заболяват от диабет, като 78 000 от тях са деца. Около 90 % от пациентите страдат от захарен диабет тип 2 (30). Заболяването е налице както в развитите, така и в развиващите се страни, като понастоящем 80% от хората с диабет живеят в страни с ниски и средни доходи (31) Днес се говори за пандемия от захарен диабет. За България 60% от населението на 18 годишна възраст страда от затлъстяване (32). Последните данните показват, че хората с диабет е 577 124 (9.6% от населението \geq 20-годишна възраст) – 337 980 мъже и 239 144 жени. Приблизително 426 831 (73.9%) са с диагностицирано заболяване, а около 150 293 (26.1%) остават недиагностицирани (33). В България около 222 433 души (3.7% от населението \geq 20-годишна възраст) са с предиабет, състояние което може да прогресира до захарен диабет, ако не бъде диагностицирано и лекувано своевременно (2). Плашеща

е тенденцията за падането на възрастовата граница при заболяемите от захарен диабет или са със затлъстяване и в предиабетно състояние. Общо около 13.3% от населението \geq 20-годишна възраст или 799 557 души са с отклонения в глюкозния толеранс у нас (33).



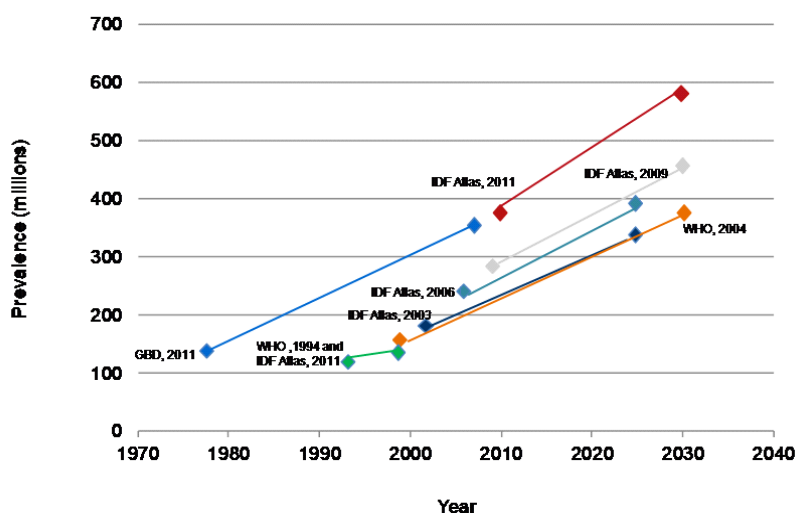
Фигура 1. Актуализирани данни /януари 2021 г./ за световното разпределение на затлъстяването сред жените (в %). <https://www.worldobesity.org/>

Men living with obesity, Newest available data



Фигура 2. Актуализирани данни /януари 2021 г./ за световното разпределение на затлъстяването сред мъжете (в %) <https://www.worldobesity.org/>

Около 50% случаите на захарен диабет в света са недиагностицирани. Така понастоящем около 183 милиона души по света имат захарен диабет, без да знаят за съществуването му (Фигура 3).



Фигура 3. Прогнози, свързани със световното разпространение на диабет тип II, свързан със затлъстяването на населението. Легенда: GBD = Изпитване на усложненията от болестта в света.

Епидемиологичните данни алармират за здравните, социалните и икономическите ефекти на тези патологични процеси върху населението както от развитите, така и от развиващите се държави (34). Основната причина, която обяснява тази нарастваща тенденция на хора с наднормено тегло, се свързва с доминирането на западния стил на хранене и живот. Той се характеризира с повишена консумация на мазнини, на храни съдържащи бързо усвоими захари, както и ниската физическа активност. В последното десетилетие се създаде термина **"diabesity"**, обединяващ диабет и затлъстяване (35).

• Характеристика на затлъстяването

Затлъстяването е болестно състояние, което се дефинира като хронично метаболитно заболяване, характеризиращо се с натрупване на прекомерно количество мастна тъкан и с дисбаланс между вноса на калории и енергоразхода в организма (1), при което индексът на телесната маса (ИТМ) е 30 или по-висок (36). Съотношението талия/ханш също е важен при оценката на сърдечно-съдовите рискови фактори (37, 38). ИТМ е определящ показател за процентното съдържание на телесни мазнини, както и за общото им количество (38). В зависимост от разпределението на мастната тъкан, различаваме няколко типа затлъстяване: андроидно затлъстяване, гиноидно затлъстяване и затлъстяване от смесен тип (39).

Андроидното затлъстяване (мъжки тип затлъстяване, централно затлъстяване или затлъстяване тип "ябълка"), се характеризира с натрупване на голямо количество мастна тъкан в горната половина на тялото, над ханша, предимно в подкожието на коремната стена и в мезентериума (40). Свързано е с по-чести изяви на нарушен глюкозен толеранс, захарен диабет тип 2, дислипидемия, хиперурикемия, артериална хипертония, исхемична болест на сърцето, намалени нива на свързващия половите хормони глобулин и високи нива на свободния тестостерон (41). Този тип затлъстяване е

от хипертрофичен тип и резултатите от лечението са по-добри в сравнение с гиноидния тип затлъстяване (40).

Гиноидното затлъстяване е известно още като женски тип затлъстяване или затлъстяване тип “круша”. Характеризира се с отлагане на мазнини предимно в долната половина на тялото. Гиноидното затлъстяване е свързано с по-висок риск от варикозни вени и артрити. То е от хиперпластичен тип и е резистентно на лечение (42). Увеличеният брой на мастните клетки започва от ранна детска възраст.

Смесеният тип затлъстяване представлява комбинация от характеристиките на андроидния и гиноидния тип затлъстяване. Основният метод за диагностика на наднорменото тегло и затлъстяването е определянето на **индекса на телесна маса (ИТМ)** (43). Това е медико-биологичен показател, който служи за определяне на нормалното, здравословно тегло при хора и служи за диагностициране на затлъстяване и недохранване спрямо ръста и теглото (38), (Таблица 2). Индексът на телесната маса се измерва чрез стойността на телесното тегло в килограми върху ръста на квадратен метър и се определя по следната формула:

$$\text{ИТМ} = \frac{\text{тегло в кг}}{\text{ръст}^2 \text{ в см}}$$

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| ПОДНОРМЕНО ТЕГЛО | ИТМ \leq 18,5 |
| НОРМАЛНО ТЕГЛО | ИТМ 18,5-24,9 |
| НАДНОРМЕНО ТЕГЛО | ИТМ 25,0-29,9 |
| ЗАТЪЛЪСТЯВАНЕ КЛАС I | ИТМ 30,0-34,9 |

Таблица 2. Класификация на затлъстяването спрямо ИТМ по СЗО (43)

За определянето на разпределението на мастната тъкан може да се използва и съотношението на талията спрямо ханша. Изчислява се като се измерва обиколката на талията в см. и се раздели на обиколката на ханша в см. Методът е въведен от Prof. Jean Vague и започва да се използва в началото на 80-те години на XX век (44). Значението на метода е свързано с определяне на връзката между централния тип затлъстяване и развитието на сърдечно-съдов риск, диабет и други хронични нарушения. Измерването на обиколката на талията също е подходяща техника за определяне на висцералното затлъстяване. Някои автори дори го намират за по-прогностичен по отношение на сърдечно-съдовия риск, в сравнение със съотношението талия-ханш (Таблица 3).

| ПОЛ | УВЕЛИЧЕН РИСК ОТ РАЗВИТИЕ НА СЪРДЕЧНО-СЪДОВО ЗАБОЛЯВАНЕ | ЗНАЧИТЕЛЕН РИСК ОТ РАЗВИТИЕ НА СЪРДЕЧНО-СЪДОВО ЗАБОЛЯВАНЕ |
|-------------|--|--|
| МЪЖЕ | ≥ 94 см | ≥ 102 см |
| ЖЕНИ | ≥ 80 см | ≥ 88 см |

Таблица 3. Полово-специфична разлика в обиколката на талия и рискът за развитие на сърдечно-съдови заболявания

Затлъстяването и наднорменото тегло се свързват с повишен риск от развитие на инсулинова резистентност и захарен диабет тип II (45). При пациентите с неправилен контрол на телесното тегло, мастната тъкан отделя в повишено количество неестерифицирани мастни киселини (НЕМК), глицерол, хормони, проинфламаторни цитокини и други фактори, които имат роля в развитието на инсулинова резистентност (34). Патологичните промени свързани с неправилното функциониране на ниво инсулин и инсулинови рецептори е основен рисков фактор за ангажиране на бета-клетъчната функция на панкреаса. Когато тази дисфункция е съпроводена с хипергликемия се говори за риск от ЗД тип II (45).

Характеристика на предиабет и захарен диабет тип 2

Терминът **предиабет** обединява в себе си състояния на нарушения във въглехидратния толеранс: **нарушена гликемия на гладно (НГГ)** и **нарушен глюкозен толеранс (НГТ)**. На фона на тези състояния се наблюдава повишен риск от развитие на захарен диабет и значим риск за възникването на сърдечно-съдови увреждания (46). Хората с НГТ имат 1.48 пъти по висока обща смъртност и 1.66 пъти по висок риск от смърт от сърдечно-съдови заболявания в сравнение с индивидите с нормален глюкозен толеранс (2, 47). За хората с НГГ общата смъртност и смъртността от ССЗ са между 1.19 и 1.28 пъти по-високи от тези на индивидите с нормален глюкозен толеранс (48). Всички лица, които са имали отклонения в нивото на кръвната захар – нарушена гликемия на гладно (НГГ) или нарушен глюкозен толеранс (НГТ) остават с потенциален риск от по-натъжно развитие на захарен диабет

Стойността на кръвната захар на гладно трябва да е под 6,1 mmol/L (110 mg/dL) според СЗО. Американската диабетна асоциация счита за нормални стойности на кръвната глюкоза на гладно под 5,6 mmol/L. Стойности между 6,1 и 7,0 mmol/L (110 и 125 mg/dL) са гранични и са показател за нарушена гликемия на гладно, а такива над 7,0 mmol/L (126 mg/dL) са диагностичен критерий за диабет. На втория час резултат под 7,8 mmol/L се счита за нормален, а по-високи стойности демонстрират хипергликемия. Стойности на глюкозата в плазмата след втория час между 7,8 и 11,1 mmol/L са показател за „нарушен глюкозен толеранс”, а над 11,1 mmol/L (200mg/dL) потвърждават диагноза диабет (Таблица 4).

| ДИАГНОЗА | ОРАЛЕН ГЛЮКОЗО ТОЛЕРАНТЕН ТЕСТ (mmol/L), (ОГТТ) | КРЪВНА ЗАХАР НА ГЛАДНО (mmol/L) | HbA1c (%) |
|---------------------------------|---|--|-----------|
| НОРМАЛНА ГЛИКЕМИЯ | < 6.1 | < 6.1 | < 6.0 |
| НАРУШЕНА ГЛИКЕМИЯ | < 7.8 | ≥ 6.1/ 7.0 | 6.0 - 6.4 |
| НАРУШЕН ГЛЮКОЗЕН ТОЛЕРАНС | ≥ 7.8 | < 7.0 | 6.0 - 6.4 |

Таблица 4. Стойности на кръвната захар при различните нарушения на глюкозния метаболизъм (49)

Повечето хора със затлъстяване и инсулинова резистентност нямат отклонение в стойностите на измерената кръвна захар. При нормални условия ендокринният апарат на панкреаса увеличава отделянето на инсулин, за да компенсира резистентността на тъканите към действието на хормона и с това да поддържа нормален глюкозен толеранс (50). Когато този намален глюкозен не може да се компенсира се развива захарен диабет.

Захарният диабет е полигенно многофакторно, хронично заболяване,, характеризираща се с повишено ниво на кръвната захар (глюкоза) в организма, което се дължи на намалена реакция на клетките към инсулина или на недостатъчното му произвеждане в тялото (51). Диагнозата захарен диабет се поставя при наличие на клинична картина: полиурия, полидипсия, помени в телесното тегло и случайно измерена кръвна захар над 11,1 ммол/л, т.е. при проба взета независимо по кое време на денонощието, без оглед на времето от последното хранене или при плазмена глюкоза

над 7,0 ммол/л (кръвна проба взета след интервал от поне 8 часа след последното хранене). В диагностичните критерии на заболяването се включват стойността на кръвната захар над 11,1ммол/л на 120' в хода на провеждан ОГТТ, както и стойности на гликиран хемоглобин HbA1c > 6,5% (52).

Нов диагностичен подход за верифициране на захарен диабет, включва проследяване на гликемиите със сензор за постоянен глюкозен мониторинг (continuous glucose monitoring, CGM). Оценяването на времето в таргетните стойности (Time In Range, TIR) е стандарт, който е много по-чувствителен и точен маркер за проследяване на глюкозния метаболизъм. С тези стойности се следят и усложненията по отношение на микро и макроваскулрните усложнения, характерни както за захарния диабет, така и в предиабетната му фаза (117).

В. ХАРАКТЕРИСТИКА НА ИНСУЛИНОВАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ

Инсулиновата резистентност се дефинира като промяна на чувствителността на клетките от периферните тъкани – мускулна, мастна, нервна и др. към действието на инсулина, което води до високи концентрации както на глюкоза, така и на инсулин в кръвта. Тези промени могат да възникнат физиологично в различен етап от живота - както по време на бременност, така и в пубертета и с напредване на възрастта. Промените в начина на живот, в типа на хранене и с повишаването на физическата активност, могат да доведат до подобряване на инсулиновата чувствителност на тъканите (53).

Диагностиката на инсулиновата резистентност става след провеждане на **тест с глюкоза- орален глюкозо толерантен тест (ОГТТ)**. Провежда се след поне 12 часа гладуване, сутрин на гладно, пациентът изпива 75 грама глюкоза, разтворена в 300 мл вода. Измерват се стойностите на кръвната глюкоза преди натоварването (0') и на всеки 60', 120' и 180' минута в следващите два часа.

За по-прецизно определяне на инсулиновата чувствителност в клиничната практика се наложи използването на **НОМА-Индекс** (Хомеостатиче модел за оценка на инсулинова чувствителност). При създаването му авторите му се основават на данни от физиологични изследвания, които описват обратната връзка на глюкозната регулация.

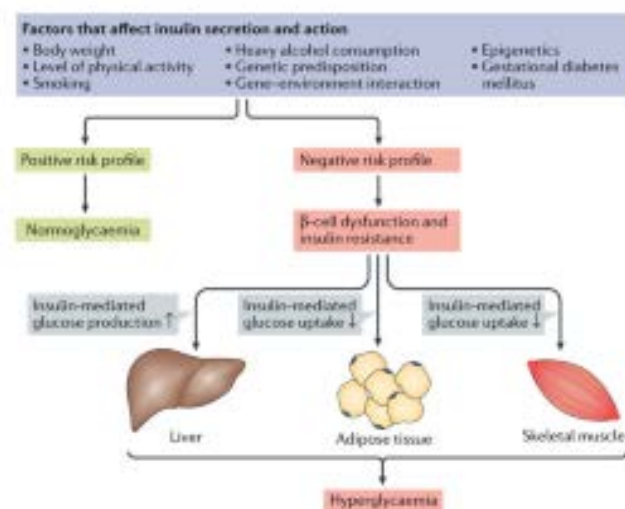
Така се създава компютърна програма, която може да определи функцията от стойностите на **кръвната захар и инсулина на гладно**. Това позволява да се изчисли функцията на бета клетките и оттам да се определи инсулиновата резистентност (54).

Индексът се изчислява по следната формула:

$$\text{НОМА} = (\text{Глюкоза} \times \text{Инсулин}) / 22.5,$$

където "Глюкоза" е нивото на кръвна захар на гладно, "Инсулин" – нивото на инсулин в кръвната плазма на гладно, а 22.5 – постоянна величина.

При стойности между 2-2.5 се показва висока инсулинова чувствителност и добър гликемичен контрол. При стойности около и повече от 4 има данни за понижена инсулинова чувствителност и проява на инсулинова резистентност. Индекс над 8 обикновено се асоциира с наличието на захарен диабет тип 2 (54).



Фигура 4. Патофизиология на хипергликемията и повишената циркулация на мастни киселини при пациенти със затлъстяване, усложнено със захарен диабет тип 2. Действие на инсулина върху различни тъкани и клетки и нива на засягане от инсулинова резистентност (адаптирано по Wallace J et. al, 2011) <https://diabetes.medicinematters.com>

На клетъчно ниво, механизмът на възникване на инсулиновата резистентност се описва като неадекватно инсулиново сигнализиране от рецептора до крайните субстрати на инсулиновото действие (Фигура 4), определящо множество метаболитни и митогенни промени (55).

Затлъстяването, като резултат от промяна в двигателната активност и прекомерен прием на храна, с последващо натрупване на мастна тъкан, води до редица ендокринни механизми в генезата на инсулинова резистентност (55).

Характеристика на мастната тъкан като ендокринен орган, който участва в регулацията на метаболизма

Мастната тъкан е съставена от клетки, наречени адипоцити, съхраняващи липиди, с което се свързва, както енергийната и терморегулаторна функция, така и секрецията на редица хормони и биологично активни вещества (56), вземащи участие в регулацията на базалния метаболизъм (лептин, адипонектин, проинфламаторни фактори, като тумор некротизиращ фактор α (TNF- α), интерлевкин (IL6), фактор D (известен като адипсин), протромботични агенти като плазминоген активиращ инхибитор I, както и компоненти, участващи в регулацията на артериалното налягане- ангиотензиноген (57). Множество проучвания показват, че мастната тъкан, при хора със затлъстяване, се характеризира с повишена инфилтрация от макрофаги (62). Счита се, че затлъстяването се характеризира с нискостепенно възпаление (58).

В зависимост от еволюцията и анатомичните особености на клетките, изграждащи мастната тъкан, разглеждаме два типа: **бяла и кафява мастна тъкан (59)**. Кафявата мастна тъкан (КМТ), се определя като естествен защитен механизъм срещу хипотермия при бозайниците (60). Съставена е от диференцирани адипоцити, съдържащи множество липидни капчици и големи митохондрии, свързани със специфичен протеини- несвързан протеин 1 (uncoupling protein 1, USP1), разположен върху вътрешната митохондриална мембрана. Излагането на организма на ниски температури, както и приемът на храна, води до активирането на USP1- протеина, което повишава окислението на глюкозата и на свободните мастни киселини(61, 62). Дълго време се е считало, че кафявата мастна тъкан може да се открие само при малки бозайници и

новородени. В началото на XX век се появяват първите данни за наличие на КМТ и при възрастни (60). Описаните през 1908 година депа от кафява мастна тъкан в областта на ременете и по врата на възрастни трупове, са със сходна като морфологична структура с интерскапуларните депа на VAT при животни. През 2002 година стана възможно визуализирането на кафявата мастна тъкан, посредством F-флуоро-2-деокси-D-глюкозо (F-FDG) позитрон емисионна компютърна томография (63). Доказването на VAT, поставя редица други въпроси, относно метаболитната роля на този вид мастна тъкан, както и откриване на връзката ѝ с развитието на затлъстяването.

Бялата мастна тъкан има няколко предилекционни зони в човешкото тяло и може да бъде разделена в две основни категории: **подкожно депо**, разположено в хиподермалните области на абдомен, бедрата и седалището и **висцерално депо**-интраабдоминалната област, заобикаляща вътрешните органи. Висцералната мастна тъкан води до значителни здравни рискове, като засяга функцията на жизнено важни органи като черен дроб и сърце.

Малък процент бяла мастна тъкан може да се открие, разположена между клетките на кафявата мастна тъкан (64), което може да бъде индуцирано от външни фактори, като екстремно ниски температури, физически упражнения, както и дълго време третиране с медикаменти от групата на тиазолидиндиони (rosiglitazone) - ефект, известен като „покафеняване“ на бялата мастна тъкан (65). Изградена е предимно от натоварени с липиди, мастни клетки, наречени адипоцити, както и от техните прекурсори- преадипоцити, и в по-малка степен мезенхимни клетки, ендотелни клетки, фибробласти, макрофаги и Т-клетки. Установяването на ендокринната роля на бялата мастна тъкан, стана възможно, след изолирането на хормона лептин, секретирани от адипоцитите (66). С ендокринната функция на бялата мастна тъкан се свързва също секрецията и на редица други адипозо-специфични протеини, наречени „адипокини“- адипонектин и резистин, които заедно с лептина, могат да действат като паракринни, аутокринни и ендокринни стимули. Подчертаната ендокринна роля на бялата мастна тъкан, се проявява както при дефицит (липодистрофия), така и при излишък (затлъстяване), като това води до редица метаболитни последици. Затлъстяването пряко корелира с развитието на инсулинова резистентност, дислипидемия, артериална

хипертония и секреция на проинфламаторни агенти (67). В бялата мастна тъкан при лица със затлъстяване, се натрупват триглицериди, което води до увеличаване размерите на вече съществуващите адипоцити (хипертрофия) и/или до увеличаване на броя на адипоцитите (хиперплазия) (61).

Механизмите за контрола на продукцията и секрецията на адипоцитите не са напълно изяснени. Продуктите от секрецията на бялата мастна тъкан- хормони и проинфламаторни протеини, участват в редица процеси- от контрола в приема на храна и артериалното налягане, до регулацията на липидния метаболизъм, повишаване на инсулиновата чувствителност, отговор при възпалителни процеси и активиране на имунната система (68).

Лептинът представлява едноверижен протеохормон, с молекулна маса 16 kDa, вземащ ключова роля в регулацията на телесното тегло. Продуцирането на хормона се свързва с *ob*-ген (69), разположен на 7 хромозома (70). Названието лептин има гръцки произход (от гръцки *leptos*, означаващ слаб). Основната му секреция се реализира от адипоцитите, но съществуват данни за продукция и от други органи и тъкани, като фундуса на стомаха, чернен дроб, скелетната мускулатура, както и плацентата (70). Действието на лептина по отношение на централната нервна система, се свързва основно с ефекта върху хипоталамуса, което довежда до супресия на хранителния прием, както и стимулиране на енергийния разход (71, 72). Лептиновите рецептори принадлежат към групата на клас I цитокинови рецептори, повсеместно разпространени по цялото тяло. При животни и хора със затлъстяване се наблюдава тежка лептинова резистентност, причинена от мутации в лептиновите рецептори (71). Установени са няколко изоформи на рецепторите за хормона, описани като Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd и Ob-Re (73). Ob-Ra се счита за лептинов транспортер, докато Ob-Re е разтворима форма на трансмембранный лептинов рецептор. Ob-Rb съдържа интрацелуларен сигнален домейн и показва висока концентрация в хипоталамуса, което определя лептина като аферентен сигнален механизъм за централната нервна система по отношение на мастния статус на организма. Тази концепция се подкрепя и от факта, че при дефекти в *ob*/*ob*-гена, водещ до лептинов дефицит при мишки и хора, терапия с лептин показва успех в овладяването на наднорменото тегло (73). Това поставя въпроса

за възможностите лептинът да бъде включен в лечението на затлъстяването (74, 75). Допълнителни изследвания потвърдиха, че лептиновата резистентност при обезни хора е причината за повишени нива на лептин в организма, което прави терапията неефективна(76). Причината за тази десенситизация на хормона вероятно се дължи на нарушение в транспорта на хормона през кръвно-мозъчната бариера, на абнормалности в експресията на рецепторите за лептин или в индукцията на сигнални механизми (77).

Освен демонстрираните метаболитни ефекти, лептинът оказва въздействие и върху редица ендокринни функции. Проучвания върху хора, показват, че намаляването на лептиновата концентрация, в отговор на недостиг на храна, се свързва с глад-индуцираната супресия на хипоталамо-хипофизо-гонадната ос. Това подчертава възможната връзка между ендокринната функция на мастната тъкан (78), центровете за регулация на енергийната хомеостаза в хипоталамуса и репродуктивната система, което се счита за индикация за нормална репродуктивна функция (71). Този ефект, в частност, може да се обясни и със супресивния ефект на лептина върху невропептид Y (neuropeptide Y) по отношение на продукцията му и секрецията от невроните в нуклеус аркуатос (arcuate nucleus). Невропептид Y е мощен стимулатор на апетита и участва в регулацията на редица хипофизни хормони: супресия на растежния хормон, чрез стимулация на соматостатин, супресия на гонадотропините, или активиране на хипофизо-адреналната ос (79).

