

**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**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен**

**„ДОКТОР“**

**Научна специалност: ФАРМАКОЛОГИЯ (ВКЛ. ФАРМАКОКИНЕТИКА И  
ХИМИОТЕРАПИЯ**

**Научен ръководители: Доц. д-р Теодора Ханджиева-Дърленска, д.м.**

**Проф. д-р Надка Бояджиева, д.м.н.**

**София, 2022**



## СЪДЪРЖАНИЕ:

<u>ВЪВЕДЕНИЕ</u> .....	5
<u>А. ОСНОВНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА И НЕЙНАТА ПАТОЛОГИЯ</u> .....	5
<u>Б. ОСНОВНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЗАТЛЪСТЯВАНЕТО, ПРЕДИАБЕТА И ЗАХАРНИЯ ДИАБЕТ ТИП 2</u> .....	7
<u>В. ХАРАКТЕРИСТИКА НА ИНСУЛИНОВАТА РЕЗИСТЕНТНОСТ</u> .....	8
<u>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</u> .....	12
<u>А. Експериментални задачи</u> .....	12
<u>Б. Клинични задачи</u> .....	12
<u>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</u> .....	12
<u>РЕЗУЛТАТИ</u> .....	23
<u>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</u> .....	45
<u>ИЗВОДИ</u> .....	50
<u>ПРИНОСИ:</u> .....	51

Дисертацията съдържа 88 стандартни машинописни страници, 29 фигури, 8 таблица и 118 литературни източници.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита от разширен катедрен съвет на Катедрата по фармакология и токсикология на Медицинския факултет, Медицинския университет – София, проведен на 15.11.2021 година.

Защитата ще се състои на 11.04.2022 в в Катедрата по фармакология и токсикология, МФ, МУ – София.

На първото си заседание научното жури определи:

Председател: Доц. д-р Румен Павлов Николов, дм – Катедра по фармакология и токсикология, МФ, МУ – София (вътрешен член за МУ - София)

Членове: Проф. д-р Славина Кирилова Сурчева, дм – Катедра по фармакология и токсикология, МФ, МУ – София (вътрешен член за МУ - София)

Проф. д-р Иванка Илиева Костадинова, дм, дмн – Началник отдел СДО, Медицински университет – Пловдив, външен член за МУ – Софи

Проф. д-р Стефка Василева Вълчева-Кузманова, дмн – Медицински университет – Варна (външен член за МУ – София)

Доц. д-р Делян Пенев Делев, дм – Медицински университет - Пловдив (външен член за МУ - София)

## 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

**HOMA** – homeostatic model assessment

**RBP-4** – ретинол свързващ протеин 4

**SGLT2 inhibitors**- sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors

**TBG** - thyroxin-binding globulin

**TNF- $\alpha$**  – туморо-некрозен фактор-алфа

**TRAK** - TSH-рецепторни антитела

**TSH** - Thyroid-stimulating hormone

## ВЪВЕДЕНИЕ

### 1. Основни характеристики на щитовидната жлеза и нейната патология

**Щитовидната жлеза** е ключов орган в регулацията на метаболитните процеси при животните и човека. **Хормоните на жлезата** имат ефект върху почти всички клетки в организма, свързвайки се с нуклеарни рецептори и по този начин стартират каскада от реакции, водещи до експресия на различни генни продукти. Физиологична роля на периферните хормони **трийодтиронин (Т3)** и **тироксин (Т4)** оказват ефект върху основните метаболитни процеси в организма.

**Патологията на щитовидната жлеза** е една от водещите ендокринопатии, като дисфункцията на жлезата се разглежда като **хиперфункция** (хипертиреозидизъм) или **хипофункция** (хипотиреозидизъм), което определя излишъка или недостига на периферните хормони (Таблица 1).

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

	ХИПЕРТИРЕОИДИЗЪМ	ХИПОТИРЕОИДИЗЪМ
СЪРДЕЧНО-СЪДОВА СИСТЕМА	Тахикардия и ритъмно-проводни нарушения	Брадикардия с ритъмни нарушения
НЕРВНА СИСТЕМА	Психо-моторни нарушения	Нарушения в съня и депресивни състояния
ОСНОВНА ОБМЯНА	Редукция на телесно тегло	Покачване на телесно тегло
ВЪГЛЕХИДРАТНА ОБМЯНА	Хипергликемия	Хипогликемия на фона на инсулинова резистентност
ЛИПИДНА ОБМЯНА	Понижаване на общ холестерол и LDL-холестерол	Повишени стойности на общ холестерол и LDL-холестерол
НАРУШЕНИЯ В МЕНСТРУАЛЕН ЦИКЪЛ	Олигоаменорея	Дисменорея, менорагия

## 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. На ниво глюкозен транспорт, хипотиреоидизмът води до нарастване серумните нива на GLUT2 (основният глюкозен транспортер в черния дроб) и влошен гликемичен контрол, което определя повишаването на инсулинова резистентост в периферните органи (на ниво черен дроб). За това свидетелстват редица *in vitro* и *in vivo* проувания, показващи патофизиологичните причини за влошеното инсулиново действие, което определя и промените в глюкозната утилизация. По този начин се демонстрира връзката между тиреоидната дисфункция и затлъстяването.