Нивата на лептин в кръвта корелират правопрпорционално с индекса на телесна маса (ИТМ) и с количеството на мастната тъкан в организма (71). Прехранването, инсулинът и кортикостероидите се считат за фактори, увеличаващи секрецията на лептин, докато постенето и недохранването водят до супресия на хормоналните нива. Лептинът има дуалистична роля в регулацията на физиологичните процеси при човек. През периоди на поддържане на нормални стойности на телесното тегло, когато калорийният прием е в баланс с енергийния разход, лептиновите концентрации са в координация с концентрациите на мастната тъкан (80). Когато се наруши това равновесие и приемът на храна надвиши енергоразходът, тогава лептинът започва да функционира като сензор за настъпващия енергиен дисбаланс (81). Пациенти с липодистрофия имат значително намалени нива на плазмената концентрация на лептина

(78). Прилагането му при такива болни намалява чернодробните мазнини и подобрява инсулиновата чувствителност в хепатоцитите. За клиничната практика, е важно да се знае, че лептиновата секреция се характеризира с циркадни ритми и проявява тенденция за най-висока секреция през нощта (около полунощ), като стойностите, измерени по това време са ~30-100% по-висок от тези измерени сутрин или в ранния следобедни часове. Тези вариации е уместно да бъдат съобразявани при вземане на кръв за анализ (71). Лептиновите концентрации при жени са по-високи, сравнени с тези при мъжете. И при двата пола, покачването на лептиновите нива с възрастта се асоциира с намаляване на концентрацията на лептиновите рецептори. Дисбаланс в експресията на лептинови рецептори и на съотношението между свързаната и свободната фракция на лептина, също се установява и при пациенти с инсулинова резистентност и абдоминално затлъстяване. Причината за това се обяснява с наличната при тези състояния лептинова резистентност, която недвусмислено се свързва с инсулиновата резистентност и абдоминалното затлъстяване и може да се определи като част от комплекса на метаболитния синдром.

Ендокринната функция на мастната тъкан е свързана със секрецията и на друг представител на адипокините - **адипонектин**, известен още като адипоцит комплемент-свързан протеин 30 kDa (Adipocyte complement-related protein of 30 kDa) (Spranger, 2003 #6). Адипонектинът представлява адипоцит-специфичен протеин с роля в глюкозната и липидна хомеостаза. Съществуват две основни групи рецептори за хормона: AdipoR1 и AdipoR2. AdipoE1 се експресира предимно върху скелетната мускулатура, докато AdipoR2 се намират предимно в черния дроб (82). В молекулата на адипонектина са включени два крайни участъка – N-терминален колаген-подобен домейн и C-терминален глобуларен домейн със сигнификантна секвенция и структурно съответствие за C1q субединица от системата на комплемента. Скъсени молекули адипонектин (gAdiponectin), съдържащ само C- терминален глобуларен домейн, отчетени в кръвен серум и рекомбинантни gAdiponectin, се свързват с регулацията на редукцията на телесно тегло както и окислението на свободни мастни киселини в мускулите и черния дроб при мишки (82).

Инжектирането на адипонектин на диабетни мишки без затлъстяване, не води до инсулин-независимо понижаване на глюкозните концентрации. Установена е негативна обратна връзка между затлъстяването и циркулиращия адипонектин, като концентрациите му нарастват паралелно с редукцията на телесно тегло. Понижените концентрации на адипонектин се асоциират с инсулинова резистентност, както и при пациенти с диагностициран захарен диабет тип II.

Промяната в плазмената концентрация на лептин и адипонектин, при хора със затлъстяване, може да се използва като предиктор за определяне на инсулиновата чувствителност, чрез определянето на **съотношението адипонектин/лептин (А/Л)** (83). Значимостта на съотношението адипонектин/лептин е във връзка с регулацията на енергийната хомеостаза и метаболизма (83). Първоначалните данни показват, че съотношението може да корелира с дебелината на интима медия в каротидите, както и като предиктор на риска за развитие на кардио-метаболически синдром или оценка за МАСЕ. (84). Известно е, че стойност на А/Л около 1.0, измерени, съответно в $\mu\text{g/mL}$ и ng/mL , се определят като нормален показател. Съотношение между 0.5 и 1.0 се определят като умерен към средно повишен риск; съотношение под 0.5 кореспондира със силно завишен риск от развитие на кардио-метаболически синдром (12). Като допълнение към неговите предимства се подчертава фактът, че въпреки приема на глюкоза, при орално-глюкозния тест с натоварване (ОГТТ), то данните от изчисляването на съотношението лептин/адипонектин могат да бъдат информативни при измерени и във фаза без гладуване, стойности. Лептинът и адипонектинът показват много по-голяма стабилност в плазма и серум, за разлика от инсулина (84). В същото време, ниските нива на адипонектина са по-чувствителни като абсолютна стойност, включена с изчисляването на съотношението. Необходими са допълнителни изследвания, за да потвърдят валидността на това съотношение за оценка на инсулиновата резистентност.

Синтезът и секрецията на адипонектин се регулира от редица контролни механизми. Адипоцитите са отговорни за секрецията на инсулин –сензитиращите хормони, лептин, адипонектин. Адипоцитната хипертрофия, индуцирана от диета, богата на мазнини, повлиява секрецията и продукцията на тези хормони, като влошава инсулиновата резистентност при лица със затлъстяване. Метаболитните функции на

адипонектина, също се отнасят и към синтеза на липиди, като увеличената му концентрация намалява липидогенезата и глюконеогенезата в черния дроб и в кръвта (82).

Инсулинът и инсулин-растежният фактор (IGF-1) повишават синтеза на адипонектин в бялата мастна тъкан. При хора със затлъстяване се установяват редуцирани концентрации на хормона, което се асоциира с лептинов дефицит или резистентност. Приемът на храна богата на белтъчини, може да увеличи чувствителността на хепатоцитите към инсулин, както и да окаже директен или индиректен ефект като намалява липидите в общата циркулация. Секрецията на адипонектин може да подобри инсулиновата чувствителност и глюкозния толеранс. По този начин се коригират хипергликемиите при лица със затлъстяване. Действието на адипонектина не се изчерпва само в глюкозната и липидна хомеостаза, както и в подобряване на инсулиновата чувствителност, но също така повлиява и сърдечносъдовата система. Редица проучвания отчитат корелация между ниските нива на хормона и развитието на коронарната съдова болест на фона на основните рискови фактори като мъжки пол, високо кръвно налягане, затлъстяване и захарен диабет II тип. Интересен е фактът, че адипонектинът потиска секрецията на проинфламаторния фактор TNF- α от моноцити/ макрофаги. Счита се, че по този механизъм адипонектинът играе роля като протективен фактор за развитието на атеросклероза. При хора е установено отрицателната обратна връзка между плазмените концентрации на адипонектин и ИТМ, процентът на общите мазнини, постпрандиалните стойности на инсулин и концентрацията на триглицеридите. Предстоят проучвания за възможната употреба на рекомбинантен адипонектин за намаляване на сърдечно-съдовия риск.

2. Характеристика на стомашно-чревния тракт като ендокринен орган, който регулира апетита и метаболизма

Стомашно-чревният тракт, освен с екзокринна секреция, се описва и като най-големия ендокринен орган, чийто хормони участват също в редица метаболитни процеси. Най-добре изучен представител на групата е **грелинът**. Грелинът представлява пептиден хормон, който първоначално се е разглеждал като фактор,

стимулиращ секрецията на растежния хормон от предния дял на хипофизата (85). Продължителните проучвания върху грелина, показват, че той се синтезира като препрохормон, който под въздействието на протеолитични ензими се разгражда до пептид с 28 аминокиселини със серинова група в структурата си. Тази структура определя и основните му биологични активности (85). Синтезата му се реализира предимно в пристенните клетки на стомашния фундус. Много малък процент от грелина се синтезира от плацентата, бъбреците, хипофизата и хипоталамуса.

Преди да бъде открит грелинът, редица проучвания потвърждават наличието на грелинови рецептори (86). Клетки, разположени в предната част на хипофизата, съдържат рецептори, при чието свързване се потенцира синтезът на растежен хормон(84). Тези рецептори първоначално се определят като Growth hormone secretagogue receptor (87). Естественият им лиганд е открит през 1999 година и се нарича грелин, име, което получава заради ефекта, който оказва на растежния хормон (представката “ghre”, означаваща расте). Грелинови рецептори се откриват по клетките в предния дял на хипофизата, в хипоталамуса, сърцето и мастната тъкан (88). Свързването на грелина с GHS-Rs, разположени по хипофизата върху невроните в хипоталамуса, отговорни за секрецията на соматолиберини, с което стимулират секрецията на растежен хормон. Активирането от грелина на неврони, разположени върху паравентрикуларното ядро на хипоталамуса, съдържащи невротрансмитерите невропептин Y (NPY) и агути свързания пептин (AGRP), стимулира апетита и чрез това активира приема на храна.

Грелинът води до увеличаване на мастната тъкан като намалява окислението на мазнините (85). Той има отношение към стимулирането на чревния мотилитет и стомашното изпразване, което определя освен наличието на централни механизми на действие, така и на локални ефекти на хормона. Освен като секретарог по отношение на растежния хормон, грелинът има и други интересни ефекти, които предстоят да бъдат подробно изучени. Повлиява гастроентеропанкреатичните функции и има орексиогенен, метаболитен, кардиоваскуларен и антипролиферативен ефект. При възрастни хора, плазмените нива на грелина се покачват двойно преди хранене и намаляват до базални стойности 1 час след нахранване. В случаи на отрицателен енергиен баланс, типично

наблюдаван при нискокалорична диета, извънредно повишена физическа активност, анорексия, се отчитат високи плазмени концентрации на грелин. При обезни пациенти, които имат повишен хранителен прием, синтезът му е намален.

Ендокринният сигнален механизъм към хипоталамуса и пътищата, по които хормонът достига до мозъка и преминава хематоенцефалната бариера, не са напълно изяснени. Съществуват анатомични данни за наличие на капилярна мрежа в нуклеус аркуатус, по която до част от паренхима му достигат невроактивни вещества, което определя модулиращото влияние на грелина върху хипоталамичната пластичност и вероятната му стимулация върху хипокампалната невронална тъкан.

Малко са данните в литературата за ефектите на грелина по отношение на инсулиновата секреция. Данните сочат, че концентрацията на грелин е обратнопропорционална на инсулиновите нива на гладно. Грелинът е по-нисък у болни с неморбидно затлъстяване в сравнение с тези с морбидно и се повишава (при вторите) след хирургическа интервенция с последваща масивна загуба на тегло– стомашен байпас (извънстомашна синтеза) (85).

Широкото разпространение на грелина в тъканите подсказва, че хормонът може да има и все още недоказани функции. Грелинът засилва защитните механизми на организма и играе роля в имунната система към имунната система, като засилва защитните механизми. Кардиопротективният ефект на хормона също е обект на изследвания (89). Той може да бъде използван като диагностично и терапевтично средство при лечение на дефицит на растежен хормон. Доказаният ефект на грелина по отношение на дълготрайната регулация на енергийната хомеостаза и изследванията, които демонстрират, ниските нива му при обезни хора, се използват в разработването на нови терапевтични стратегии, за борба със затлъстяването.

В последните години интерес представлява разработването на ваксини, насочени върху контрола на апетита. Разработването на такава група препарати коренно променя представата за ваксините като средство за превенция на заболявания, причинени от определен инфекциозен агент. С тази нова концепция за ваксините се разработват и такива против определени групи канцерози (хепатоцелуларен карцином) (90). Общото в тази идея е, че се използват определени антигенни, чрез които да се доведе до

предизвикване на имуен отговор- производство на антитела, които се свързват с антигена и го неутрализират (90). Относно лечението на затлъстяването, този подход може да се използва като алтернативно лечение чрез потискане на апетит-стимулиращите хормони и/или чрез инхибиране на резорбцията на хранителните вещества (91). Разработената ваксина срещу грелина, всъщност представлява поликлонални антигрелинови антитела. Първоначалното им прилагане при плъхове е интрацеребровентрикуларно, което довежда до дозозависима инхибиция на хранителния прием(89).

От получените до момента данни личи, че грелиновите рецепторни антагонист водят до подобряване на глюкозния толеранс, намаляват апетита и водят до редуция на телесното тегло при плъхове(91). Целта на разработваната антигрелинова ваксина е да провокира автоимуен отговор, с образуването на автоантитела насочени срещу грелина, с което да редуцира нивото на отделения хормон. При хората, проучването е минало I и II фаза, но резултатите не са така оптимистични както при експериментите с животни. През 2006 година се проведе рандомизирано, двойно-сляпо и плацебо-контролирано проучване, при което доброволците получаваха по 4 апликации с 300 µg от ваксината. След 6 месечно проследяване, се установи редуция средно с 3,6 кг. въпреки изразения имуен отговор на грелинови автоантитела (92).

Европейското проучване DiOGenes (6-та Рамкова програма на Европейския съюз, 2005-2009) показва водещата роля на режимите с повишение на белтъчното съдържание (25E%) и продукти с нисък гликемичен индекс, в превенцията на затлъстяването и захарния диабет тип 2 (99, 100).

Друг европейски научен проект е PREVIEW, който е рандомизирано, многоцентрово проучване за период от три години. Целта на проучването е да се проследи риска от развитието на захарен диабет тип 2 при хора с наднормено тегло/затлъстяване и предиабет, подложени на няколко типа хранителни интервенции-високобелтъчна и с нисък гликемичен индекс диета, сравнена с диета с умерен прием на белтъчини и храни със среден гликемичен индекс и различна по интензитет физическа активност(109).

Изучаването на ползите и рисковете от прилагането на различни методи за редукция на телесната маса включва и бариатричната хирургия (БХ) като метод за подобряване на контрола на телесното тегло при пациенти с болестно затлъстяване. БХ е обект на интензивна изследователска дейност както при хора, така и върху животни. През 2001 г. Pories и Albrecht изказват хипотезата, че при пациентите със захарен диабет тип 2 се наблюдава понижена продукция на инкретини от стомашно-чревния тракт като глюкагоноподобен пептид-1 (GLP-1) и глюкозо-зависим инсулинотропен полипептид (GIP) и грелин продуцирани от ентероендокринните К-клетки и секретирани в общото кръвообращение в отговор на хранителен стимул (111, 112).

В литературата са описани няколко основни вида бариатрични операции – надлъжна 2/3 резекция на стомаха (sleeve), различни видове стомашен байпас, билиопанкреатична диверсия с дуоденално прекъсване. Единият механизъм на действие върху патофизиологичните промени при затлъстяване, е чрез рестрикция, при който, намалявайки обема на стомаха, се намалява и възможността за прием на повече храна. Другият механизъм е чрез малабсорбция, при който се редуцира абсорбцията на приетите хранителни вещества, като се съкращава пътят им през гастроинтестиналния тракт, където тя се осъществява. Основният механизъм обаче е невро-хормоналният, който все още е неизяснен (113). Установени са промени в секрецията на чревните хормони, в глюкозния метаболизъм, жлъчните киселини и микробиотата (118). Основите проучвания по темата са с фокус върху лептиновата регулация. При намаляване на циркулиращите нива на хормона, се оказва ефект върху хипоталамичната регулация на хормона чрез понижаване синтеза за РОМС (Проопиомеланокортин) , като ефектите върху тази невронална активност водят до прояви на чувство на глад и до намален разход на енергия (118).

За ефективното лечение на затлъстяването се разработват и редица фармакологични методи, като част с част от тях, са в различни фази на клинични проучвания (101). Ефектите на отделните медикаменти, може да се разгледат най-общо като: редукция на абсорбцията на нутриентите от гастро-интестиналния тракт или периферните тъкани; повлияване приема на храна чрез увеличаване на насищането; повлияване на апетита; редукция на телесните мазнини чрез повлияване на

инсулиновата резистентност в мастната тъкан и черния дроб (102). През 2012 година Федералната агенция по храни и лекарства одобри медикамента Qsymia, представляващ комбиниран препарат от Топирамат/Фентермин (антиконвулсант/симпатикомиметичен амин) (104), който постига ефект в редуция на телесното тегло като потиска апетита и/или променя възприятието за ситост. Медикаментът се използва като добавка към нискокалорична диета и режим с повишена физическа активност за възрастни с начален ИТМ от 30 кг/м² или повече, или при 27 кг/м² плюс поне едно придружаващо заболяване като артериална хипертония, захарен диабет тип 2 или дислипидемия. Съществува и комбинация от Налтрексон и Буспропион, която действа чрез повлияване на апетита и увеличаване на енергоразхода на организма (105). GLP1-рецепторните агонисти (glucagon-like peptide-1 agonists), първоначално регистрирани като медикаменти за лечение на захарен диабет тип 2, доказаха позитивен ефект по отношение на редуцията на телесно тегло, включително и при недиабетно болни пациенти. Определят се като нова генерация пептидни агонисти на хормоните, секретирани от ентероендокринната система на стомашно-чревния тракт. GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) агонистите са най-новите медикаменти, които имат потенциал да бъдат включени в терапията на затлъстяване и придружаващите им кардио-метаболитни заболявания. (108). Данните за тяхната ефективност и лекарствена безопасност предстоят да бъдат публикувани.

Към новите класове антидиабетни медикаменти се включват и групата на инхибиторите на натриево-глюкозния ко-транспортер 2, SGLT 2 инхибиторите (sodium-dependent glucose co-transporter 2). Новите проучвания показват зависимост между калорийния разход и приема на посочените медикаменти при пациенти със затлъстяване и захарен диабет тип 2 (114). Основният механизъм на действие на тази група достига до нормогликемия се обяснява с повлияването на глюкозата на реабсорбция в проксималните бъбречни тубули.. Рандомизираните клиничните проучвания показват, че средната редуция на телесно тегло при пациенти, приемащи медикаменти от групата на SGLT 2 инхибиторите сравнени с плацебо, е между 2 и 3 кг (115). Данните от клиничните проучвания в клинична практика показват още по-съществена редуция от до 4.6 кг. в групата на дапаглифлозин, при 90-дневно проследяване (116).

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на научните изследвания е да се проучи експериментално и клинично ролята на щитовидната жлеза, в частност хипо- и хиперфункцията на жлезата, в механизмите на развитие на инсулиновата резистентност и промените във въглехидратния метаболизъм, телесната маса и секрецията на адипокини

За осъществяване на тази цел са поставени следните задачи:

А. Експериментални задачи

- Да се разработят и стандартизират два експериментални модела на индуцирана хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза на мъжки плъхове порода Wistar.
- Да се изследва развитието на инсулинова резистентност на базата на определянето на НОМА-индекс и съотношението между лептин и адипонектин при двата експериментални модела на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза на плъхове.
- Да се определят промените на плазмените нива на лептин, адипонектин и грелин при двата експериментални модела на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза на плъхове.
- Да се установи и сравни ефекта на Метформин и Емапаглифлозин върху инсулиновата чувствителност и резистентност при двата експериментални модела на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза на плъхове.
- Да се установи и сравни ефекта на Метформин и Емпаглифлозин върху съотношението адипонектин/лептин.

Б. Клинични задачи (Данни от европейския проект PREVIEW за превенция на захарен диабет тип 2 при лица със затлъстяване)

- Да се установи влиянието на хипофункцията на щитовидната жлеза върху степента на развитие на инсулинова резистентност при лица с предиабет и затлъстяване.

- Да се определи влиянието на хипофункцията на щитовидната жлеза върху степента на редукция на телесната маса и последващата задръжка на теглото при лица с предиабет и затлъстяване.

В. Данни от научно-изследователски проект „Регулация на апетита и метаболизма при лица с високостепенно затлъстяване след бариатрична хирургия“ Грант 2018 към МУ-София

- Да се определи влиянието на бариатричната хирургия върху секрецията на адипокини и биометричните показатели на мастната тъкан.
- Да се оцени и проследи ефектът на провеждана бариатрична хирургия върху съотношението адипонектин/лептин и оценка на сърдено-съдов риск.
- Да се сравнят и оценят нивата на адипокините и маркерите на инсулинова резистентност при пациенти след проведена бариатрична хирургия и при еутиреоидни пациенти със затлъстяване преди и след прием на метформин и емпаглифлозин в отделени по Ендокринология и болести на обмяната към УМБАЛ „Св. Анна“- София.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

А. Експериментални изследвания

- **Експериментални животни**

За целите и задачите на проведените експериментални изследвания се използваха половоз-зрели мъжки плъхове порода Wistar, доставени от централен вивариум. Опитите се проведоха при спазване на стандартните условия за отглеждане, храна и вода. Експериментите бяха извършени спрямо Международните Насоки и Принципи на Експерименти с Животни (International Guiding Principles for Animals Research), както и етичните принципи при планиране и провеждане на експериментите според КЕНИМУС (Комисия по Етика на Научните изследвания при Медицински Университет).

Експериментални модели с цел създаването на дисфункция на щитовидната жлеза

Експериментите *in vivo* се проведоха върху мъжки плъхове порода Wistar със средно тегло 200-230 гр. При провеждането на опитите се спазваше циркадният ритъм (12ч. светло/ 12 ч. тъмно). Поддържаната температура на околната среда по време на експериментите беше 22 С. Плъховете бяха рандомизирани в три групи: 1-ва група с експериментално индуциран хипотиреоидизъм, 2-ра група с експериментално индуциран модел на индуциран хипертиреоидизъм и 3-та контролна група. Животните бяха разделни по три в кафез. Всички животни от трите групи имаха достъп до вода и стандартна лабораторна храна *ad libitum*. Телесната маса на всички животни беше измервана седмично.

Модел на експериментално индуциран хипотиреоидизъм с пропилтиурацил (Propicil 50 mg, ALMEDA LTD).

В продължение на един месец плъховете от експерименталната група получаваха чрез водата пропилтиурацил в дневна доза 1 mg/ml с цел създаването на този модел. Дневната доза на плъх беше оценена, като се раздели дневното количество изпита вода върху общото тегло на всички плъхове.

Пропилтиурацил (Propicil 50 mg, ALMEDA LTD) представлява тиреостатик, принадлежащ към групата на производните на тиоуреята. Медикаментът потиска биосинтезата на щитовидните хормони чрез инхибиция на тиреоидната пероксидаза. Това го прави средство на избор при лечението на тиреотоксикоза. Във високи дози може да доведе до хипофункция на жлезата.

Модел на експериментално индуциран модел на хипертиреоидизъм с L-тироксин (L-tyroxin 100 µg, Berlin-Chemie)

В продължение на един месец плъховете от експерименталната група получаваха чрез водата с L-tyroxin в дневна доза 2µg/ml с цел създаването на този модел. Дневната

доза на плъх беше оценена, като се раздели дневното количество изпита вода върху общото тегло на всички плъхове.

L-tyroxin 100 mcg, Berlin-Chemie- тироксин (T4). Използва се за хормонозаместителна терапия при хипофункция на щитовидната жлеза. Апликацията на медикамента е р.о. Независимо от по-слабата му чревна резорбция, внасянето на допълнителни дози T4 и дейодинирането му, позволява откриването на T3, който има по-добре изразена метаболитна роля. Необходимо е периодично титриране на дозите, като изходният критерии за това са стойностите на TSH.

3. Експериментални модели на индуцирани хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза и влиянието на две фармакологични средства

3.1. Ефект на Метформин (Glucophage, 100 mg, Berlin-Chemie) върху животни с дисфункция на щитовидната жлеза

Първата група с експериментален модел на хипофункция на щитовидната жлеза е третирана с Метформин (50 мг/ кг телесна маса) 3 пъти дневно; Втората група с експериментален модел на хиперфункция на щитовидната жлеза е третирана с Метформин (50 мг/ кг телесна маса) 3 пъти дневно; Третата група е контрола.

Метформинът е медикамент от групата на бигвадините, които са орални антидиабетни средства. Атихипергликемичният им ефект е свързан с намаляване чревната резорбция на глюкозата, улесняване на навлизането на глюкозата в тъканите и инхибиране на чернодробната глюконеогенеза. Метформинът е периферно действащ медикамент, който освен за лечение на захарен диабет тип 2, се използва за увеличаване на инсулиновата чувствителност в тъканите и се свързва с 5-10% редукция на телсното тегло.

3.2. Ефект на Емпаглифозин (10 mg, Boehringer Ingelheim International GmbH) върху животни с дисфункция на щитовидната жлеза

Първата група с експериментален модел на хипофункция на щитовидната жлеза е третирана с Емпаглифозин (3 мг еднократно дневно); Втората група с експериментален

модел на хиперфункция на щитовидната жлеза е третирана с SGLT 2 (3 мг еднократно дневно); Третата група е контрола.

SGLT2 инхибиторите са група медикаменти, които представляват селективни конкурентни на натриево-глюкозния котранспортер 2 (SGLT2). Представител на групата е емпаглифлозин (Boehringer Ingelheim International GmbH), който има значение за транспорта на глюкоза в периферните тъкани и е 5000 пъти по-селективен за SGLT 2, в сравнение с SGLT1 (основният транспортер, отговорен за абсорбцията на глюкоза в червата). SGLT 2 има висока експресия в бъбреците. Инхибирането на SGLT 2 води до засилена екскреция на глюкоза в урината, което освен свързано с редукция на гликемиите, обуславя и увеличена загуба на калории, свързана с редукция на мазнините в организма и намаление на телесното тегло.

4. Биохимични методи

4.1. Определяне на глюкозата в кръвта на плъховете

Определяше от кръв от опашката чрез глюкометър (One Touch Ultra Easy LifeScan Europe, Швейцария). Капката кръв се накапва на лентичката и резултатът се получава след 5 секунди.

4.2. Определяна на инсулиновата резистентност чрез изчисляване на НОМА индекс

За изчисляване на инсулиновата чувствителност при експерименталните животни, се използва **НОМА-Индекс** (Хомеостатичен модел за оценка на инсулинова чувствителност). Данните за оценката основават на резултати от физиологични изследвания, които описват обратната връзка на глюкозната регулация и инсулиновата секреция. Създадената по този начин математическа формула, позволява да се изчисли функцията на бета клетките и оттам да се определи инсулиновата резистентност.

Индексът се изчислява по следната формула:

$$\text{НОМА} = (\text{Глюкоза} \times \text{Инсулин}) / 22.5$$

От всеки плъх и от трите групи, се взе кръв, като се спазваха правилата за работа с експериментални животни. Изследването на кръвната захар се определи чрез вземане на

кръв от опашката на плъховете. Използва се глюкометър (One Touch Ultra Easy LifeScan Europe, Швейцария). Капката кръв се наcapва на лентичката и резултатът се получава след 5 секунди. За определяне на инсулина в кръвта на животните, се използва ELISA Rat Insulin.

| НОМА- индекс и тежест на инсулинова резистентност | |
|---|----------|
| Норма (висока инсулинова чувствителност и добър гликемичен контрол) | 2- 2,5 |
| Инсулинова резистентност (нарушения в гликемиите) | 2.5-8 |
| Захарен диабет (на фона на изразена инсулинова резистентност) | ≥ 8 |

5. ELISA (enzyme immunosorbent assay) метод

5.1. ELISA метод за определяне на инсулин на плъхове

Имунологичен метод за количествено определяне на инсулин в серум на плъхове. Осъществява на базата на реакцията двоен-антитяло сандвич. Плаките са предварително инкубирани с моноклонални антитела конюгиани към ензимът horseradish peroxidase (HRP). След промиване за отстраняване на всички несвързани антитела се добавя ТМВ субстрат, за да се разпознае количествено свързаните с инсулина антитела. Резултатите се отчитат чрез спектрофотометър в ng/ml.

5.2. ELISA методи за определяне на TSH, FT3 и FT4

Тези методи се осъществяват на базата на реакцията двоен-антитяло сандвич. Плаката е предварително инкубирана с моноклонално антитяло, специфично за С-края на хормона. Това антитяло се свързва с цялото количество хормон, което се намира в стандарта или кръвната проба. Конюгиран разтвор (вторично антитяло) се прибавя към ямките, за да разпознае другия край на хормона. По този начин двете антитела

формират сандвич, като се свързват за различни краища на хормона. Концентрацията на хормона в ямките се определя при прибавяне на Субстратен разтвор (Ellman's Reagent), който спира реакцията. Чрез спектрофотометър се отчита резултата.

5.3. ELISA методи за изследване на грелин, лептин и адипонектин

5.3.1. Протокол за Rat Acylated Ghrelin ELISA кит

Кръвта за определяне на грелин се събираше в EDTA епруветки, които съдържаха p-hydroxymercuribenzoic киселина (10 µl/ml кръв). Пробите се центрофугираха на 3500 оборота за 10 мин. на +4 C. След отделянето на плазмата се добавяше 100 µl 1M HCl на 1 ml плазма. След това пробите се центрофугираха повторно за 5 мин. на +4 C. Супернатантата се отделя за провеждане на изследвания върху грелин.

Rat Acylated Ghrelin ELISA (BioVendor)- реакция се прави на основата на реакцията двоен-антитяло сандвич. Плаките са предварително инкубирани с моноклонално антитяло, специфично за C-края на грелин. То показва количествено свързване на грелин, намиращ се в кръвната проба. Добавя се вторично (конюгирано антитяло) в ямките, за да се разпознае N-терминалния край на ацетилирания грелин. По този начин двете антитела формират сандвич, като се свързват за различни краища на хормона. Концентрацията на хормона в ямките се определя при прибавяне на Субстратен разтвор (Ellman's Reagent), който спира реакцията. Резултатът се отчита чрез спектрофотометър на 405 nm. Съдържанието на грелин се изчислява в pg/ml.

5.3.2. Протокол за определяне на пълши лептин чрез ELISA кит

Пълши лептин ELISA (BioVendor) е имунологичен метод за количествено изследване на плазмена концентрация на лептин. Определянето на лептин се проведе спрямо указанията на ELISA метод. Кръвната проба за определяне на лептин се събираше в EDTA епруветки. Пробите се центрофугираха на 2000 оборота за 15 мин. на +4 C. Супернатантата се отделяше за изследване върху лептин. Пробите се отчетоха чрез спектрофотометър на 450 nm, като абсорбцията беше пропорционална на концентрацията на лептина. Плазманото съдържание на лептин се определяше в pg/ml.

5.3.3. Протокол за определяне на плъши адипонектин чрез ELISA кит

Плъши адипонектин се определя с ELISA метод, който е на основата на двоен-антитяло сандвич имунологичен метод. Комплектът на тази ELISA съдържа разредени проби, които са инкубирани в клетки с моноклонални анти-адипонектин антитела, конюгиани към ензима horseradish peroxidase (HRP). След 2 часа инкубация се добавят конюгираните към ензима антитела и се държат заедно още 90 мин. След измиване, оставащите HRP- антитела комплекси реагират с хромогенен субстрат. Измерването се извършва чрез спектрофотометрия. Получените резултати се измерват и представят в ng/ml.

8. Определяне на лептин/адипонектин съотношение

Промяната в плазмената концентрация на лептин и адипонектин при хора и животни със затлъстяване може да се използва като предиктор за определяне на инсулиновата чувствителност, при недиабетни пациенти чрез изчисляване на съотношението лептин/адипонектин. Значимостта на съотношението лептин/адипонектин (Leptin/Adiponectin Ratio, LAR) е във връзка с регулацията на енергийната хомеостаза и метаболизма. Чрез секрецията на двата адипоцита се отразява централната роля на мастната тъкан в индукцията на инсулинова резистентност. Лептинът (ng/ml) и адипонектинът ($\mu\text{g/ml}$) показват много по-голяма стабилност в плазма и серум, за разлика от инсулина. Измерените средни стойности на съотношението хормоните са изчислени в ng/ μg .

Б. Клинични изследвания

1. Обща характеристика на научно-изследователския проект PREVIEW, по 7-ма Рамкова програма на Европейския съюз

Научно-изследователският проект **PREVIEW** (*превенция на захарен диабет тип 2 при лица със затлъстяване*) представлява рандомизирано, контролирано, многоцентрово проучване. В проекта са включени участници от осем държави: България, Дания, Финландия, Испания, Холандия, Великобритания, Австралия и Нова Зеландия.

Основната **цел** на проекта е да се определи превентивния ефект на диета с високо съдържание на белтъчини и с въглехидрати с нисък гликемичен индекс, комбинирана с умерена или висока по интензивност физическа активност, върху честотата на развитие на метаболитна патология при предразположени към диабет от втори тип, деца, хора на средна възраст и възрастни (от двата пола) в предиабетно състояние. Проектът е насочен към превенция на хора с висок риск от развитие на захарен диабет тип II. В проекта са включени участници, при които съществува риск от развитие на диабет (нарушен глюкозен толеранс, наднормено тегло или затлъстяване и повишени рискови фактори на диабет).

В проучването са ангажирани 2000 участници (800 на възраст 25—45 години, и 1200 възрастни, 55—70 години). При всички възрастни участници първо беше приложена нискоенергийна диета в продължение на 8 седмици, чиято цел беше да се постигне намаление на теглото с $>8\%$. След етапа на нискоенергийната диета участниците се рандомизираха произволно в две различни хранителни интервенции и две интервенции с физически упражнения с обща продължителност 148 седмици. Целта на този период е да се предотврати диабетът от втори тип чрез поддържане на теглото (предотвратяване на рецидивите при намаляване на телесното тегло) и чрез независими метаболитни ефекти от начина на хранене и физическата активност.

Двете хранителни интервенции са: МР = умеренобелтъчна (15%) в комбинация с въглехидрати (55 Е%) с умерен до висок гликемичен индекс на храната ($GI \geq 56$); НР = високобелтъчна (25 Е%) в комбинация с въглехидрати (45 Е%) с нисък гликемичен индекс ≤ 50 . И при двете диети е предвидено да се ползват здравословни храни. **Двете интервенции с физически упражнения** са следните: МІ = умереноинтензивна: 60-75% от максималната стойност на сърдечната честота (HR_{max}), т.е. бързо ходене за възрастни; НІ = високоинтензивна: 76—90% HR_{max} , т.е. бягане за възрастни. Тъй като всички участници са групирани произволно в една диета, както и в една група за упражнения, общият брой комбинации (интервенции-групи) е четири (МР-МІ, МР-НІ, НР-МІ и НР-НІ).

| | | |
|---|---|---|
| | Диета с високо съдържание на белтъчини (НР) (25 Е%), умерен прием на въглехидрати (45 Е%) и нисък гликемичен индекс (<50) | Диета с умерено съдържание на белтъчини (МР) (15 Е%), високо съдържание на въглехидрати (55 Е%) и умерено висок гликемичен индекс (>56) |
| Физическа активност с висока интензивност (НІ) | НР-НІ (> 6 МЕТ) | МР-НІ (> 6 МЕТ) |
| Физическа активност с умерена интензивност (МІ) | НР-МІ (3-6 МЕТ) | МР-МІ (3-6 МЕТ) |

Таблица 5. Характеристика на хранителните интервенции в комбинация с различна по интензитет физическа активност

Критерии за включването в клиничното проучване

На таблица 6 са представени основните критерии, на които доброволците трябва да отговарят, за да бъдат включени в научно-изследователския проект.

| | |
|--|--|
| 1. Възраст | 25-45 години или 55-70 години |
| 2. Индекс на телесна маса | ИТМ >25 kg/m ² |
| • Предиабетно състояние (По Критериите от Международната федерация за борба с диабета) | Нарушена глюкоза на гладно (НГГ): Плазмената глюкоза във венозната кръв 5.6-6.9 mmol/l или нарушен глюкозен толеранс (НГТ): плазмената глюкоза във венозната кръв 7.8 – 11.0 mmol/l 2 часа след пероралното приемане на 75 г глюкоза (орален тест за глюкозна толерантност ОГТТ). Поради възможни разлики между отделните лаборатории (местна оценка), НbA1c не се използва като критерий за включване в квалификационните |

| | |
|--------------------------------|---|
| | изследвания. |
| 4. Информирано съгласие | Изисква се |
| 5. Етническа група | Без ограничения |
| 6. Пушене | Пушенето е разрешено, при условие, че това не е промяна при участниците (от последния 1 месец). |

Таблица 6. Включващи критерии

Критерии за изключване

Участниците задължително провеждат интервю и/или анкета. Изключващите критерии за провеждане на проучването с дадения доброволец са 21.

- Употреба на лекарства по рецепта (включително стероидни инхалатори и спрейове), освен стабилно антихипертензивно лечение, липидопонижаващи средства и орални контрацептиви.
- Заболявания на щитовидната жлеза (разрешава се включване на аутоимунния хипотиреозидизъм, ако участникът е на стабилно заместващо лечение с тироксин най-малко от 3 месеца)
- Лица с хронично заболяване, поради което е малко вероятно пациентът да живее до 6 години след това както и други медицински характеристики, които е вероятно да повлияят при участие в изследването, включително проблеми като например рисковано или невъзможно участие в програмата за физическа активност;
- Участници, занимаващи се със състезателни спортове.
- Специални диети (например вегани, диета на Аткинс) в рамките на 2 месеца преди да започне изследването. Разрешава се млечно-вегетарианска диета.
- Очакват са случаи на хранителна непоносимост по време на изследването.
- Редовно приемане на > 21 алкохолни единици/седмица (мъже), или > 14 алкохолни единици /седмица (жени)
- Употреба на наркотици
- Кръводаряване в рамките на последния 1 месец преди започване на изследването.

- Отбелязване на промяна на теглото от страна на участника >5 кг в рамките на 2 месеца преди оценяването на квалификационните изследвания (начало) (седмица 0)
- Психиатрично заболяване, дефинирано в DSMIV или критериите ICD10
- Отбелязване на нарушения в храненето от страна на участника
- Бременни или кърмачки, или жени, планиращи бременност в рамките на следващите 36 месеца.
- Лица без достъп до мобилен телефон или интернет (това е необходимо за контакт от страна на инструктора по време на етапа на поддържане на теглото).
- Недобра комуникация на езика, на който се провежда проучването.
- Минал или настоящ случай на раково заболяване (освен базелноклетъчен карцином плоскоклетъчен карцином на кожата), което по мнение на проучващото лице може да окаже влияние върху резултатите от проучването.
- Минали случаи на бариатрична операция.
- Хронични възпалителни заболявания на червата и целиакия.
- Клинично-значими активни сърдечно-съдови заболявания (инфаркт на миокарда, мозъчен инсулт през последните 6 месеца и/или сърдечна недостатъчност).
- Непостигане на намаляване на теглото 8% по време на етапа на нискоенергийната диета води до изключване от интервенцията.
- Измерва се кръвното налягане и лицата със систолично кръвно налягане над 160 и диастолично кръвно налягане над 100 mmHg също са изключени (разрешава се включването на участници със систолно=159 и/или диастолно=99). Добре регулирано ВР (<140/90 mmHg) чрез използването на лекарства (освен бета-блокери) се разрешава, ако няма промяна в кръвното налягане и лекарственото лечение в продължение на 3 месеца.

На всички участници в проекта на различни интервали по протоколите на проекта се измерваха и изследваха различни параметри. Тук посочваме само тези, свързани с дисертационния труд.

Антропометрични данни и телесен състав

Те включват телесно тегло, височина, обиколка на талията, ханша и бедрата, телесен състав и разпределение на мазнините. Измерването на телесния състав се извършва чрез биоимпеданс в зависимост от наличността в отделните центрове. Измерванията се осъществяват съгласно указанията на производителя и на гладно. По време на цялото изследване се използва същият уред и софтуер и той трябва да бъде калибриран съгласно инструкциите на производителя. Жени във фертилна възраст ще бъдат подложени на тест за бременност преди да бъде приложена DXA.

Орален глюкозо-толерантен тест и кръвни проби

Двучасов орален глюкозо-толерантен тест (OGTT): Всеки участник приема перорално 75 g глюкоза (търговски продукт) разтворена в 300 ml вода в рамките на 5 минути. По време на тази процедура участниците остават в полулегло състояние и в покой, като преди започването на теста не трябва да са приемали храна (освен 1 dL вода). Не се позволяват никакви храни и напитки (различни от даваното по време на изследването) до приключване на изследването. Вземат се кръвни проби за измерване на глюкозата на 0-ва, 30-та, 60-та, 90-та и 120-та минута след като изпият течният глюкозен разтвор.

Кръвни проби

Вземат се на гладно. Пробата веднага се центрофугира, серумът се отделя и пробата се съхранява съгласно отделни инструкции, предоставени от Централната лаборатория на проекта. Следните видове анализи от кръвната проба ще се извършат: кръвна захар на гладно и след натоварване, инсулин, C-пептид, HbA1c, общ холестерол, HDL- и LDL-холестерол, триглицериди, CRP, чернодробни ензими.

Кръвно налягане и сърдечен ритъм

Измерват се систолно и диастолно кръвно налягане с автоматично устройство на дясната ръка 5-10 мин. по-късно, докато индивидът си почива в седнало положение.

Кръвното налягане се измерва три пъти с интервал от 1 минута между измерванията, а отбелязването се извършва с точност до 1 mmHg. Прилага се средната стойност между тези две измервания. През последните 12 часа преди измерването не се позволява енергичната физическа активност, употребата на кафе или тютюнопушенето в. Уредът трябва да се поддържа и калибрира редовно (поне веднъж годишно). Измерва се сърдечният ритъм в покой и – ако е възможно – вариабилността на сърдечната честота.

Всички участници попълваха въпросници относно хранене, психологичен статус, физическа активност и др. на различни етапи от проучването.

2. Сравняване на нива на адипокините и маркерите на инсулинова резистентност при пациенти след проведена бариатрична хирургия и при еутиреоидни пациенти със затлъстяване преди и след прием на метформин и емпаглифлозин

Обработени са данни на пациенти, участници в научно-изследователски „Регулация на апетита и метаболизма при лица с високостепенно затлъстяване след бариатрична хирургия“ и пациенти преминали през отделение по „Ендокринология и болести на обмяната“ на УМБАЛ „Св. Анна“.

2.1. Обща характеристика на научно-изследователски проект „Регулация на апетита и метаболизма при лица с високостепенно затлъстяване след бариатрична хирургия“ Грант 2018 към МУ-София

Основната цел на проекта е да се изследват и установят промените в кръвните нива на ентэралните хормони, регулиращи метаболизма и апетита като грелин, глюкагон подобен хормон-1 и пептид YY 3-36, както и на адипокините лептин и адипонектин, при лица с високостепенно затлъстяване преди и след извършена бариатрична операция.

Методологията на проекта е разделена на три етапа, описани както следва:

Първият етап включва осъществяването на правилен подбор на лица с високостепенно затлъстяване, които са подходящи за бариатрична операция. Целта е да се наберат 20 пациента от двата пола.

Вторият етап включва измерване на антропометричните параметри и телесен състав, както и взимане на кръв за изследване на хормоните, които регулират апетита и метаболизма на пациенти с високостепенно затлъстяване преди бариатричната операция.

Третият етап включва измерване на антропометричните параметри и телесен състав, както и взимане на кръв за изследване на хормоните, които регулират апетита и метаболизма на същите пациенти един месец след бариатричната операция.

Тези етапи се осъществиха в Катедрата по хирургия на Медицински факултет, София. Анализът на кръвните проби чрез метода ELISA, както и статистическият анализ на получените резултати се извършиха в Катедрата по фармакология и токсикология на Медицински факултет, София.

| |
|--|
| ИТМ > 40 кг/м ² |
| ИТМ > 35 кг/м ² с доказано едно от следните придружаващи заболявания, които могат да се повлияят от операцията – захарен диабет тип 2, артериална хипертония, сънна апнея, дислипидемия |
| Възраст между 18 и 60-65 години |
| Дългогодишна анамнеза за затлъстяване с неуспешо консервативно лечение за най-малко 6 месеца |
| Липса на ендокринно заболяване, което да е причина за затлъстяването |
| Психиатрично стабилен пациент, без алкохолна и наркотична зависимост |
| Добре мотивиран пациент, разбиращи принципа и рисковете на операцията, способен на дългосрочно следоперативно проследяване |
| Приемлив оперативен риск |

Таблица 7. Критерии за бариатрична/ метаболитна хирургия

Пациентите от отделение по Ендокринология и болести на обмяната, включени в изследването, първо бяха подбрани по следните критерии:

1. Пациенти със затлъстяване II ст., на фона на установена хиперинсулинемия, изчислена чрез НОМА индекс.

2. Пациенти с придружаващо аутоимунно тиреоидно заболяване, в еутиреоиден статус, неналагащ до момента прием на хормонозаместителна терапия с Левотироксин.

3. При пациентките в детеродна възраст беше изключена бременност с провеждане на експресен тест за бременност- Тест-лента hCG .

След подбора на 21 пациенти, мъже и жени, бяха разделени в две кохорти;

1. Пациенти, провеждали монотерапия с SGLT2 инхибитор, емпаглифлозин 10 мг в рамките на последните 6 месеца.

2. Пациенти, провеждали монотерапия с Метформин 1000 мг, в максимална дневна доза до 2500 мг.

| | |
|---|---|
| 1. Възраст | 25-70 години |
| 2. Индекс на телесна маса | ИТМ >35 kg/m ² |
| 3. Предиабетно състояние (По Критериите от Международната федерация за борба с диабета) | Нарушена глюкоза на гладно (НГГ): Плазмената глюкоза във венозната кръв 5.6-6.9 mmol/l или нарушен глюкозен толеранс (НГТ): плазмената глюкоза във венозната кръв 7.8 – 11.0 mmol/l 2 часа след пероралното приемане на 75 г глюкоза (орален тест за глюкозна толерантност ОГТТ). HbA1c > 5.7- 6.4% C-peptide > 0.2 mmol/l |
| 3. Информирано съгласие | Разписано |
| 4. Етническа група | Без ограничения |
| 5. Пушене | Пушенето е разрешено, при условие, че това не е промяна при участниците (от последния 1 месец). |

Таблица 8. Критерии за включване в проучването, проведено в отделението по ендокринология и болести на обмяната

2.2. Изследователски методи

Антропометрични измервания и телесен състав. Антропометричните данни включват телесно тегло, височина, обиколка на талията, ханша и бедрата, телесен състав и разпределение на мазнините.

- Телесното тегло се измерва на гладно, с празен пикочен мехур и по бельо или друго леко облекло. Измерването се повтаря два пъти с точност до 0.1 кг. Този процес се повтаря, като за анализа се взема средната стойност от всеки два резултата. Ръст: Участниците са събути и държат петите, задната част на бедрата и горната част на гърба допрени до монтиран на стената стадиометър с точност до 0.5 cm. Използва средната стойност от двукратно измерения ръст.

- Обиколката на талията, ханша и бедрата се измерва с точност до 0.5 cm със същия метър, ако е възможно в изправено състояние. Мерките се вземат два пъти и се използва средната. Талията се измерва по средата между долното ребро и илиачния гребен в края на издишването. Мерките се вземат сутрин на гладно и с празен пикочен мехур. Обиколката на ханша се измерва като най-голямата обиколка в областта около задната част на бедрата. Средната обиколка на бедрата се измерва от дясната страна на тялото. Обиколката се измерва на по средата на бедрата отстрани (външна страна) на повърхността на бедрата, по средата между трохантера (горната част на бедрената кост, бедрото) и големия пищял (горната част на костния пищял).

- Измерването на телесния състав се извършва чрез биоимпеданс метод Танита.