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-транспортер 2 - SGLT2 инхибитори (Емпаглифлозин), може да се използва при оценката на риска от големи нежелани сърдечно-съдови събития (Major Adverse Cardiac Events, MACE) 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.

## 2. Основни характеристики на затлъстяването, предиабета и захарния диабет тип 2

**Затлъстяването** е хронично метаболитно заболяване, характеризиращо се с натрупване на прекомерно количество мастна тъкан и с дисбаланс между вноса на калории и енергоразхода в организма.

Голямото количество мастната тъкан води до нарушена регулация във въглехидратната обмяна, дефинирано като **предиабет**. Терминът 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 тип 2 и значим риск за възникването на сърдечно-съдови увреждания. На таблица 4 са описани глюкозните стойности, показващи съответните глюкозни нарушения.

**Захарният диабет** е полигенно многофакторно, хронично заболяване, характеризиращо 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. 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% .

### **3. Характеристики на инсулиновата резистентност**

**Инсулиновата резистентност** представлява 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. Диагнозата се поставя след провеждане на тест с глюкоза- орален глюкозо толерантен тест (ОГТТ). За по-прецизно определяне на инсулиновата чувствителност в клиничната практика се използва изчисляването на **НОМА-индекс** (Хомеостатичен модел за оценка на инсулинова чувствителност).

Индексът се изчислява по следната формула: **НОМА = (Глюкоза x 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.

### **4. Характеристика на мастната тъкан като ендокринен орган, който участва в регулацията на метаболизма**

Мастната тъкан е съставена от клетки, наречени адипоцити, които оформят най-големия ендокринен орган, секретират редица хормони и фактори на възпалението

като лептин, адипонектин, проинфламаторни фактори, като тумор некротизиращ фактор  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлевкин (IL6), фактор D (известен като адипсин), протромботични агенти като плазминоген активиращ инхибитор I, както и компоненти, участващи в регулацията на артериалното налягане- ангиотензиноген.

**Лептинът** представлява едноверижен протеохормон, с молекулна маса 16 kDa, вземащ ключова роля в регулацията на телесното тегло. Продуцирането на хормона се свързва с об-ген (69), разположен на 7 хромозома. 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. Действието на лептина по отношение на централната нервна система, се свързва основно с ефекта върху хипоталамуса, което довежда до потискане на хранителния прием, както и стимулиране на енергийния разход.

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). Установена е негативна обратна връзка между затлъстяването и циркулиращия адипонектин, като концентрацията му нарастваедновременно с редуцията 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)**. Значимостта на съотношението адипонектин/лептин е във връзка с регулацията на енергийната хомеостаза и метаболизма. 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. Известно е, че стойност на А/Л около 1.0, измерени, съответно в  $\mu\text{g/mL}$  и  $\text{ng/mL}$ , 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. Като допълнение

към неговите предимства се подчертава фактът, че въпреки приема на глюкоза при орално-глюкозния тест с натоварването данните от изчисляването на съотношението лептин/адипонектин могат да бъдат информативни при измерени и във фаза без гладуване.

### **5. 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. Грелинът води до увеличаване на мастната тъкан като намалява окислението на мазнините. Той е основният орексигенен хормон. При възрастни хора, плазмените нива на грелин 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 лица, живеещи със затлъстяване, които имат повишен хранителен прием, синтезът му е намален.

Малко са данните в литературата за ефектите на грелина по отношение на инсулиновата секреция. Данните сочат, че концентрацията на грелин е обратно пропорционална 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.

Изучаването на ползите и рисковете от прилагането на различни методи за редукция на телесната маса включва и **бариатричната хирургия (БХ)** като метод за трайно намаление телесното тегло при пациенти с болестно затлъстяване. 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, като механизмите им на действие се осъществяват

чрез повлияване на абсорбцията на приетите хранителни вещества, както и чрез рестрикция, водеща до намален обем на стомаха.

За ефективното лечение на затлъстяването се разработват и редица фармакологични методи, като част с част от тях, са в различни фази на клинични проучвания GLP1-рецепторните агонисти (glucagon-like peptide-1 agonists), първоначално регистрирани като медикаменти за лечение на захарен диабет тип 2, доказват 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-метаболически заболявания.