ELISA методи (описани по-горе) за определяне на грелин, глюкагон подобен хормон-1 и пептид YY3-36, както и на адипокините лептин и адипонектин в плазма на лица с високостепенно затлъстяване преди и след бариатричната операция.

3. Статистически метод

Данните от всички експерименти (експериментални и клинични) бяха анализирани със софтуер SPSS, v. 13. Получените резултати са обработени статистически и представени като средна стойност \pm средна грешка посредством методите на дисперсионния анализ (one-way ANOVA) и представени графично чрез статистическата програма SPSS 28.0.0.0 и Microsoft Excel, 2003.

3.1. Описателни методи:

Вариационен анализ на количествени променливи – средна, стандартно отклонение, стандартна грешка на средна при 95% доверителен интервал; графично изобразяване на данните.

3.2. Методи за проверка на статистически хипотези:

Използваното на ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе $p < 0.05$, $p < 0.01$ или $p < 0.001$.

- Параметрични (при нормално разпределение на данните): Student t-тест за две независими извадки – за сравняване на средните между две независими групи.

- Непараметрични – (при нормално разпределение на данните):

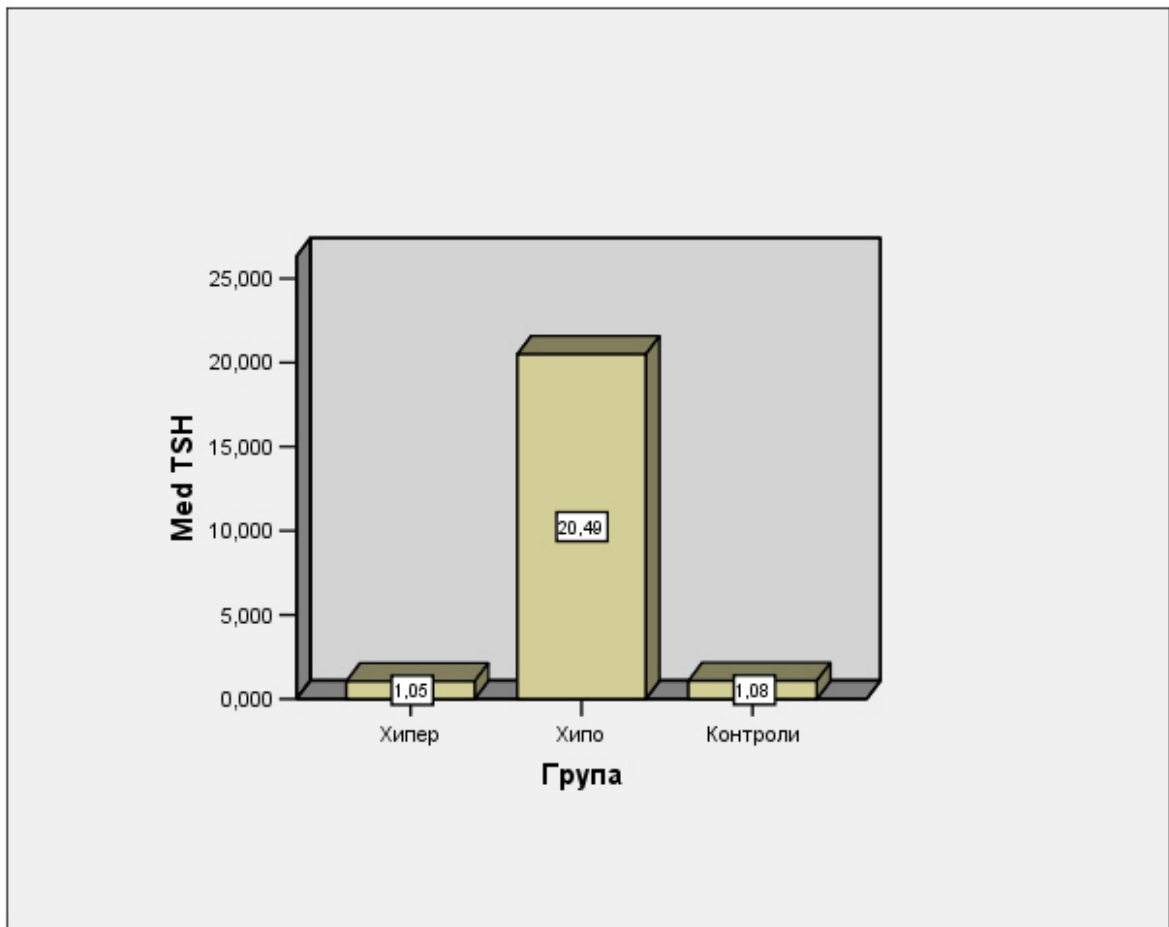
Метод на Kolmogorov-Smirnov – за проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива. Използваха се методи за проверка на хипотези:

• Student t-test-параметричен метод за сравнение на две средни стойности при ниво на значимост $p < 0.05$ или $p < 0.001$.

РЕЗУЛТАТИ

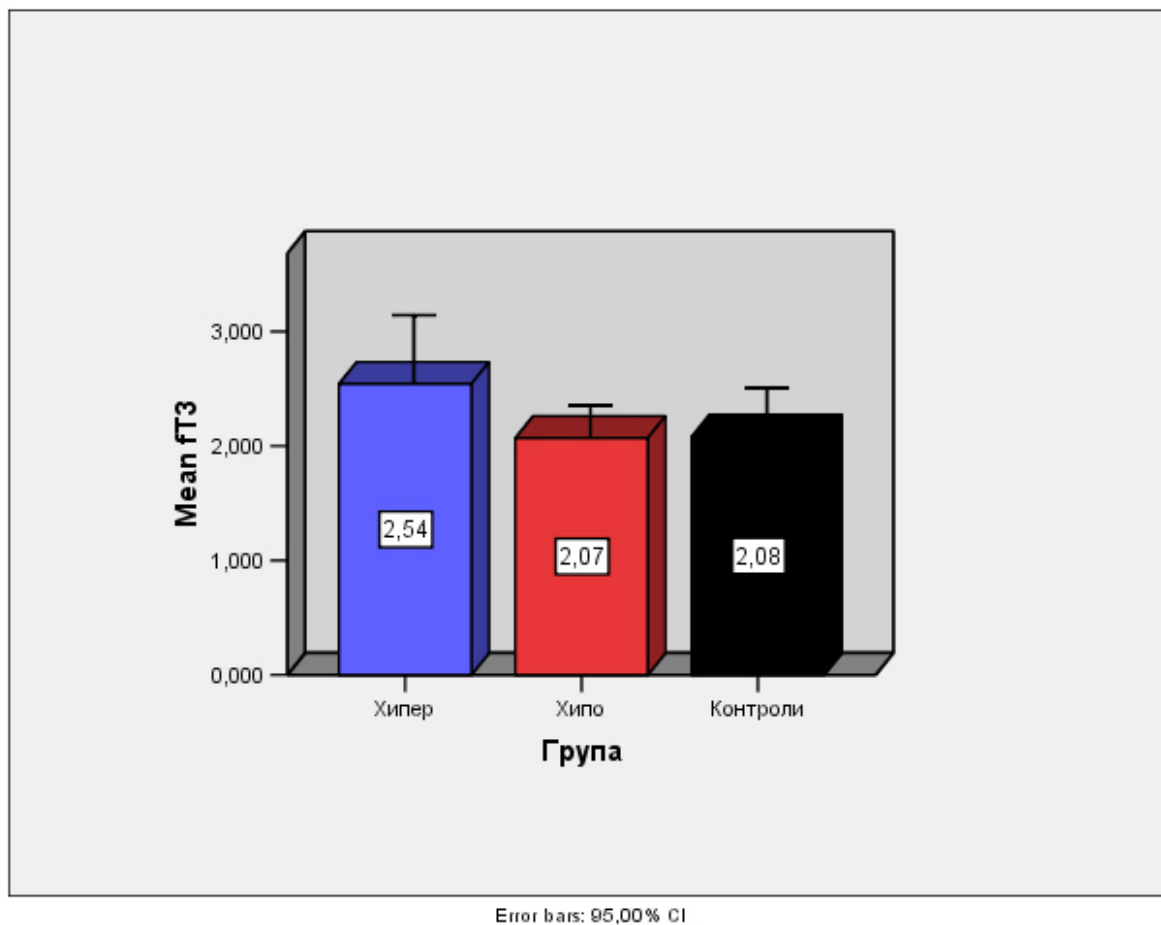
1. Ефект върху хормоналната активност на щитовидната жлеза при експериментално индуцирана хипо- и хиперфункция на жлезата

Определянето на биохимичната функция на щитовидната жлеза става чрез изследване на хормоните TSH, fT3 и fT4. Скринингов маркер за състоянието на жлезата са стойностите на TSH (Фигура 1).



Фигура 1. Средни стойности на TSH в ng/ml при трите експериментални групи плъхове, за едномесечен период. Получените в групата на експериментално индуцирани хипофункция на щитовидната жлеза,, спрямо контролна група. * $p < 0,005$

Допълнителното определяне на периферните хормони дава по-пълна информативност за степента на повлияване на щитовидната функция. За fT3 се отчитат нормално разпределение на стойностите на хормоните за отделните групи, което отразява очакваните промени във функцията на жлезата (Фигура 2).

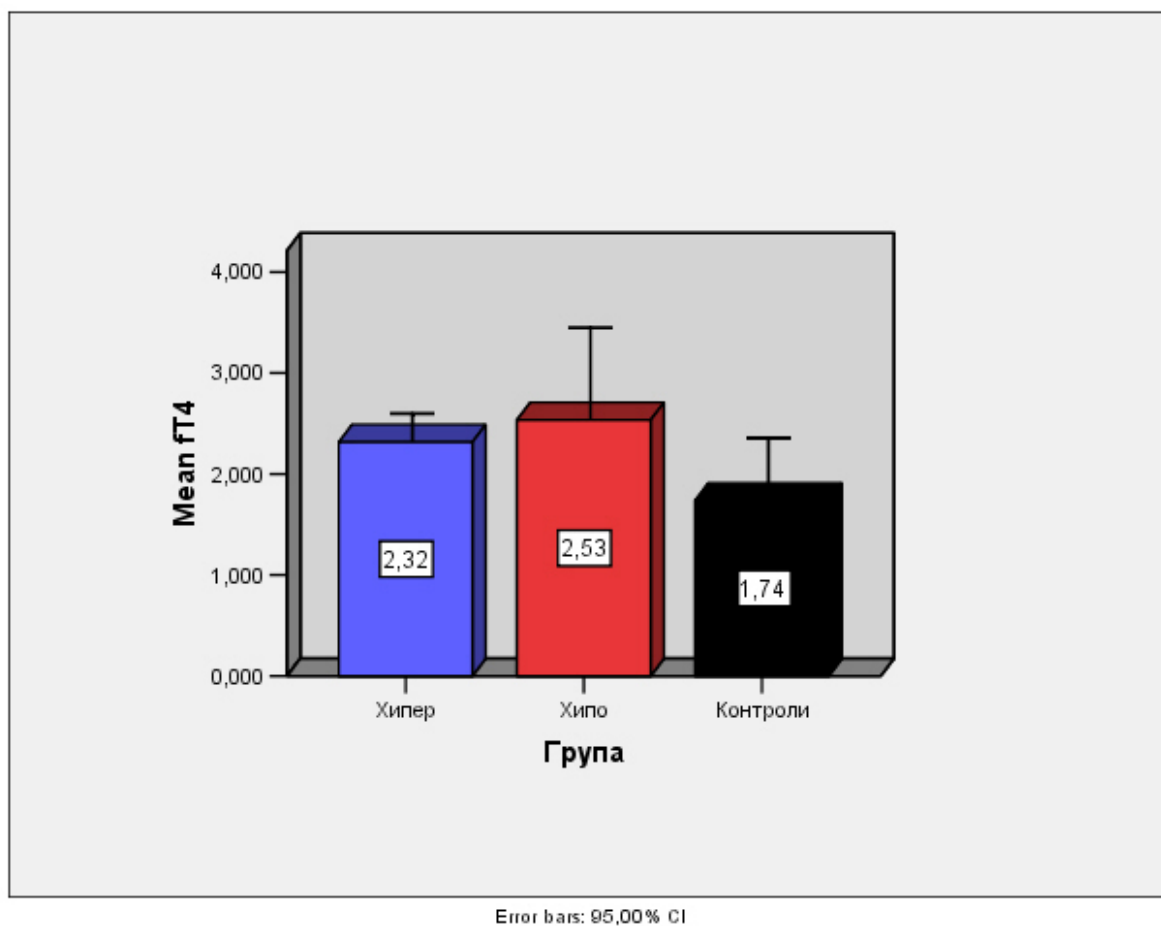


Фигура 2. Средни стойност на fT3 в ng/ml при трите групи експериментални плъхове. Експериментална група на индуциран хипертиреозидизъм спрямо контрола. * $p < 0,05$. Промяната в стойностите на периферните хормони, потвърждава валидността на експерименталния животински модел.

Самостоятелното проследяване само на fT3 и fT4 не е достатъчно, защото секрецията им, както и конверсията на fT4 в fT3 е зависимо от времевия период, в който се очаква да се развие хипофункция или хиперфункция, при съответния стандартизиран експериментален модел. От значение за конверсията на хормоните са и допълнителни фактори на средата, като околна температура и сезонност. Това има по-голямо значение по отношение на секрецията на fT4, като в рамките на 96 часа хормонът възстановява базалната си секреция, при условия,

че няма екзогенен фактор, повлияващ синтеза му, което пък дава за резултат промени в образуването на fT3. Тази зависимост е проследена от Shirpour et al. Близките стойности демонстрирани в хипо групата и контролата, показват тази зависимост при изследваните стойности на fT3.

При проследяване зависимостта на fT4, също се демонстрират промени, характерни за двете състояния на дисфункция на жлезата (Фигура 3).



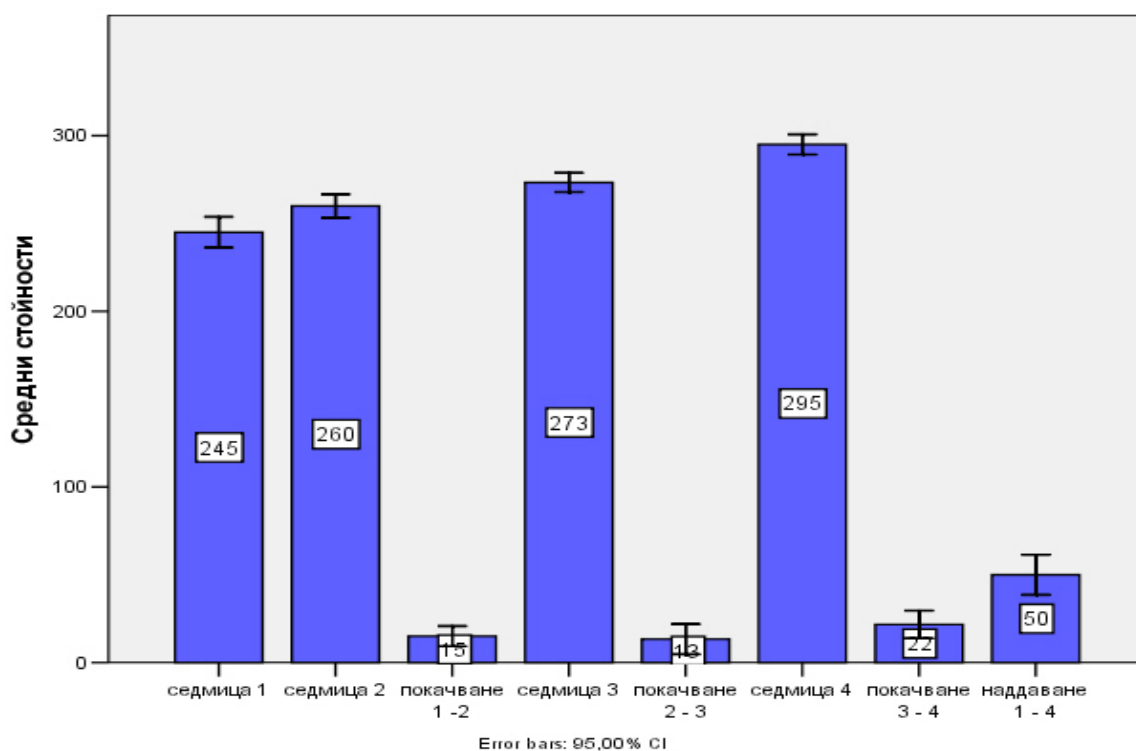
Фигура 3. Средни стойност на fT4 ng/ml при трите групи плъхове. Промяната в стойностите на периферните хормони, потвърждава валидността на експерименталния животински модел

Таблица 8. Стойности на щитовидните хормони при хипофункция и хиперфункция на жлезата.

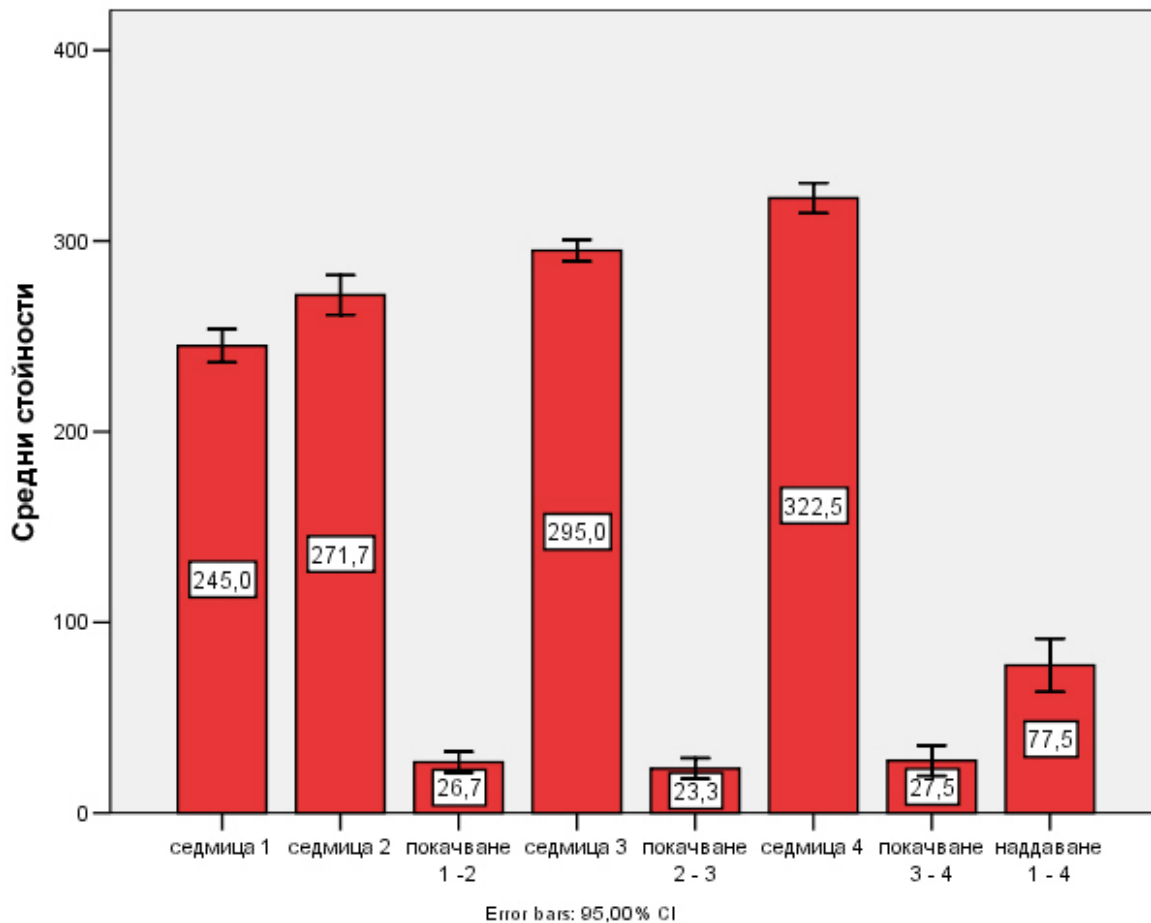
| Патология | Хипофункция на щитовидната жлеза | Хиперфункция на щитовидната жлеза |
|------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| TSH | > 3.23 ng/ml | < 0.85 ng/ml |
| fT4 | < 1.56 ng/ml | > 3.24 ng/ml |
| fT3 | < 0.2 ng/l | > 10 ng/ml |

2. Проучване на влиянието на експериментално индуцираните хипофункция и хиперфункци на щитовидната жлеза върху телесното тегло при експериментални животни

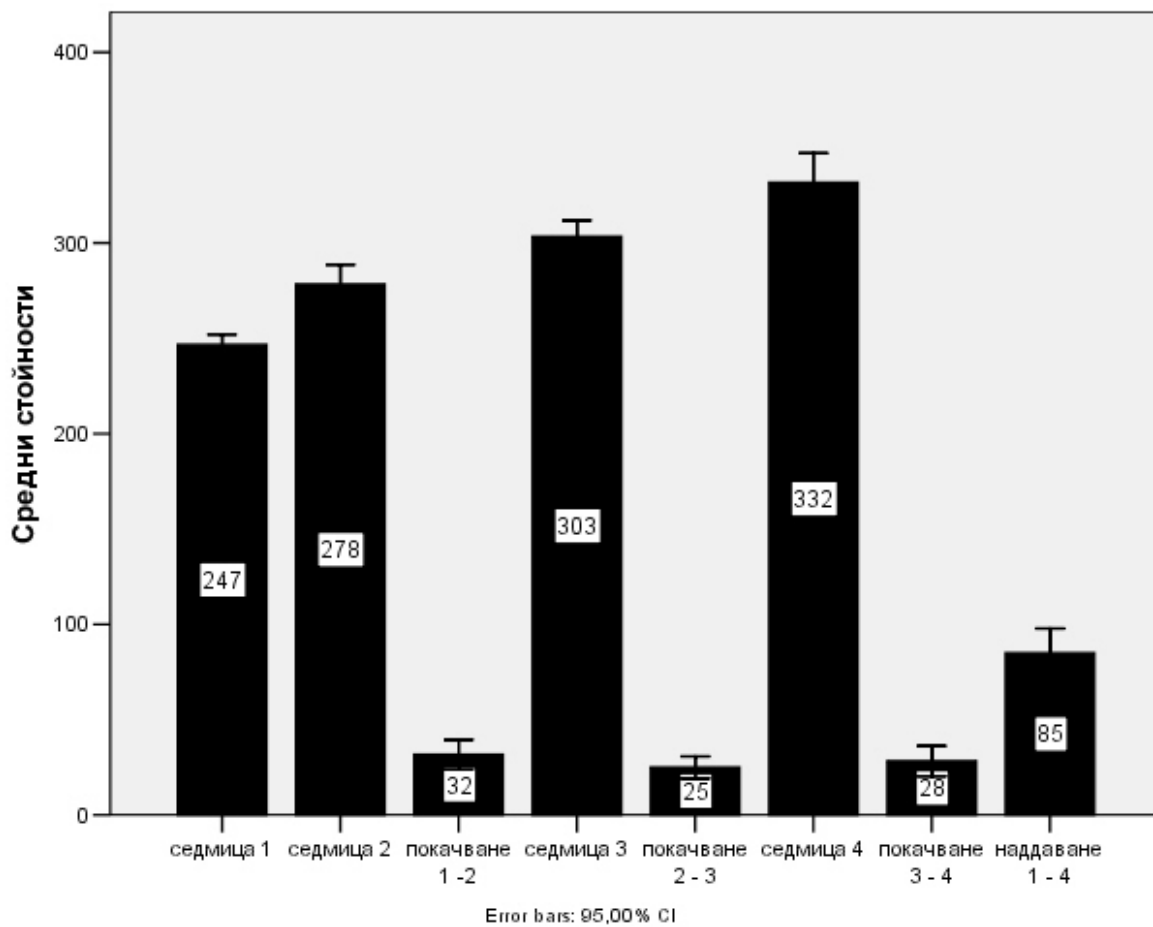
Метаболитната роля на щитовидната жлеза се определя чрез проследяване на динамиката на телесното тегло при мъжки плъхове порода Вистар (Фигури 4 а,б,в).



Фигура 4а. Телесното тегло (г) в динамика в групата с експериментално индуцирана хиперфункция на щитовидната жлезата.

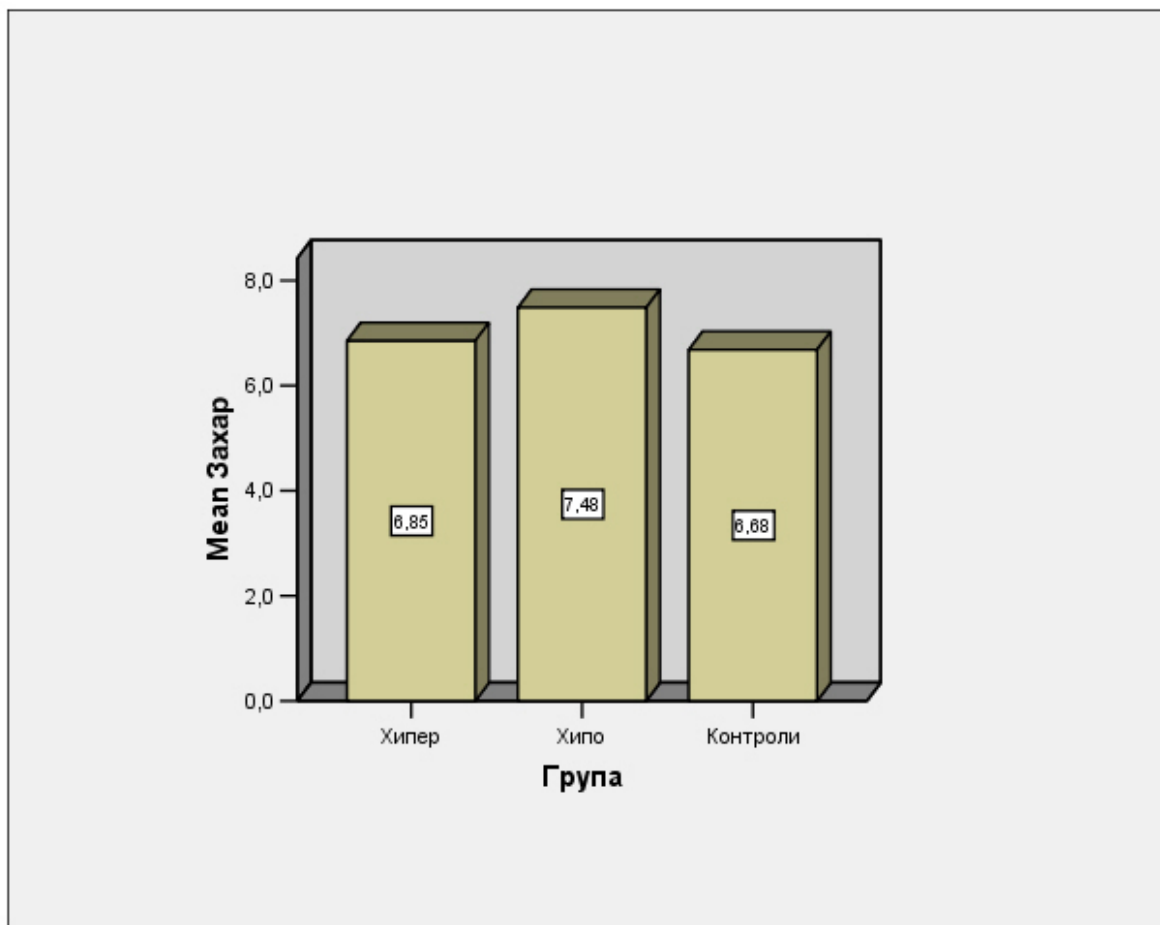


Фигура 4б. Телесното тегло (г) в динамика в групата с експериментално индуцирана хипофункция на щитовидната жлезата. Прилеждяване на средни стойности на теглото на база 4 седмично измерване.



Фигура 4в. Телесното тегло (г) в динамика в контролната група.

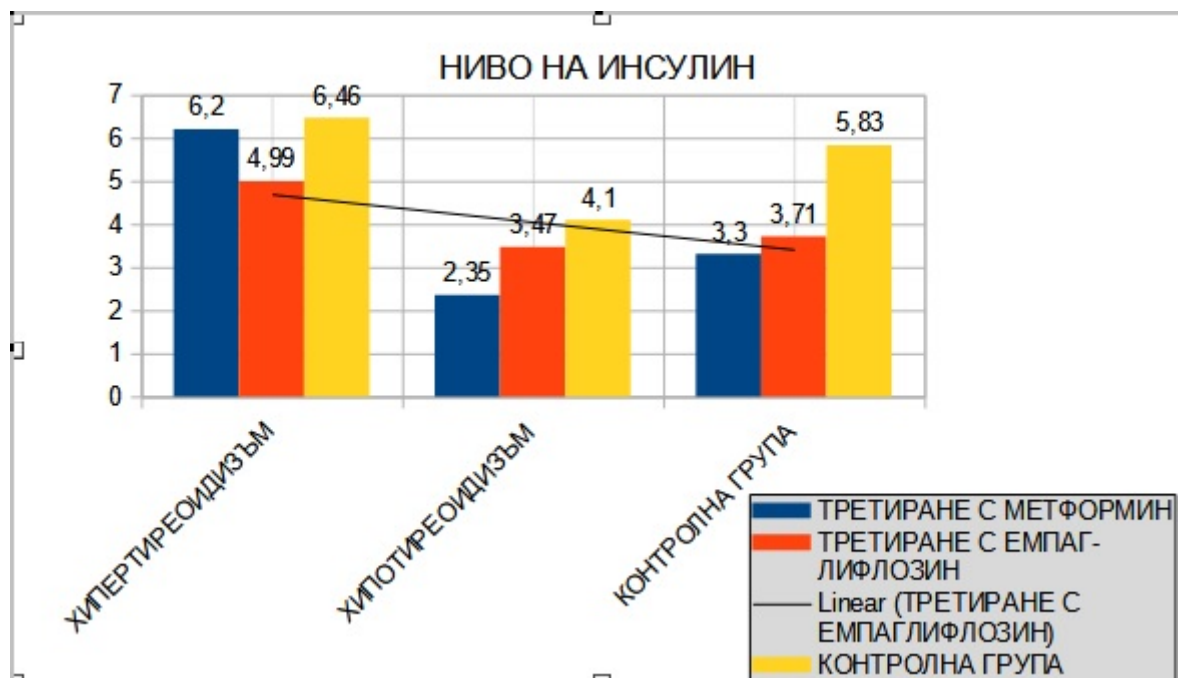
В допълнение се отчита разликата в телесното тегло, като се съпоставят отделните групи една спрямо друга (Фигура 4).



Фигура 6. Средни стойност на кръвната захар (mmol/l), измерена и сравнена за за трите групи. * $p < 0,1$.

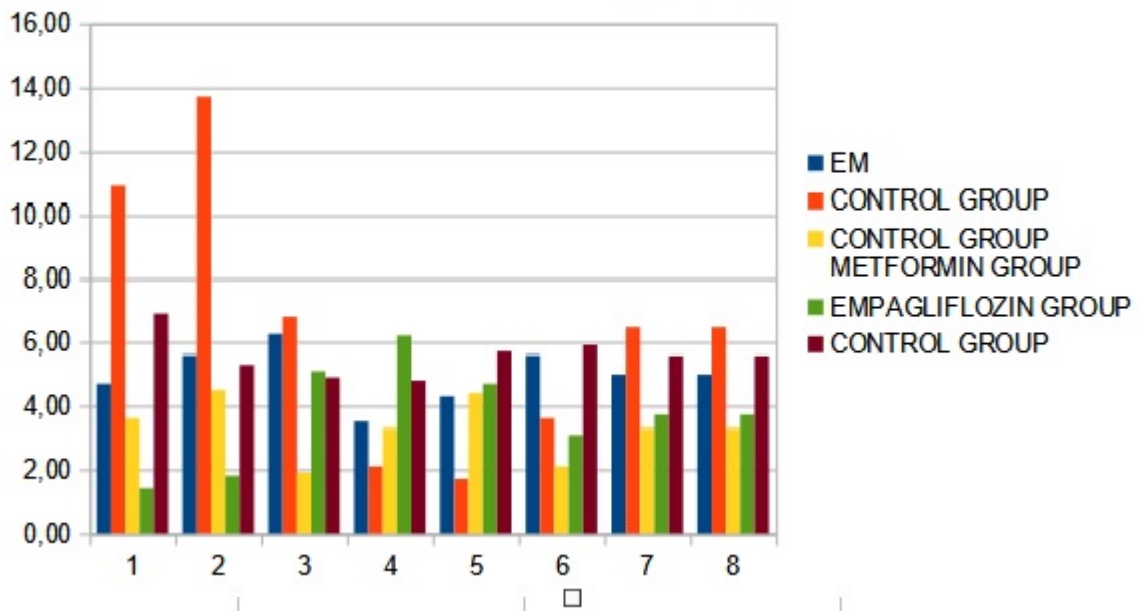
4. Резултати от инсулин (2 до 25 μ IU/ml)

Проследяване и оценка на стойностите на инсулин при трите експериментални модела плъхове с установена тиреоидна дисфункция. След доказване на тиреоидната дисфункция, експерименталните животни бяха разделени съответно на три групи, съобразно установените промени в тиреоидните хормони- група 1- мъжки плъхове порода Wistar третирани с Метформин, група 2- мъжки плъхове порода Wistar третирани с Емпаглифлозин, група 3- контролна група.



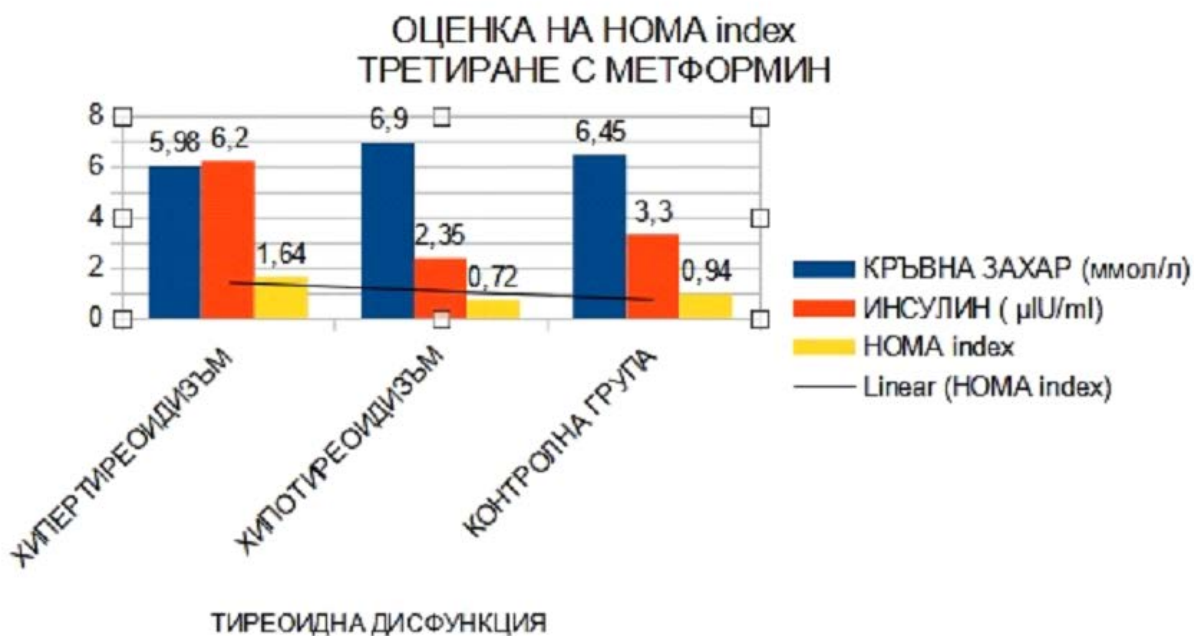
Фигура. 7 Средни стойности на инсулин за трите групи тиреоидна дисфункция. Средните стойности на имунореактивен инсулин в групата на експериментално индуциран хипертиреозидизъм и хипотиреозидизъм, показва сигнификантни отклонения в стойностите, спрямо третираните модели животни, * $p < 0.0$

НИВО НА ИНСУЛИН (2 до 25 $\mu\text{IU/ml}$)



Фигура 8 Средни стойности на инсулин ($\mu\text{IU/ml}$) при провеждане на терапия с Метформин и Емпаглифлозин.

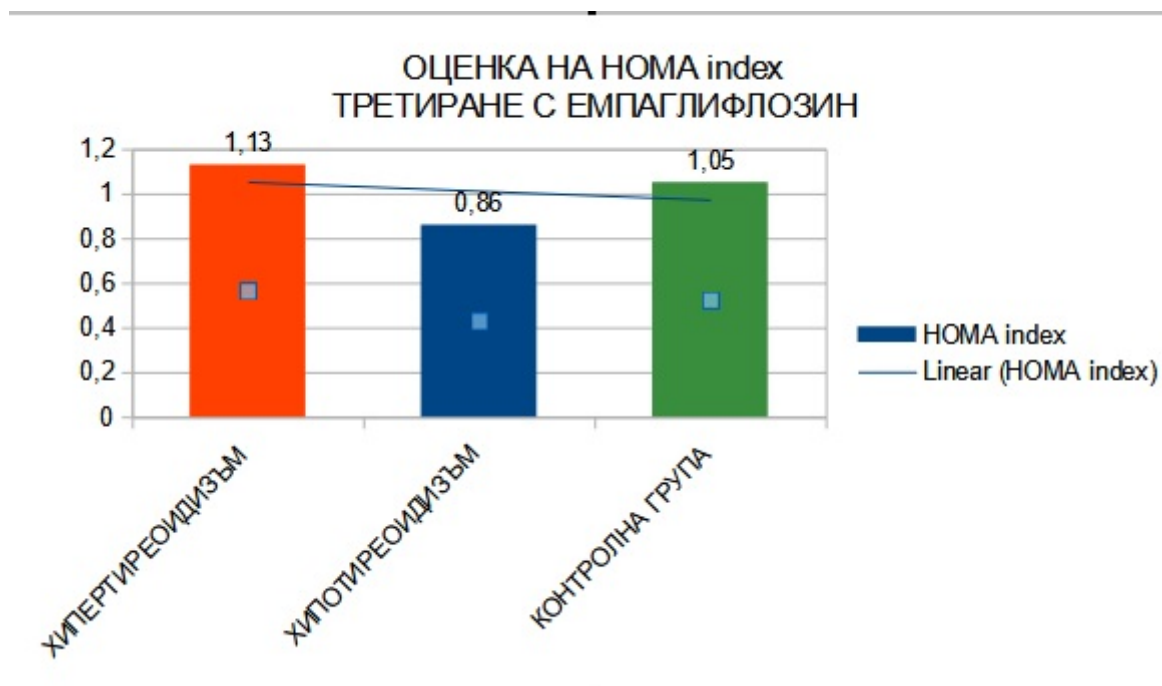
4. Ефект на Метформин върху НОМА index при мъжки плъхова порода Wistar



Фигура 9. НОМА индекс при трите групи тиреоидна дисфункция, след третиране с Метформин.

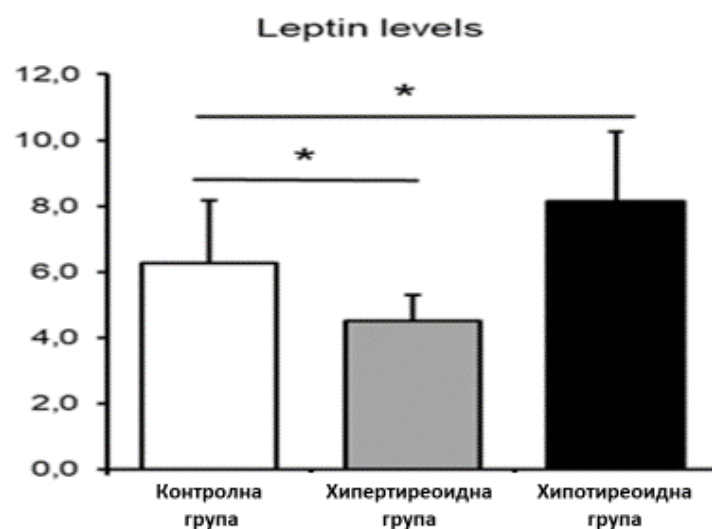
5. Оценка на НОМА index при мъжки плъхове Wistar с установена тиреоидна дисфункция и приложено третиране с Емпаглифлозин 5 мг. Проследени стойности на

кръвна захар, инсулин, използвани за изчисляване на НОМА индекс за отделните групи експериментални животни.

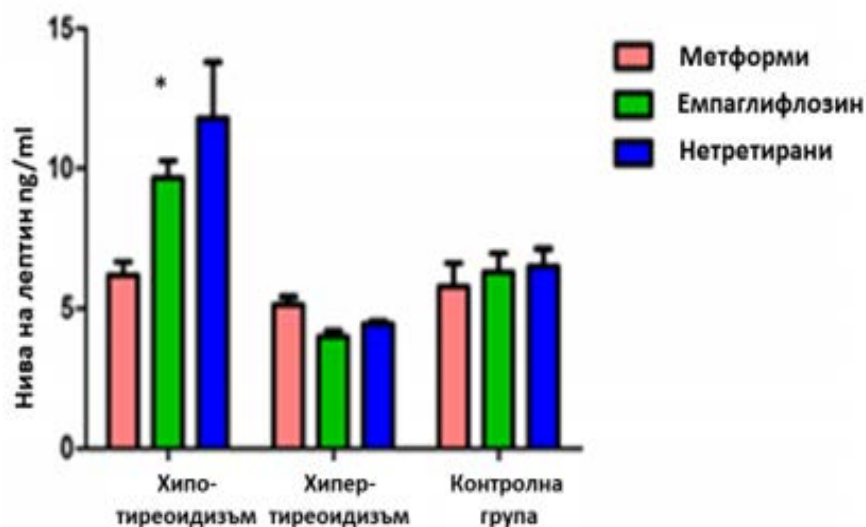


Фигура 10 Изчисляване на НОМА индекс въз основа на средни стойности на кръвна захар и инсулин на гладно. * $p < 0.1$.

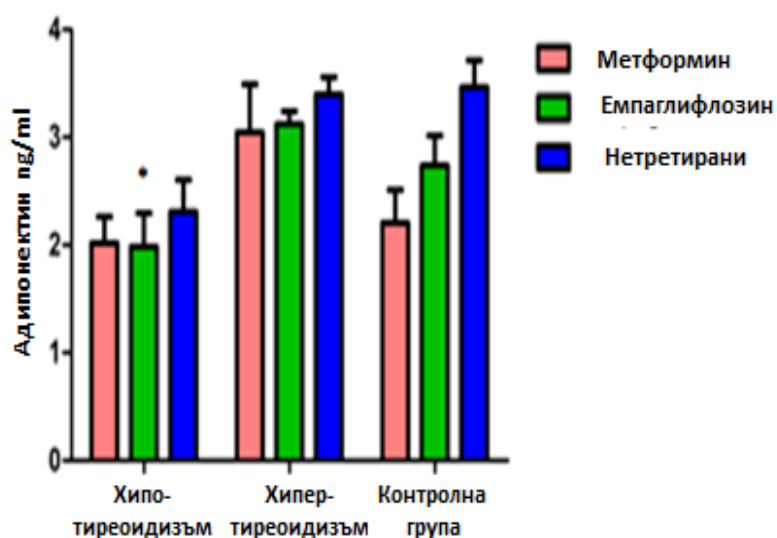
6. Проучване влиянието на метформин и емпаглифозин върху хормоните, които регулират метаболизма и апетита (адипонектин, лептин и грелин);



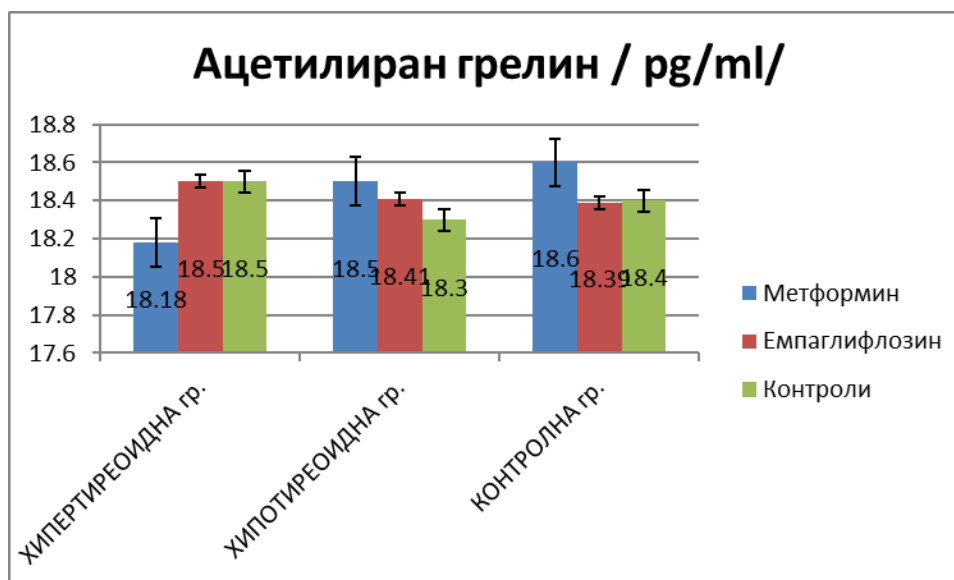
Фигура 12. Оценка на средни стойности на лептин за двете групи. Получените резултати от стойностите на серумен лептин показват статистически значими разлики за трите групи (* $p < 0.05$). Моделът показва, че в групата с експериментално индуциран хипотиреоидизъм има значително по-високи нива на лептин, спрямо останалите две групи.



Фигура 13. Нива на лептин в двете групи с тиреоидна дисфункция и контролна група, с приложена терапия с Метформин и Емпаглифлозин.



Фигура 14. Стойности на Адипонектин ($\mu\text{g/ml}$) в двете групи експериментални животни с тиреоидна дисфункция и контролна група, получили терапия с Метформин и Емпаглифлозин. Резултатите показват статистически значимо понижаване в стойностите на адипонектин при третираните животни, спрямо контролната група, $*p < 0.01$



Фигура 15. Оценка на стойностите на ацетилиран грелин /pg/ml/ при експериментален модел на мъжки плъхове Wistar с хипертиреοидна, хипотиреοидна и контролна група, третирани с метформин и емпаглифлозин.

2. Клинични изследвания

Научно-изследователският проект PREVIEW за превенция на захарен диабет тип 2 при лица с наднормено тегло и/ или затлъстяване и предиабет, финансиран от 7-ма Рамкова програма на Европейската комисия

2.1. Клинични данни от участниците в европейски проект PREVIEW

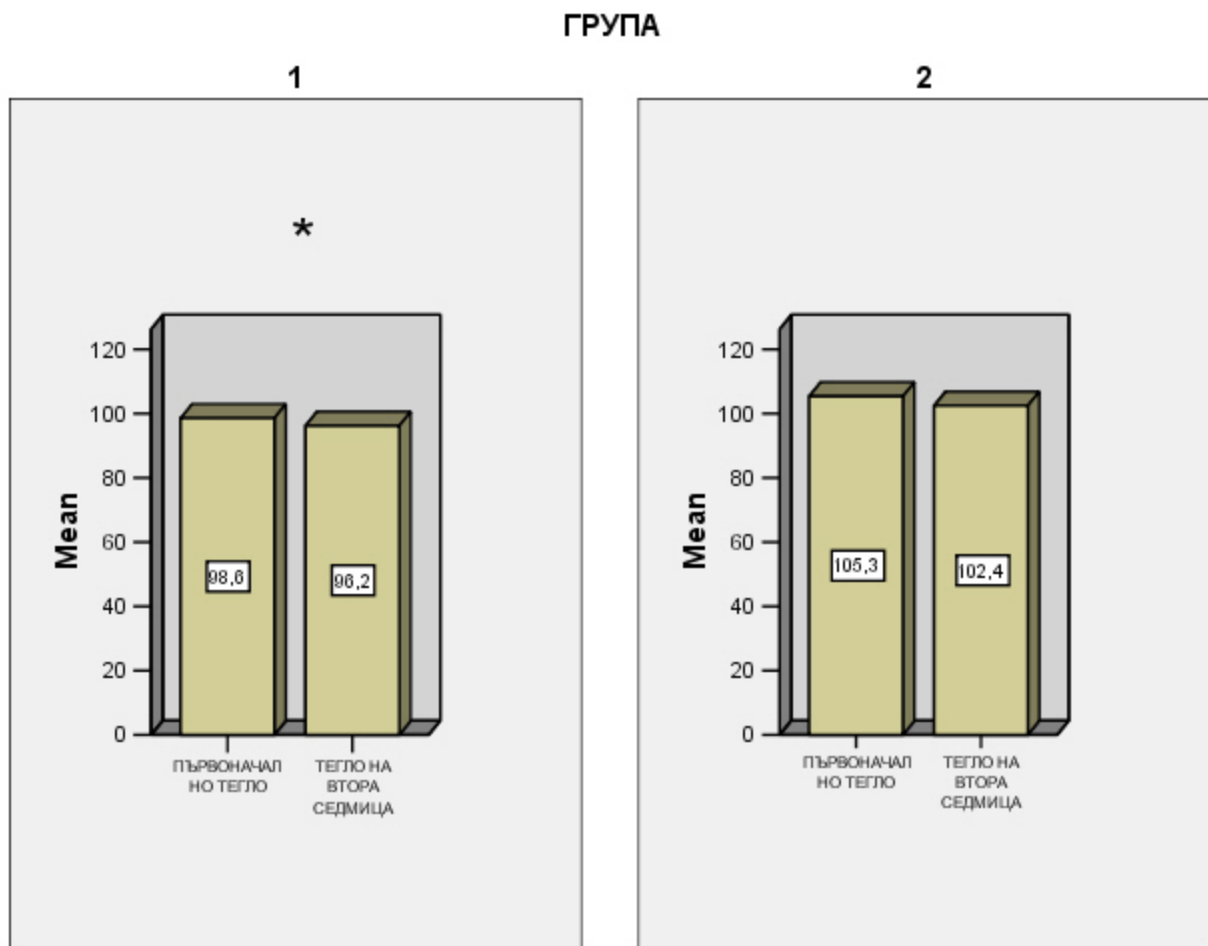
Проектът PREVIEW представлява рандомизирано, мултицентрово проучване, което има за цел да определи превантивният ефект върху честотата при предразположени към захарен диабет от втори тип, хора на средна възраст и възрастни (от двата пола) в предиабетно състояние, на фона на високопротеиновата и нискогликемична диета в комбинация с умерена или висока интензивност на физическа дейност.

Проектът се реализира в няколко международни центрове, като броя на рандомизираните пациенти за България е 368 души, разпределени по различна възрастова категория, които са представени на Таблица 8.

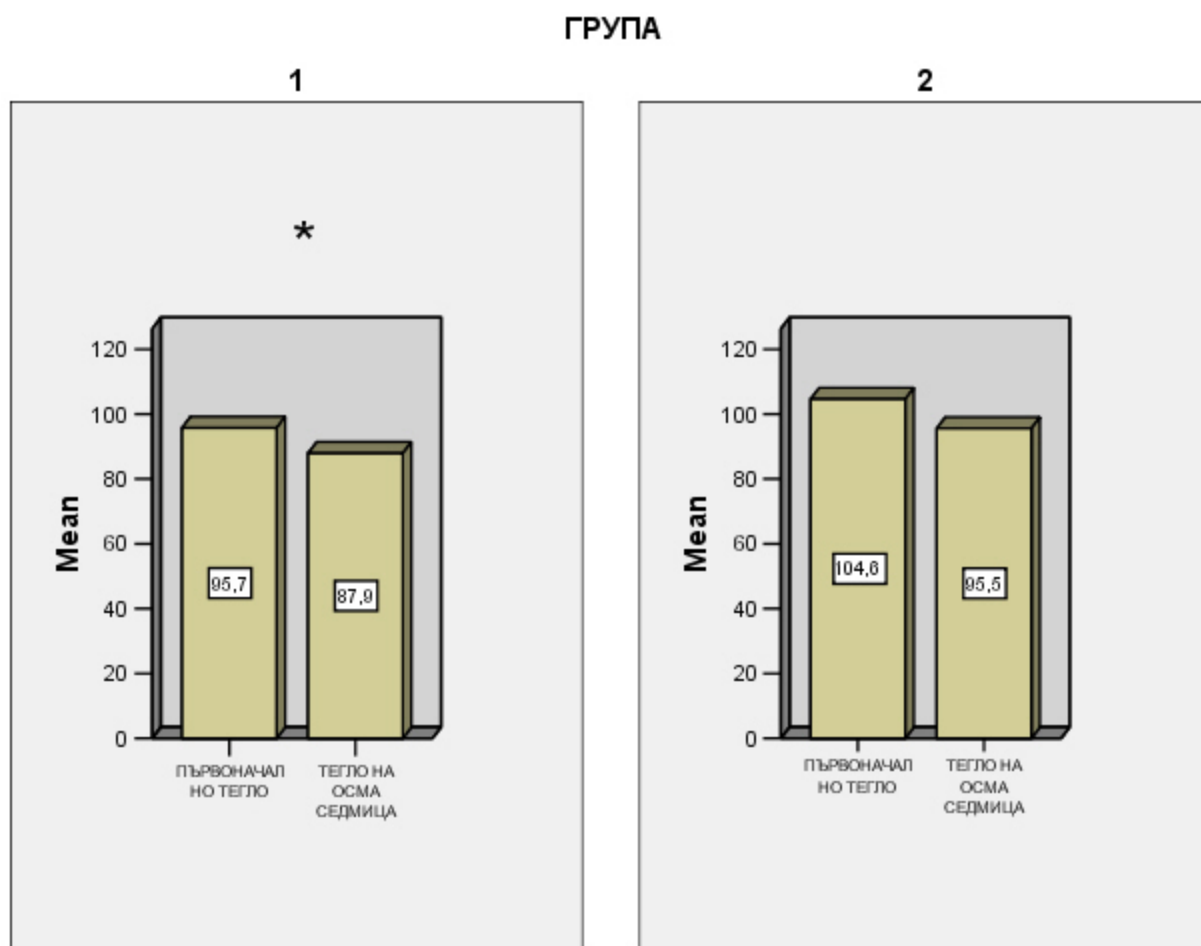
4.5.1 Проследяване редукцията на телесно тегло при пациенти с хипотиреоидизъм, съпоставени с контролната група (без хипотиреоидизъм). Представените резултати са за българската кохорта

От общия брой на рандомизираните пациенти, 22-ма са с хипофункция на жлезата. Проследяването на промените на динамиката в телесното тегло е на фона на хормонозаместителна терапия, с L-thyroxin, в различни μg , приемана от всички. Сравнително малкият брой на лицата с хипофункция на щитовидната жлеза се обяснява с това, че тази патология не е задължителен включващ критерий към изследването. Основните включващи критерии бяха предиабетно състояние и наднормено тегло/затлъстяване, на които всички рандомизирани участници отговаряха.

Нискокалорийният хранителен режим “Cambridge Weight Plan” продължи 8 седмици. Проследи се началното тегло, както и съответно теглото на втората седмица (Фигура 16) и осмата седмица (крайно тегло), (Фигура 17).



Фигура 16. Измерени стойности на телесното тегло (кг) на втората седмица от нискокалорийния хранителен режим. Легенда: 1-ва група- пациенти с лекуван хипотиреозидизъм; 2-ра група- контролна, без патология на щитовидната жлеза.

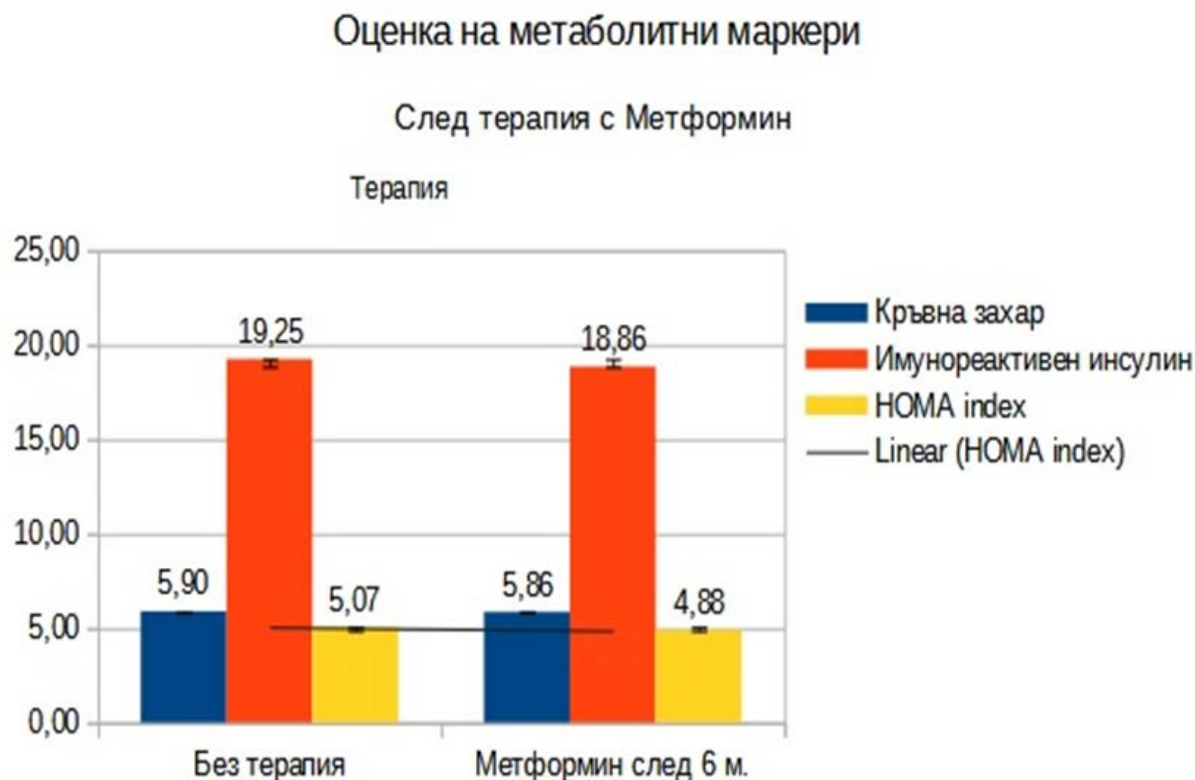


Фигура 17. Измерени стойности на телесното тегло (кг) на осмата седмица от нискокалорийния хранителен режим. Легенда: 1-ва група- пациенти с лекуван хипотиреозидизъм; 2-ра група- контролна, без патология на щитовидната жлеза; * $p < 0.005$.

2.2. Резултати от пациентите с еутиреодна функция на щитовидната жлеза, на фона на известно аутоимунно тиреодно заболяване.

Кохортите от пациентските групи са с оценка на метаболитни маркери на фона на доказано еутиреодно състояние на щитовидната жлеза за последните 6 месеца.

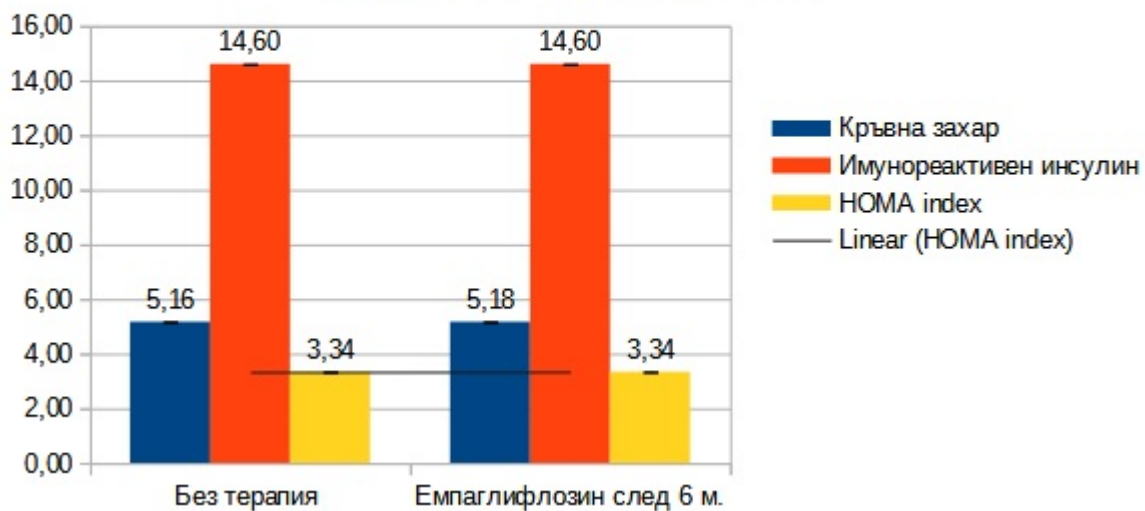
2.2.3. Проследяване на метаболитните показатели при пациенти със затлъстяване, еутиреоиден статус на щитовидна жлеза на фона на провеждано хормонозаместително лечение с левотиреоксин.



Фигура 18. Оценка на кръвна захар, имунореактивен и инсулин и НОМА index, при пациенти със затлъстяване и постигнат еутиреоиден статус на щитовидна жлеза на фона на заместително лечение с левотироксин. Провеждана терапия с Метформин в максимална дневна доза до 2500 гр.

Оценка на метаболитни маркери

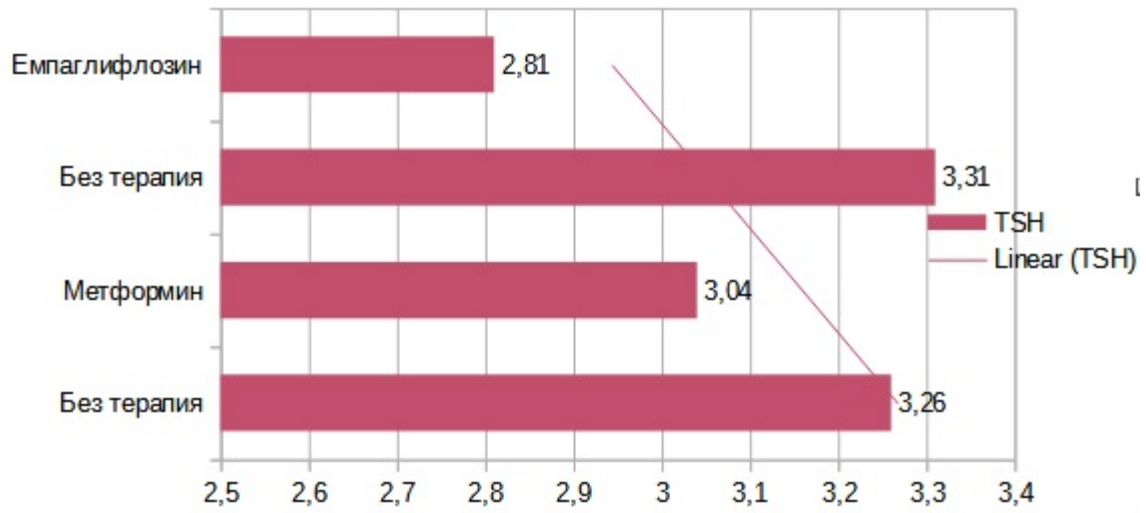
Проведена терапия с Емпаглифлозин



Фигура 19. Оценка на кръвна захар, имунореактивен инсулин и HOMA index, при пациенти със затлъстяване и постигнат еутиреоиден статус на щитовидна жлеза на фона на заместително лечение с Левотироксин. Провеждана терапия с Емпаглифлозин 10 мг.

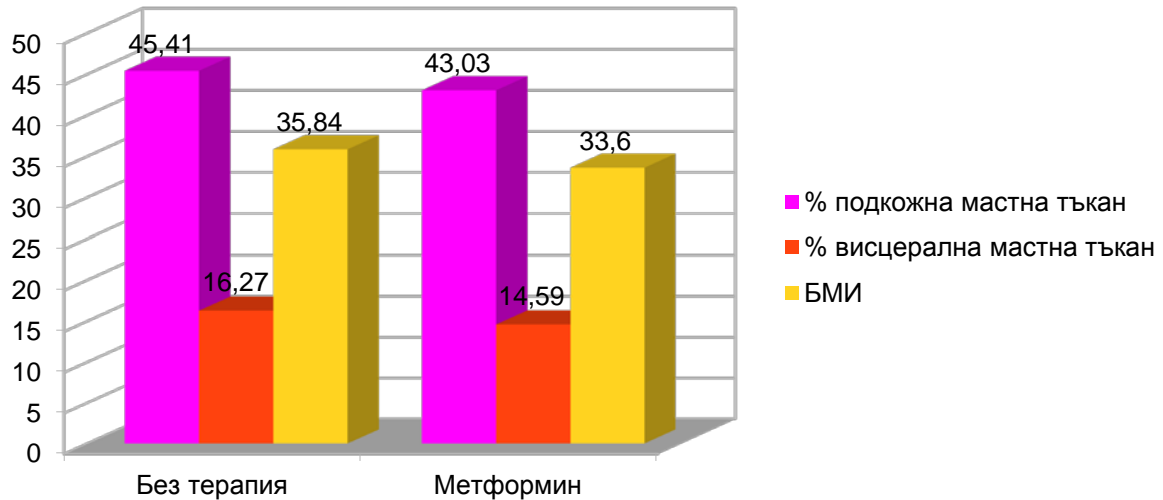
Оценка на TSH

Проследяване след прием на Метформин и Емпаглифлозин



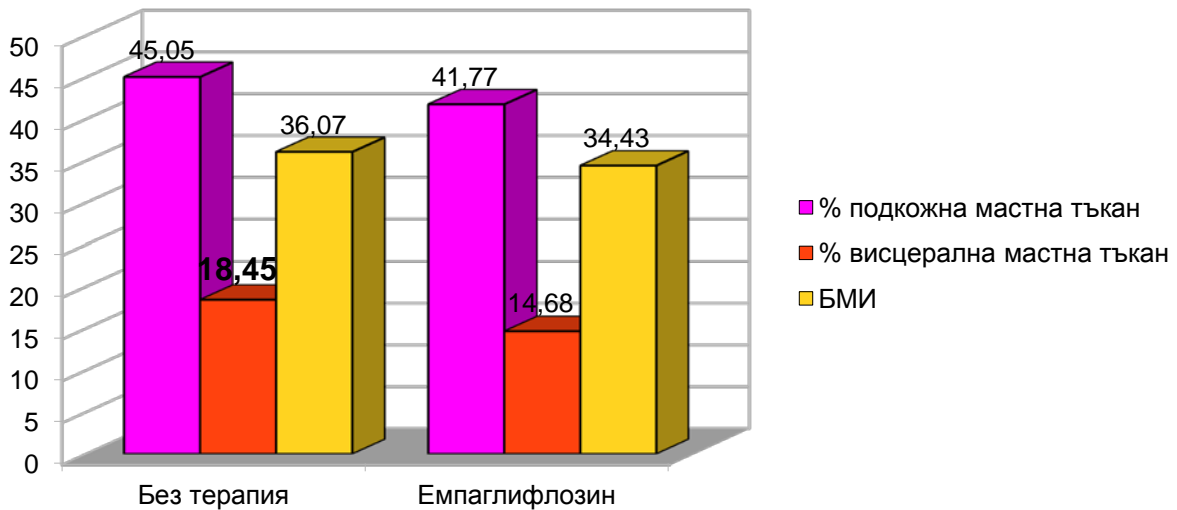
Фигура 20. Оценка на TSH при пациенти, провеждащо дългогодишно лечение с Левотироксин и добавена терапия с Метформин и Емпаглифлозин.

Анализ на телесен състав Биоелектричен импеданс



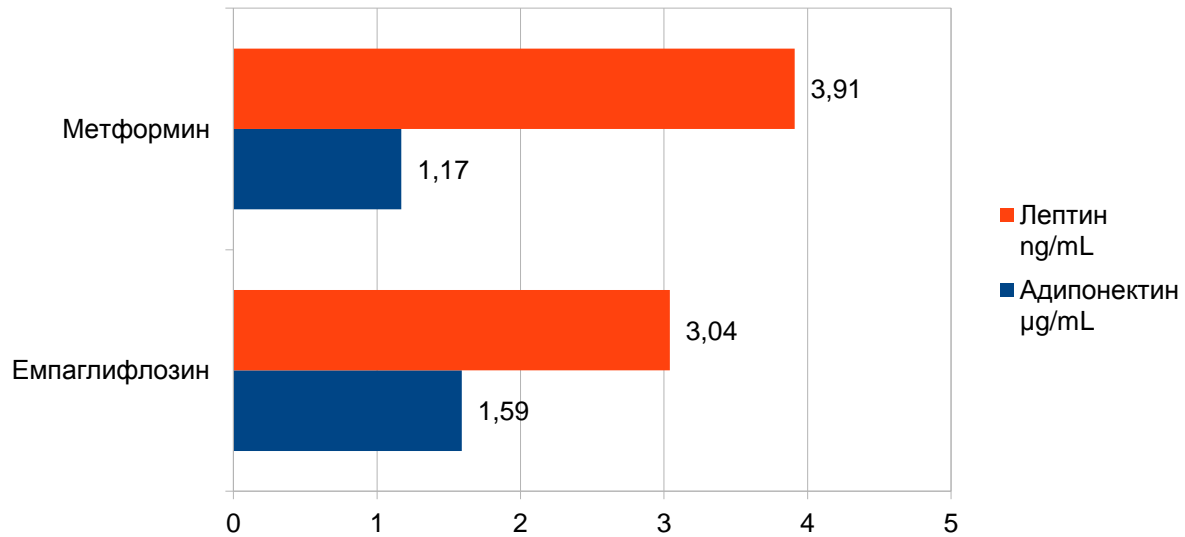
Фигура 20. Анализ на телесен състав при пациенти с проведена терапия с Метформин.

Оценка на телесен състав Биоелектричен импеданс



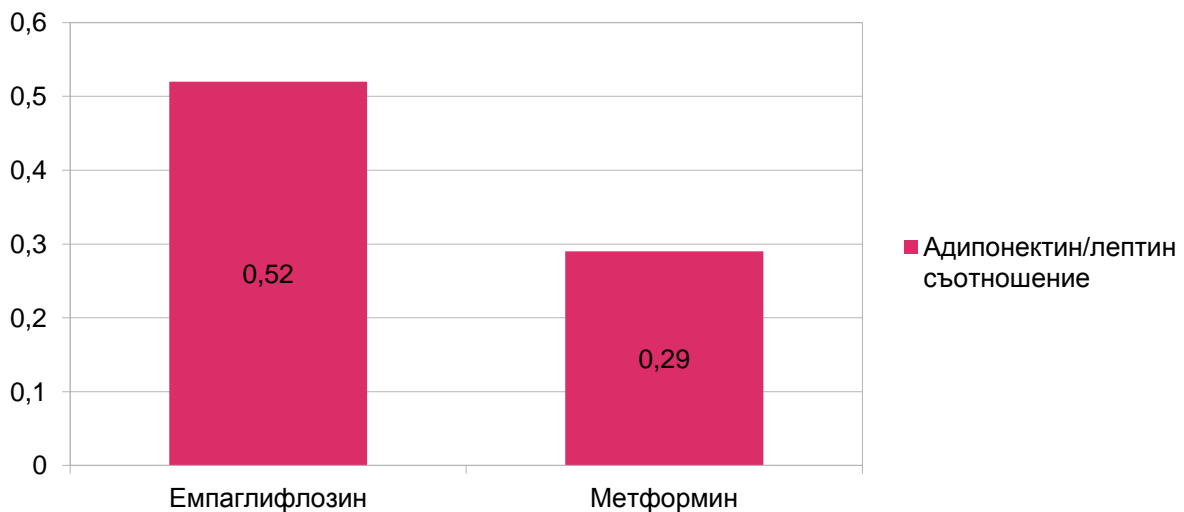
Фигура 21. Анализ на телесен състав при пациенти с проведена терапия с Емпаглифлозин. Средна стойност в % за оценка на подкожна мастна тъкан, висцерална мастна тъкан и БМИ, като метаболитни маркери за сърдечно-съдов с риск. Сигнификантна редукция в % висцерална група, * $p < 0.01$., в групата пациенти на терапия с Емпаглифлозин, спрямо контролната група.

ОЦЕНКА НА ЛЕПТИН И АДИПОНЕКТИН Терапия с Метформин и Емпаглифлозин



Фигура 23. Оценка на лептин и адипонектин при проведена терапия с Метформин и Емпаглифлозин, * $p < 0.05$

ОЦЕНКА НА СЪОТНОШЕНИЕТО АДИПОНЕКТИН/ЛЕПТИН Пациенти с метаболитен синдром и еутиреоиден статус



Фигура 24. Оценка на съотношението адипонектин/лептин при пациенти със затлъстяване и еутиреоиден статус на щитовидна жлеза, * $p < 0.05$.

3. Регулация на апетита и метаболизма при лица с високостепенно затлъстяване след бариатрична хирургия, финансиран от Грант-2018, договор № Д-70

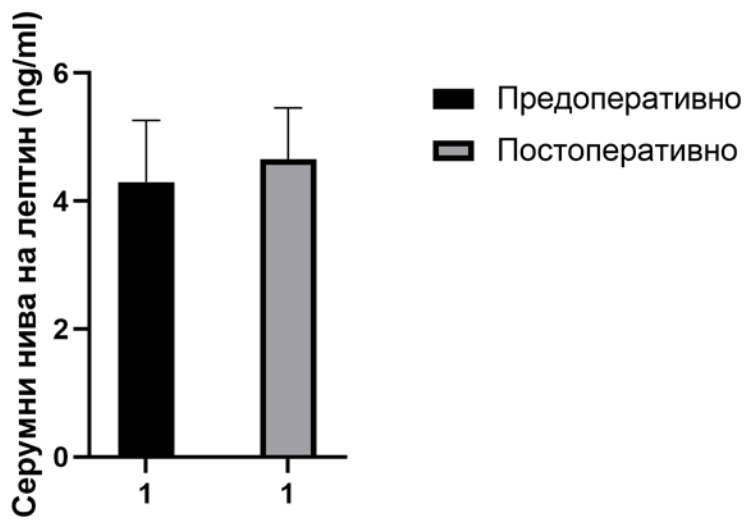
На таблица 9 са представени характеристиките на пациентите преди бариатричната интервенция.

| | |
|--------------------------|---|
| Пол | Мъже (n=11) Жени (n=9) |
| Възраст | 38.7±2.5 |
| Тегло (кг) | 155±6.1 |
| Ръст (см) | 174±2.4 |
| ИТМ (кг/м ²) | 51.2±1.3 |
| Вид на операцията | Ръкавична резекция (n=2) Стомашен байпас (n=13) Мини байпас (n=5) |

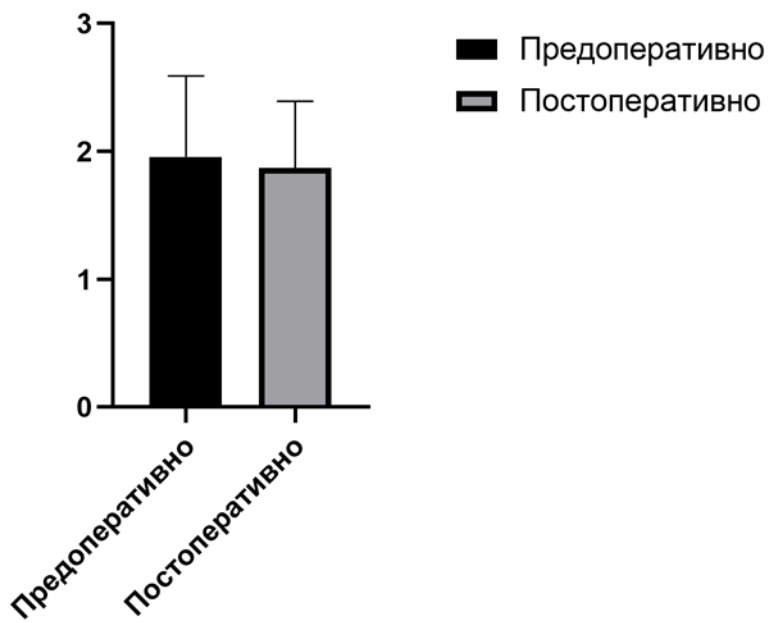
Таблица 9. Основни характеристики на пациентите (n=20)

Данните са представени като средна стойност ± стандартна девиация. Легенда: ИТМ, индекс на телесна маса.

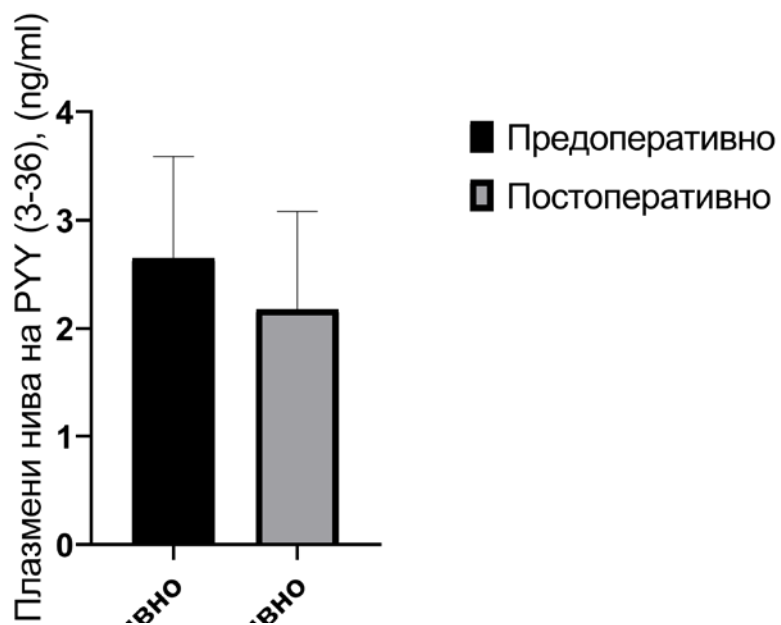
Получените резултати при пациенти след проведена бариатрична процедура отчитат промяна в плазмените/ серумни нива на хормоните, регулиращи апетита, На първия месец след бариатрична интервенция нивата на лептин в кръвта се повишават, докато на адипонектин намаляват (Фигури 25 и 26).



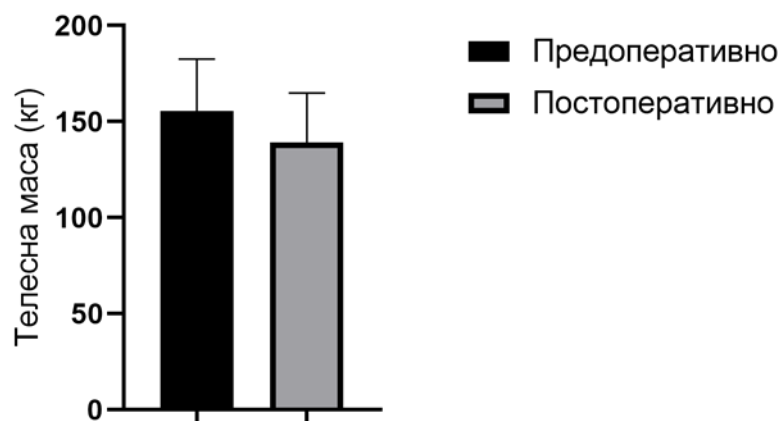
Фигура 25. Серумни нива на лептин преди и след операцията.



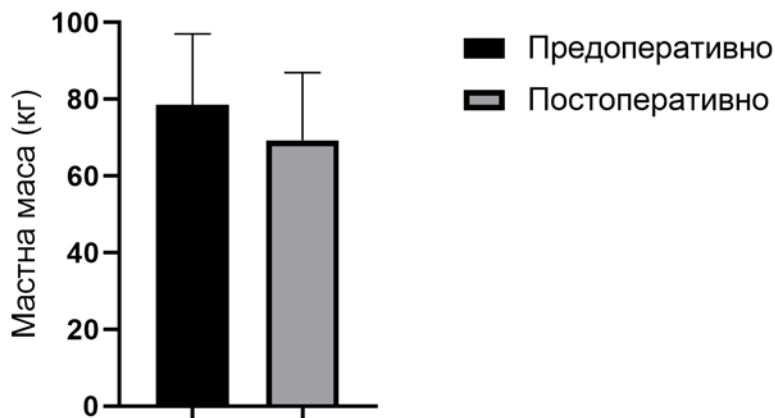
Фигура 26. Серумни нива на адипонектин преди и след операцията.



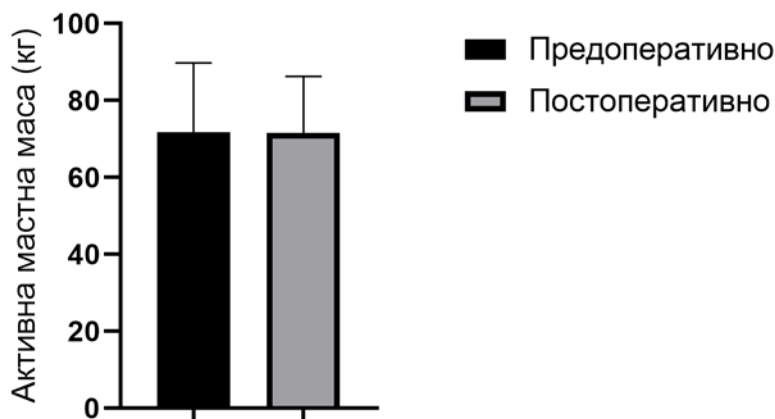
Фигура 27. Плазмени нива на PYY (3-36) преди и след операцията.



Фигура 28. Телесна маса (кг) преди и след операцията.



Фигура 29. Масна маса (кг) преди и след операцията. От данните се отчита редукция а на тегло е средно 15 кг на първия месец, което подкрепя данните в литературата



Фигура 30. Активна масна маса (кг) преди и след операцията. Интересен е фактът, че в този ранен следоперативен период не се наблюдава промяна в активната масна маса в сравнение преди операцията

ДИСКУСИЯ

Патологичните промени на щитовидната жлеза се увеличават през последните десетилетия, като се диагностицират както хипотиреоидни, така и хипертиреоидни

състояния на нейната функция. Настоящото проучване представя експериментални и клинични изследвания върху промените на три хормона – лептин, грелин и адипонектин при експериментално създаден хипотиреоидизъм и клинично доказани при пациенти хипотиреоидизъм и хипертиреоидизъм. Фармакологичните проучвания с метформин и емпаглифлозин представят ефектите на веществата, както върху показатели на телло и обмяна, върху метаболитни маркери, така и върху посочените хормони на пациенти с различен тиреоиден статус. Резултатите документират, че двете фармакологични средства повлияват, както тиреоидния статус и маркери за метаболизъм, така и нивата на лептин, адипонектин и грелин. За първи път се документира ролята на баланса между посочените 3 хормона като маркер за ефективно лечение на тиреоидна патология при затлъстяване. В допълнение, извършените изследвания на метаболизъм и хормонални промени при хора със затлъстяване преди и след бариатрична хирургична интервенция очертават възможност да се дискутира значението на хормоналните изследвания на лептин и адипонектин за оценка на ефективността на оперативното лечение.

Затлъстяването е метаболитно нарушение, което се превръща в пандемия през последното десетилетие. При пациенти със затлъстяване се доказват различни по степен хормонални промени. Водещите изменения са при трите хормона - адипонектин, лептин и грелин. В настоящото научно проучване се фокусира върху посочените хормони и влиянието на фармакологични средства върху механизмите на затлъстяване. Водещо при затлъстяване е доказаното увеличаване на мастната тъкан и са представени намерените степени на промени при различни пациенти. Ние фокусираме върху хормона адипонектин, защото е доказано, че ендокринната функция на мастната тъкан е свързана със секрецията на адипокините – представител **адипонектин**. Този хормон е известен още като адипоцит комплемент-свързан протеин 30 kDa (Adipocyte complement-related protein of 30 kDa) (Spranger, 2003 #6). Адипонектинът представлява адипоцит-специфичен протеин с роля в глюкозната и липидна хомеостаза. Адипонектинът регулира метаболизма чрез рецепторен механизъм на действие. Доказани са две основни групи рецептори за хормона: AdipoR1 и AdipoR2. AdipoE1 се експресира предимно върху скелетната мускулатура, докато AdipoR2 се намират

предимно в черния дроб (82). Ние установихме промени в нивата на адипонектин при пациенти със затлъстяване. Терапията с метформин и емпаглифлозин понижи нивата на адипонектин.

Научните изследвания върху адипонектин в експерименти върху плъхове с модели на тиреоидна патология демонстрират, че при индуцираните хипофункция и хиперфункции на щитовидната жлеза се отчитат изменения на адипонектин. Тези изменения корелират с промени в показателите за тегло, тиреоидна функция, кръвна захар, инсулин в серум, НОМА индекс. Третирането на животните с метформин и емпаглифлозин понижава повишените нива на кръвна захар в динамика, намалява инсулиновата резистентност, нормализира кръвен адипонектин със стойности близки до тези на контролната група. Нашите резултати демонстрират, че при експериментален модел на хипотиреоидизъм на мъжки плъхове се намалява нивото на адипонектин, което се повишава след третиране с двете фармакологични средства (метформин и емпаглифлозин). Изследванията върху плъхове с експериментален хипертиреоидизъм документират повишени нива на адипонектин. Метформин и емпаглифлозин не промениха статистически значимо адипонектин в кръвта на плъхове с хипертиреоидизъм.

Лептин е важен хормон в регулация на апетит и метаболизъм. Задачи на настоящите научни изследвания са да се определи ролята на лептин в механизмите на нарушена тиреоидна функция и при затлъстяване. Експерименталните изследвания върху мъжки плъхове с хипотиреоидизъм показват увеличаване на кръвните нива на лептин. При създаване на експериментален модел на хипертиреоидизъм беше установено намаляване на лептин в динамика в сравнение с контролната група животни. Третирането с метформин и емпаглифлозин предизвика различни по степен промени. Посочените резултати от настоящите експериментални изследвания утвърждават ролята на хормон лептин в регулация на функции на щитовидната жлеза. Изследванията с две фармакологични средства документират промените, които могат да се очакват в регулационните механизми на лептин и тиреоидна функция. Нашите резултати корелират с данни в литературата (75, 77, 78 и др.) за ролята на лептин в регулация на ендокринни функции.

Проучванията върху грелин са задачи на настоящите експерименталните и клинични изследвания. Известно е, че грелин е пептиден хормон. (85). Грелинът води до увеличаване на мастната тъкан като намалява окислението на мазнините (81, 84). Той има отношение към стимулирането на чревния мотилитет и стомашното изпразване, което определя освен наличието на централни механизми на действие, така и на локални ефекти на хормона (86, 89). Резултатите от изследвания на ацетилиран грелин в кръв на мъжки плъхове с експериментален модел на хипертиреозидизъм демонстрират повишени нива на грелин. Няма статистически значими промени в ацетилиран грелин при плъховете с експериментален модел на хипотиреоидизъм. Третирането с метформин и емпаглифлозин предизвика повишаване на грелин и достигане на стойностите за контролната група плъхове. Няма статистически значими промени на грелин при плъховете с експериментален хипотиреоидизъм под влияние на метформин и емпаглифлозин.

Клиничните изследвания върху грелин документират промени при пациенти със затлъстяване. За първи път нашите резултати документират ролята на баланс между лептин и грелин в механизмите на затлъстяване и нарушена тиреоидна функция. Новост в литературата са намерените промени в баланс между лептин и грелин под влияние на метформин и емпаглифлозин при пациенти със затлъстяване. За първи път демонстрираме с резултати оценка на съотношението адипонектин/лептин при пациенти със затлъстяване и еутиреоиден статус на щитовидна жлеза.

Фармакологичното средство емпаглифлозин, което е от съвременна група антидиабетични орални лекарства е изследвано както експериментално, така и клинично за влияние върху хормоналния статус и метаболизъм при тиреоидна патология, като резултатите са в представените научни проучвания. Емпаглифлозин е към новите класове антидиабетни медикаменти от групата на SGLT 2 инхибиторите (sodium-dependent glucose co-transporter 2). Новите проучвания показват грелин в кръвта на пациенти със затлъстяване и захарен диабет тип 2 (114). Посоченият ефект се дължи на основния механизъм на групата медикаменти, която постига нормогликемичния ефект чрез повлияване на глюкозната реабсорбция в проксималните

бъбречни тубули, с което се осигурява екскрецията на около 75 гр. глюкоза, равняващо се на приблизително 300 kcal/дн. Рандомизираните клиничните проучвания показват, че средната редукция на телесно тегло при пациенти, приемащи медикаменти от групата на SGLT 2 инхибиторите сравнени с плацебо, е между 2 и 3 кг. (115). Данните от клиничните проучвания в реалната клинична практика показват още по-съществена редукция от до 4.6 кг. в групата на дапаглифлозин, при 90-дневно проследяване (116).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделите на експериментално индуцираните хипофункция и хиперфункция на щитовидната жлеза са подходящи за изследване на метаболитните промени, които са резултат от патологията на щитовидната жлеза. Отчита се разлика в промяната на теглото в дадения едномесечен период за трите групите плъхове. При сравняването на плъховете с хипофункция, хиперфункция и контролите, се отчита несъществена разлика в покачването на телесното тегло. Очакваната разлика в теглото на експерименталните животни не е толкова демонстративна, което се обяснява с краткия период, през който животните са подложени на патологично ефект на дисфункцията на щитовидната жлеза.

Групата с хипофункция на жлезата показва стойности, некорелиращи с доказаните при хипотиреоидизъм по-ниски стойности на кръвната захар. Вероятно този феномен се дължи на факторите на средата (сезонност, промяна в температурата).

Бариатричната хирургия е единственият доказан метод за дългосрочно лечение на болестното затлъстяване, довеждащ до значително намаляване както на смъртността, така и на риска от развитие на придружаващи хронични заболявания. Съществуват различни видове бариатрични операции, които се пролагат по настоящем. Най-честите са тези хитургични интервенции, които използвахме и при нашите пациенти: ръкавична резекция, Roux-Y-стомашен байпас и мини байпас. Към момента няма точни критерии на избор на определен вид операция при конкретния пациент с доказателствата в полза на някоя от тях. Лапароскопските техники се определят за стандарт в тази област.

Традиционно се смята, че в основата на механизма на действие на бариатричните операции стоят рестрикцията на калорийния прием, малабсорбцията на хранителните вещества и комбинацията от двете. Всъщност, вече е съвсем ясно, че регулирането на теллото на централно ниво се влияе значително от хормони, които се секретират от стомашно-чревния тракт (грелин, GLP-1, PYY 3-36) и от мастната тъкан, т.нар. адипокини (лептин и адипонектин). Пациентите след бариатрична хирургия, независимо от избора на операция, съобщават за променен апетит и намален глад, най-вероятно поради промяна в горе-посочените хормони. Нашето изследване показва повишени нива на лептин и понижени нива в кръвта на адипонектин, GLP-1 и PYY (3-36), без промяна на нивата на грелин след първия месец след бариатрична интервенция. Резултатите не потвърждават данните в литературата, според които лептин и грелин намаляват, а останалите хормони като адипонектин, GLP-1 и PYY (3-36) се повишават. Ние считаме, че това се дължи на малката бройка пациенти (общо 20) и на ранния период след операция. На първия месец след такава хирургична интервенция установихме средна редукция на телесната маса с 15 кг, промяна в мастната маса и запазване на активната мастна маса. Тези промени в телесния състав не водят до промени в регулацията на апетита в този ранен постоперативен период в нашата кохорта от пациенти.

В заключение: Бариатричната хирургия води до редукция на телесна маса още в ранния постоперативен период. Промените в телесния състав не водят до промени в орексигенните и анорексигенни хормони на първия месец след хирургичната интервенция. Най-вероятно редукцията на телло се дължи на намаления калориен прием, а не на промяната в ситостта, респ. чувството на глад. Бъдещите изследвания трябва да бъдат фокусирани върху дългосрочните ефекти на бариатричната хирургия както върху теллото и телесния състав, така и върху метаболитните промени, свързани с регулацията на апетита и глада.

ИЗВОДИ

1. Разработени са и внедрени за целите на проучванията два експериментални модели на нарушена функция на щитовидната (хипо- и хиперфункция) чрез прилагане на фармакологични средства.

2. Доказани са промени във въглехидратната обмяна на мъжки плъхове с патолгични нарушения на функцията на щитовидната жлеза.
3. Установени са повишени нива на лептин в кръвна плазма на плъхове с експериментален модел на хипотиреозидизъм.
4. Определени са промените в плазмените нива на лептин на плъхове с експериментален хипертиреоидизъм. Хроничното въвеждане на тироксин на мъжки плъхове намалява плазмения лептин.
5. За първи път се демонстрират данни от системно проучване върху българи със затлъстяване и предиабет относно функцията на щитовидната жлеза и ефектите на нефармакологични средства- хранителна диета и физическа активност.
6. Резултатите от клиничните изследвания дават основание да се допусне ролята на нарушената функция на щитовидната жлеза в развитието на предиабет със затлъстяване.
7. Получените резултати при изчисляване на съотношение адипонектин/лептин, показват, че при групата на мъжки плъхове корелират с повишен сърдечно-съдов риск. Включването на фармакологични средства- Емпаглифлозин и метформин, демонстрират ефект върху сърдечно-съдовия риск.
8. Съотношението адипонектин/лептин е надежден биомаркер на адипозната дисфункция, който може и да бъде съотнесен към промени в тиреоидната секреция.
9. Ниското ниво на съотношението адипонектин/лептин, като стойност дава оценка на повишените проинфламаторни фактори, отнасящи се в патогенезата на затлъстяването. Този показател има потенциал да се използва като важен биомаркер за оценка на сърдечно-съдовия риск при проучването на нови фармакологични стратегии в лечението на затлъстяването.
10. Бариетричната хирургия има доказан ефект върху редуцията на телесно тегло в ранния следоперативен период. Комбинирането му с нови фармакологични средства може да доведе до дългосрочно намаляване на сърдечно-съдовия риск, което лесно може да бъде оценяване чрез проследяване стойностите на адипонектин/лептин съотношението.

Публикации, свързани с дисертационния труд

1. Mironova D., T. Hanjjeva-Darlenska "Effect of metformin and empagliflozin on adiponectin and leptin levels in rat model of hypo- and hyperthyroidism", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35:1, 208-213, DOI: 10.1080/13102818.2020.1865200

2. Миронова Д, Ханджиева-Дърленска. Регулация на апетита и контрол на телесното тегло след бариатрична хирургия, Наука ендокринология, 2/2019.

3. Миронова Д, Ханджиева-Дърленска Т. Роля на хормоните лептин, адипонектин и грелин в патогенезата на инсулиновата резистентност, Наука Ендокринология, 3, 2016.

4. Миронова Д, Григоров Е, Ханджиева-Дърленска Т, Емпаглифлозин - нов клас антидиабетен медикамент за лечение на захараен диабет тип II, съпроводен със затлъстяване, Медицински преглед, под печат.

VII. Проекти, свързан с дисертационния труд

• Проект №-Д, 2018 от конкурса на МУ-София, ГРАНТ-2018, на тема: „Регулация на апетита и метаболизма при лица с високостепенно затлъстяване след бариатрична хирургия“. Водещ изследовател: доц. д-р Т. Ханджиева-Дърленска; Участник в научния колектив: д-р Д. Миронова

• Проект №7-Д, 2016 от конкурса на МУ-София, ГРАНТ-2016, на тема: " Роля на хормоните лептин, адипонектин и грелин в механизмите на инсулинова резистентност при хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза". Водещ изследовател: доц. д-р Т. Ханджиева-Дърленска; Участник в научния колектив: д-р Д. Миронова

VIII. Участия в конгреси, свързани с дисертационния труд

• 6th Congress of Pharmacy 13-16 октомври 2016, Постер на тема: "Ефект на Емпаглифлозин върху телесното тегло на мъжки плъхове порода Wistar с експериментално индуциран хипотиреоидизъм"

• International Congress of Medical Sciences (ICMS) 2016, 12.05-15.06.2016, постер: „Experimental model of hypothyroidism in male Wistar rats"

• Конгрес на Българска Диабетна Асоциация- 3-5.06.2016, презентация: "Роля на серумния грелин при метаболитен синдром"

- II Националният конгрес за млади гастроентеролози; 25.03 и 26.03.2015 в УМБАЛ „Царица Йоанна-ИСУЛ“, "Роля на серумния грелин при пациенти с хипофункция на щитовидната жлеза и като маркер на атрофичен гастрит при пациенти с персистиращи антитела, насочени срещу париеталните клетки"

IX. Курсове, в които д-р Миронова е обучавана и са свързани с дисертационния труд

- Лятно училище по проект Preview, 23-24.08.2016, Сан Себастиен
- Обучение на тема "Захарен диабет и затлъстяване", Залцбург, Австрия, 14.05-21.05.2016
- Лектор с презентация; BA EU EAST AND SOUTH OBESITY EXPERT PANEL MEETING, Warsaw (Poland), Improvement of female reproductive outcomes after Liraglutide application BA EU EAST AND SOUTH OBESITY EXPERT PANEL MEETING, Warsaw (Poland), Clinical case report lecture
- Презентация с постерна сесия- Certificate of attendance. Poster session participation. European Congress of Obesity 2019, Glasgow (Scotland)
<http://eco2019.org/>. Leptin/Adiponectin ratio alterations in male Wistar rats with hypothyroidism after SGLT2 inhibitors application.
- Certificate of attendance. Poster session participation 25th European Congress on Obesity, Vienna (Austria), <https://eco2018.easo.org/>. Poster session presentation: Hypothyroidism leads to leptin alterations in male Wistar rats Hypothyroidism leads to leptin alterations in male Wistar rats“

ЛИТЕРАТУРА

1. Ch Daein, Ch Seulggie, Sik Joung Son, Impact of Discrepancies in General and Abdominal Obesity on Major Adverse Cardiac Events, Journal ListJ Am Heart Assocv.8(18); 2019 Sep 17, 8(18): e013471
2. Ellulu1 S. Mohammed, Patimah2 Ismail, Huzwah Khaza'ai, Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications, Arch Med Sci 2017; 13, 4: 851–863

3. Darren K. McGuire, MD, MHSc; Weichung J. S, Association of SGLT2 Inhibitors With Cardiovascular and Kidney Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes, *JAMA Cardiology | Original Investigation*, 2020. doi:10.1001/jamacardio.2020.4511

4. Ханджиев Св А-ГП. Актуални проблеми на затлъстяването. МП-Гастроентерология; 2002. р. 3-4.

5. А-М Б. Разпространение на захарния диабет и предиабет в България. In: А Ш, editor.: *Ендокринология*. р. 182-192.

6. Valov V, Doneva M, Borisova AM, Tankova T, Czech M, Manova M, et al. Regional differences in diabetic patients' pharmacotherapy in Bulgaria. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(10):1499-506.

(67)

6. Ханджиева-Дърленска Т, Бояджиева Н, Затлъстяване:фармакотерапия и фармакогенетика; 2007; р. 18-63.

7. Ishikawa Y, Genge BR, Wuthier RE, Wu LN. Thyroid hormone inhibits growth and stimulates terminal differentiation of epiphyseal growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res*. 1998;13(9):1398-411.

8. Germano G, Hoffman EJ. Investigation of count rate and deadtime characteristics of a high resolution PET system. *J Comput Assist Tomogr*. 1988;12(5):836-46.

9. Mansourian AR. Metabolic pathways of tetraiodothyronine and triiodothyronine production by thyroid gland: a review of articles. *Pak J Biol Sci*. 2011;14(1):1-12.

10. Laurberg P. Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. *Metabolism*. 1984;33(4):379-92.

11. Child C, Nolan G, Jubiz W. Changes in serum thyroxine, triiodothyronine, and thyrotropin induced by lithium in normal subjects and in rats. *Clin Pharmacol Ther*. 1976;20(6):715-9.

12. Gruberg L, Weissman NJ, Waksman R, et al. The impact of obesity on the short-term and long-term outcomes after percutaneous coronary intervention: The obesity paradox? *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(4):578–84.

13. De Leo S, Lee SY, Braverman LE. Hyperthyroidism. *Lancet*. 2016.

14. Suzuki Y, Matsushita K, Seimiya M, Yoshida T, Sawabe Y, Ogawa M, et al. Paradoxical effects of thyroid function on glomerular filtration rate estimated from serum creatinine or standardized cystatin C in patients with Japanese Graves' disease. *Clin Chim Acta*. 2015;451(Pt B):316-22.

15. Ando T, Latif R, Davies TF. Antibody-induced modulation of TSH receptor post-translational processing. *J Endocrinol*. 2007;195(1):179-86.

16. Antonelli A, Ferri C, Pampana A, Fallahi P, Nesti C, Pasquini M, et al. Thyroid disorders in chronic hepatitis C. *Am J Med*. 2004;117(1):10-3.

17. Galtzer RL. Medical unions: some afterthoughts. *J Fla Med Assoc*. 1985;72(11):922.

18. И. А. Автоимунитет и ендокринни заболявания. In: З. К, editor. р. 114-59.

19. Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest*. 2001;108(9):1253-9.

20. Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J. Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocr Rev*. 1988;9(1):106-21.

21. Gierach M, Gierach J, Junik R. Insulin resistance and thyroid disorders. *Endokrynol Pol.* 2014;65(1):70-6.
22. Ximenes HM, Lortz S, Jorns A, Lenzen S. Triiodothyronine (T3)-mediated toxicity and induction of apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. *Life Sci.* 2007;80(22):2045-50.
23. Keskek SO, Kirim S, Kaya R, Canataroglu A. The effects of thyroid dysfunctions on insulin resistance in patients with hepatosteatosis. *Adv Clin Exp Med.* 2014;23(6):913-8.
24. Maratou E, Hadjidakis DJ, Peppas M, Alevizaki M, Tsegka K, Lambadiari V, et al. Studies of insulin resistance in patients with clinical and subclinical hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2010;163(4):625-30.
25. Dimitriadis G, Maratou E, Boutati E, Psarra K, Papasteriades C, Raptis SA. Evaluation of glucose transport and its regulation by insulin in human monocytes using flow cytometry. *Cytometry A.* 2005;64(1):27-33.
26. Brenta G. Why can insulin resistance be a natural consequence of thyroid dysfunction? *J Thyroid Res.* 2011;2011:152850.
27. Maratou E, Hadjidakis DJ, Kollias A, Tsegka K, Peppas M, Alevizaki M, et al. Studies of insulin resistance in patients with clinical and subclinical hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2009;160(5):785-90.
28. Conard NJ. A female figurine from the basal Aurignacian of Hohle Fels Cave in southwestern Germany. *Nature.* 2009;459(7244):248-52.
29. Cunningham DJ, Stolwijk JA, Wenger CB. Comparative thermoregulatory responses of resting men and women. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1978;45(6):908-15.
30. Abdul-Ghani MA, Abdul-Ghani T, Stern MP, Karavic J, Tuomi T, Bo I, et al. Two-step approach for the prediction of future type 2 diabetes risk. *Diabetes Care.* 2011;34(9):2108-12.
31. Bammann K, Gwozdz W, Pischke C, Eiben G, Fernandez-Alvira JM, De Henauw S, et al. The impact of familial, behavioural and psychosocial factors on the SES gradient for childhood overweight in Europe. A longitudinal study. *Int J Obes (Lond).* 2016.
32. Ханджиев Св А-ГП. Актуални проблеми на затлъстяването. МП-Гастроентерология; 2002. р. 3-4.
33. Valov V, Doneva M, Borisova AM, Tankova T, Czech M, Manova M, et al. Regional differences in diabetic patients' pharmacotherapy in Bulgaria. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(10):1499-506.
34. T H-D. Obesity; pharmacotherapy and pharmacogenetics. In: N B, editor. 2007.
35. Astrup A. The role of dietary fat in the prevention and treatment of obesity. Efficacy and safety of low-fat diets. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25 Suppl 1:S46-50.
36. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii, 1-253.
37. Sweeting HN. Measurement and definitions of obesity in childhood and adolescence: a field guide for the uninitiated. *Nutr J.* 2007;6:32.
38. Gray DS, Fujioka K. Use of relative weight and Body Mass Index for the determination of adiposity. *J Clin Epidemiol.* 1991;44(6):545-50.

39. Yoshida K, Nakashima E, Kyoizumi S, Hakoda M, Hayashi T, Hida A, et al. Metabolic Profile as a Potential Modifier of Long-Term Radiation-Induced Effects on Peripheral Lymphocyte Subsets in Atomic Bomb Survivors. *Radiat Res.* 2016.
40. Pinkhasov BB, Selyatinskaya VG, Astrakhantseva EL, Anufrienko EV. Circadian Rhythms of Carbohydrate Metabolism in Women with Different Types of Obesity. *Bull Exp Biol Med.* 2016.
41. Mogul H, Freeman R, Nguyen K. Metformin-Sustained Weight Loss and Reduced Android Fat Tissue at 12 Months in Empowir (Enhance the Metabolic Profile of Women with Insulin Resistance): A Double Blind, Placebo-Controlled, Randomized Trial of Normoglycemic Women with Midlife Weight Gain. *Endocr Pract.* 2016;22(5):575-86.
42. Bogl LH, Kaye SM, Ramo JT, Kangas AJ, Soininen P, Hakkarainen A, et al. Abdominal obesity and circulating metabolites: A twin study approach. *Metabolism.* 2016;65(3):111-21.
43. Tian Y, Jiang C, Wang M, Cai R, Zhang Y, He Z, et al. BMI, leisure-time physical activity, and physical fitness in adults in China: results from a series of national surveys, 2000-14. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(6):487-97.
44. Tagliaferri V, Romualdi D, Guido M, Mancini A, De Cicco S, Di Florio C, et al. The link between metabolic features and TSH levels in polycystic ovary syndrome is modulated by the body weight: an euglycemic-hyperinsulinemic clamp study. *Eur J Endocrinol.* 2016.
45. Seidell JC, Flegal KM. Assessing obesity: classification and epidemiology. *Br Med Bull.* 1997;53(2):238-52.
46. Lin JD. Levels of the first-phase insulin secretion deficiency as a predictor for type 2 diabetes onset by using clinical-metabolic models. *Ann Saudi Med.* 2015;35(2):138-45.
47. Siddiqui A, Madhu SV, Sharma SB, Desai NG. Endocrine stress responses and risk of type 2 diabetes mellitus. *Stress.* 2015;18(5):498-506.
48. Barr EL, Zimmet PZ, Welborn TA, Jolley D, Magliano DJ, Dunstan DW, et al. Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Circulation.* 2007;116(2):151-7.
49. Peet A, Roosimaa M, Tillmann V. The ease of falsifying blood glucose measurements. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;104(3):e57.
50. Kahn SE, Bergman RN, Schwartz MW, Taborsky GJ, Jr., Porte D, Jr. Short-term hyperglycemia and hyperinsulinemia improve insulin action but do not alter glucose action in normal humans. *Am J Physiol.* 1992;262(4 Pt 1):E518-23.
51. Daly ME, Vale C, Walker M, Littlefield A, Alberti KG, Mathers JC. Acute effects on insulin sensitivity and diurnal metabolic profiles of a high-sucrose compared with a high-starch diet. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(6):1186-96.
52. А-М Б. Разпространение на захарния диабет и предиабет в България. In: А III, editor.: *Ендокринология.* p. 182-1922.
53. Chen M, Bergman RN, Porte D, Jr. Insulin resistance and beta-cell dysfunction in aging: the importance of dietary carbohydrate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67(5):951-7.
54. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.

55. Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(10):1111-7.
56. Simopoulos A. The FTO Gene, Browning of Adipose Tissue and Omega-3 Fatty Acids. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2016;9(2-4):123-6.
57. Hwang DY, Lee JW, Lee SM, Kim S. Causes of (18)F-FDG uptake on white adipose tissue. *Hell J Nucl Med*. 2016;19(1):7-9.
58. Webber J. Energy balance in obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2003;62(2):539-43.
59. Mulya A, Kirwan JP. Brown and Beige Adipose Tissue: Therapy for Obesity and Its Comorbidities? *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2016;45(3):605-21.
60. Lean ME, Jennings G. Brown adipose tissue activity in pyrexial cases of cot death. *Journal of clinical pathology*. 1989;42(11):1153-6.
61. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
62. Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise regulation of adipose tissue. *Adipocyte*. 2016;5(2):153-62.
63. Sampath SC, Sampath SC, Bredella MA, Cypess AM, Torriani M. Imaging of Brown Adipose Tissue: State of the Art. *Radiology*. 2016;280(1):4-19.
64. Bartness TJ, Ryu V. Neural control of white, beige and brown adipocytes. *Int J Obes Suppl*. 2015;5(Suppl 1):S35-9.
65. Stechschulte LA, Qiu B, Warriar M, Hinds TD, Jr., Zhang M, Gu H, et al. FKBP51 Null Mice Are Resistant to Diet-Induced Obesity and the PPARgamma Agonist Rosiglitazone. *Endocrinology*. 2016:en20151996.
66. Cedikova M, Kripnerova M, Dvorakova J, Pitule P, Grundmanova M, Babuska V, et al. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6067349.
67. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev*. 2013;27(3):234-50.
68. Kuhn E, Binart N, Lombes M. [Brown, white, beige: the color of fat and new therapeutic perspectives for obesity...]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2012;73 Suppl 1:S2-8.
69. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
70. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395(6704):763-70.
71. Funahashi H, Yada T, Suzuki R, Shioda S. Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. *Int Rev Cytol*. 2003;224:1-27.
72. Semple RK, Soos MA, Luan J, Mitchell CS, Wilson JC, Gurnell M, et al. Elevated plasma adiponectin in humans with genetically defective insulin receptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):3219-23.

73. Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283(4):982-8.
74. Ricci R, Bevilacqua F. The potential role of leptin and adiponectin in obesity: a comparative review. *Vet J.* 2012;191(3):292-8.
75. Assiri AM, Kamel HF. Evaluation of diagnostic and predictive value of serum adipokines: Leptin, resistin and visfatin in postmenopausal breast cancer. *Obes Res Clin Pract.* 2016;10(4):442-53.
76. Kotsis V, Stabouli S, Papakatsika S, Rizos Z, Parati G. Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens Res.* 2010;33(5):386-93.
77. Zhang R, Jiao J, Zhang W, Zhang Z, Zhang W, Qin LQ, et al. Effects of cereal fiber on leptin resistance and sensitivity in C57BL/6J mice fed a high-fat/cholesterol diet. *Food Nutr Res.* 2016;60:31690.
78. Triantafyllou GA, Paschou SA, Mantzoros CS. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2016;45(3):633-45.
79. Li E, Kim Y, Kim S, Sato T, Kojima M, Park S. Ghrelin stimulates proliferation, migration and differentiation of neural progenitors from the subventricular zone in the adult mice. *Exp Neurol.* 2014;252:75-84.
80. Davenport RJ, Wright S. Treating obesity: is it all in the gut? *Drug Discov Today.* 2014;19(7):845-58.
81. Becker GF, Passos EP, Moulin CC. Short-term effects of a hypocaloric diet with low glycemic index and low glycemic load on body adiposity, metabolic variables, ghrelin, leptin, and pregnancy rate in overweight and obese infertile women: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(6):1365-72.
82. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol.* 2003;148(3):293-300.
83. Satoh N, Naruse M, Usui T, Tagami T, Suganami T, Yamada K, et al. Leptin-to-adiponectin ratio as a potential atherogenic index in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2004;27(10):2488-90.
84. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(4):1630-5.
85. Ukkola O. Endocrinological activities of ghrelin: new insights. *Eur J Intern Med.* 2003;14(6):351-6.
86. Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M. Molecular evolution of GPCRs: Ghrelin/ghrelin receptors. *J Mol Endocrinol.* 2014;52(3):T87-100.
87. Dovolou E, Periqueta E, Messinis IE, Tsiligianni T, Dafopoulos K, Gutierrez-Adan A, et al. Daily supplementation with ghrelin improves in vitro bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. *Theriogenology.* 2014;81(4):565-71.
88. Togliatto G, Trombetta A, Dentelli P, Cotogni P, Rosso A, Tschop MH, et al. Unacylated ghrelin promotes skeletal muscle regeneration following hindlimb ischemia via SOD-2-mediated miR-221/222 expression. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(6):e000376.
89. Vengeliene V. The role of ghrelin in drug and natural reward. *Addict Biol.* 2013;18(6):897-900.

90. Esler WP, Rudolph J, Claus TH, Tang W, Barucci N, Brown SE, et al. Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology*. 2007;148(11):5175-85.
91. Lu SC, Xu J, Chinookoswong N, Liu S, Steavenson S, Gegg C, et al. An acyl-ghrelin-specific neutralizing antibody inhibits the acute ghrelin-mediated orexigenic effects in mice. *Mol Pharmacol*. 2009;75(4):901-7.
92. Zorrilla EP, Iwasaki S, Moss JA, Chang J, Otsuji J, Inoue K, et al. Vaccination against weight gain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(35):13226-31.
93. Bail J, Meneses K, Demark-Wahnefried W. Nutritional Status and Diet in Cancer Prevention. *Semin Oncol Nurs*. 2016;32(3):206-14.
94. Macedo da Costa TH, Pires da Silva FV, Goncalves Reis CE, Augusto Casulari L. Improved metabolic response after 16 weeks of calorie-restricted low-glycaemic index diet and metformin in impaired glucose tolerance subjects. *Nutr Hosp*. 2014;29(5):1081-7.
95. Campos D, Hernandez-Torres JJ, Agil A, Comino M, Lopez JC, Macias V, et al. Analysis of food advertising to children on Spanish television: probing exposure to television marketing. *Arch Med Sci*. 2016;12(4):799-807.
96. Velez-Marin M, Hurtado Salazar A, Uribe-Velasquez LF. Plasma cortisol activity in rats under conditions of chronic stress supplemented with resveratrol. *Colomb Med (Cali)*. 2012;43(3):221-5.
97. Ebbeling CB, Swain JF, Feldman HA, Wong WW, Hachey DL, Garcia-Lago E, et al. Effects of dietary composition on energy expenditure during weight-loss maintenance. *JAMA*. 2012;307(24):2627-34.
98. Leder L, Kolehmainen M, Narverud I, Dahlman I, Myhrstad MC, de Mello VD, et al. Effects of a healthy Nordic diet on gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells in response to an oral glucose tolerance test in subjects with metabolic syndrome: a SYSDIET sub-study. *Genes Nutr*. 2016;11:3.
99. A R. PREVIEW: PREvention of diabetes through lifestyle Intervention and population studies in Europe and around the World. *Obes. facts*; 2013.
100. Stroeve JH, Saccenti E, Bouwman J, Dane A, Strassburg K, Vervoort J, et al. Weight loss predictability by plasma metabolic signatures in adults with obesity and morbid obesity of the DiOGenes study. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(2):379-88.
101. Kennedy BM, Kennedy KB, Sarpong DF, Katzmarzyk PT. Perceptions of Obesity Treatment Options Among Healthcare Providers and Low-Income Primary Care Patients. *Ochsner J*. 2016;16(2):158-65.
102. Krentz AJ, Fujioka K, Hompesch M. Evolution of pharmacological obesity treatments: focus on adverse side-effect profiles. *Diabetes Obes Metab*. 2016;18(6):558-70.
103. Apovian C, Palmer K, Fain R, Perdomo C, Rubino D. Effects of Lorcaserin on Fat and Lean Mass Loss in Obese and Overweight Patients Without and With Type 2 Diabetes Mellitus: the BLOSSOM and BLOOM-DM Studies. *Diabetes Obes Metab*. 2016.
104. Saunders KH, Shukla AP, Igel LI, Kumar RB, Aronne LJ. Pharmacotherapy for Obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2016;45(3):521-38.
105. Omran Z. Obesity, Current Treatment and Future Horizons. *Mini Rev Med Chem*. 2016.
106. Bailey CJ. Renal glucose reabsorption inhibitors to treat diabetes. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(2):63-71.

107. Frühbeck G., Catalán V., Rodríguez A., Adiponectin-leptin Ratio is a Functional Biomarker of Adipose Tissue Inflammation. *Nutrients*, 2019. 11(2).
108. Fiona M. Gribble, Claire L. Meek, Frank Reimann, Targeted intestinal delivery of incretin secretagogues—towards new diabetes and obesity therapies, *Peptides*, Volume 100, February 2018, Pages 68-74
109. Anne Raben, Pia Siig Vestentoft, Jennie Brand-Miller, The PREVIEW intervention study: Results from a 3-year randomized 2 x 2 factorial multinational trial investigating the role of protein, glycaemic index and physical activity for prevention of type 2 diabetes, Volume 23, Issue 2, Pages: 297-652, February 2021
110. Palacios-Mendoza M, Jurado MB, Gamboa X. Changes in Insulin Resistance Following Bariatric Surgery: Role of Caloric Restriction and Weight Loss. *The Journal of Metabolic Surgery and Allied Care*;ISSN: 0960-8923 (Print) 1708-0428.
111. Милчева Б, Орбецова М. Мастната тъкан - ендокринен орган. *Ендокринология*. 2004;2:64-72.
112. . Lu Y, Hajifathalian K, Ezzati M, Woodward M. Metabolic mediators of the effects of body-mass index, overweight, and obesity on coronary heart disease and stroke: a pooled analysis of 97 prospective cohorts with 1.8 million participants. *Lancet*. 2014;383:970-983
113. Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ. Indices of relative weight and adiposity. *J Chronic Dis*. 1972;25:329-343.24
114. Rajeev SP, Cuthbertson DJ, Wilding JP. Energy balance and metabolic changes with sodium-glucose co-transporter 2 inhibition. *Diabetes Obes Metab*. 2016;18(2):125-134.
115. Stenlöf K, Cefalu WT, Kim KA, et al. Efficacy and safety of canagliflozin monotherapy in subjects with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled with diet and exercise. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15(4):372-382.
116. Wilding J, Bailey C, Rigney U, Blak B, Beekman W, Emmas C. Glycated hemoglobin, body weight and blood pressure in type 2 diabetes patients initiating dapagliflozin treatment in primary care: a retrospective study. *Diabetes Ther*. 2016;7(4):695-711.
117. Das SK, Roberts SB, McCrory MA, Hsu LK, Shikora SA, Kehayias JJ, et al. Long-term changes in energy expenditure and body composition after massive weight loss induced by gastric bypass surgery. *Am J Clin Nutr*. 2003; 78:22–30.
118. Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, et al.: Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg*. 1995; 222(3): 339–350.