Към новите класове антидиабетни медикаменти се включват и групата на инхибиторите на натриево-глюкозния ко-транспортър 2, SGLT 2 инхибиторите (sodium-dependent glucose co-transporter 2). Те показват ефект върху калорийния разход при пациенти със затлъстяване и захарен диабет тип 2 чрез потискане на глюкозната реабсорбция в проксималните бъбречни тубули.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Цел на научните изследвания е да се проучи експериментално и клинично ролята на дисфункцията на щитовидната жлеза в механизмите на развитие на инсулиновата резистентност, промяната във въглехидратния метаболизъм и върху регулацията на апетита, както и влиянието на фармакологични и нефармакологични подходи върху тези промени.

За осъществяване на тази цел са поставени следните задачи:

## **А. Експериментални задачи**

1. Да се разработят и стандартизират два експериментални модела на индуцирана хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза на мъжки плъхове порода Вистар.
2. 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.
3. 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.
4. Да се установи и сравни ефекта на Метформин и Емпаглифлозин върху инсулиновата чувствителност и резистентност при двата експериментални модела на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза на плъхове.
5. Да се установи и сравни ефекта на Метформин и Емпаглифлозин върху съотношението адипонектин/лептин.

## **Б. Клинични задачи**

6. Да се установи влиянието на хипофункцията на щитовидната жлеза върху степента на развитие на инсулинова резистентност при лица с предиабет и затлъстяване.
7. 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.
8. Да се определи влиянието на бариатричната хирургия върху секрецията на адипокини и биометричните показатели на мастната тъкан.
9. Да се оцени и проследи ефектът на провеждана бариатрична хирургия върху съотношението адипонектин/лептин и оценка на сърдечно-съдов риск.
10. 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.

## **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **А. Експериментални изследвания**

#### **1. Експериментални животни**

За целите и задачите на проведените експериментални изследвания се използваха половозрепи мъжки плъхове порода Вистар, 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).

#### **2. Експериментални модели с цел създаването на дисфункция на щитовидната жлеза**

Експериментите *in vivo* се проведоха върху мъжки плъхове порода Вистар 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 модел на хипотиреоидизъм, 2-ра група с експериментално индуциран модел на 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-тироксин 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 критерий 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% редуция на телесното тегло.

### **3.2. Ефект на Емпаглифлозин (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 Емпаглифлозин (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 редуция на гликемиите, обуславя и увеличена загуба на калории, свързана с редуция на мазнините в организма и намаление на телесното тегло.

## **4. Биохимични методи**

### **4.1. Определяне на глюкозата в кръвта на плъховете**

Кръвната захар се 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 накапва на лентичката и резултатът се получава след 5 секунди. За определяне на инсулина в кръвта на животните, се използва ELISA Rat Insulin.

## **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 С. След отделянето на плазмата се добавяше 100 µl 1M HCl на 1 ml плазма. След това пробите се центрофугираха повторно за 5мин. на +4 С. Супернатантата се отделя за провеждане на изследвания върху грелин.

Rat Acylated Ghrelin ELISA (BioVender, Чехия), реакция се прави на основата на реакцията двоен-антитяло сандвич. Плаките са предварително инкубирани с моноклонално антитяло, специфично за С-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. Плазменото 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, конюгирани 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.

## **6. 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.

## **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 превантивния 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. В проучването са ангажирани 2000 участници (800 на възраст 25—45 години, и 1200 възрастни, 55—70 години), 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  $\leq 50$ . И при двете диети е предвидено да се ползват здравословни храни. **Двете интервенции с физически упражнения** с различна по степен интензитет.

#### **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-провежда се при стандартизирани условия.**

#### **Кръвни проби**

Проведени анализи от кръвната проба ще се извършат: кръвна захар на гладно и след натоварване, инсулин, С-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. 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 ентералните хормони, регулиращи метаболизма и апетита като грелин, пептид YY3-36, 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.

**1.2.** Пациентите от отделение по Ендокринология и болести на обмяната, включени в

изследването, първо бяха подбрани по критерии затлъстяване II степен, хиперинсулинемия, с придружаващо автоимунно тиреоидно заболяване, в еутиреоиден статус на фона на хормонозаместителна терапия с Левотироксин.

След подбора на 21 пациенти, мъже и жени, бяха разделени в две групи:

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.

### **Изследователски методи и при двете изследвания**

**Антропометрични измервания и телесен състав.** Антропометричните данни включват телесно тегло, височина, обиколка на талията, ханша и бедрата, телесен състав и разпределение на мазнините. Измерването на телесния състав се извършва чрез биоимпеданс метод Танита.

**ELISA методи (описани по-горе)** за определяне на грелин, 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:

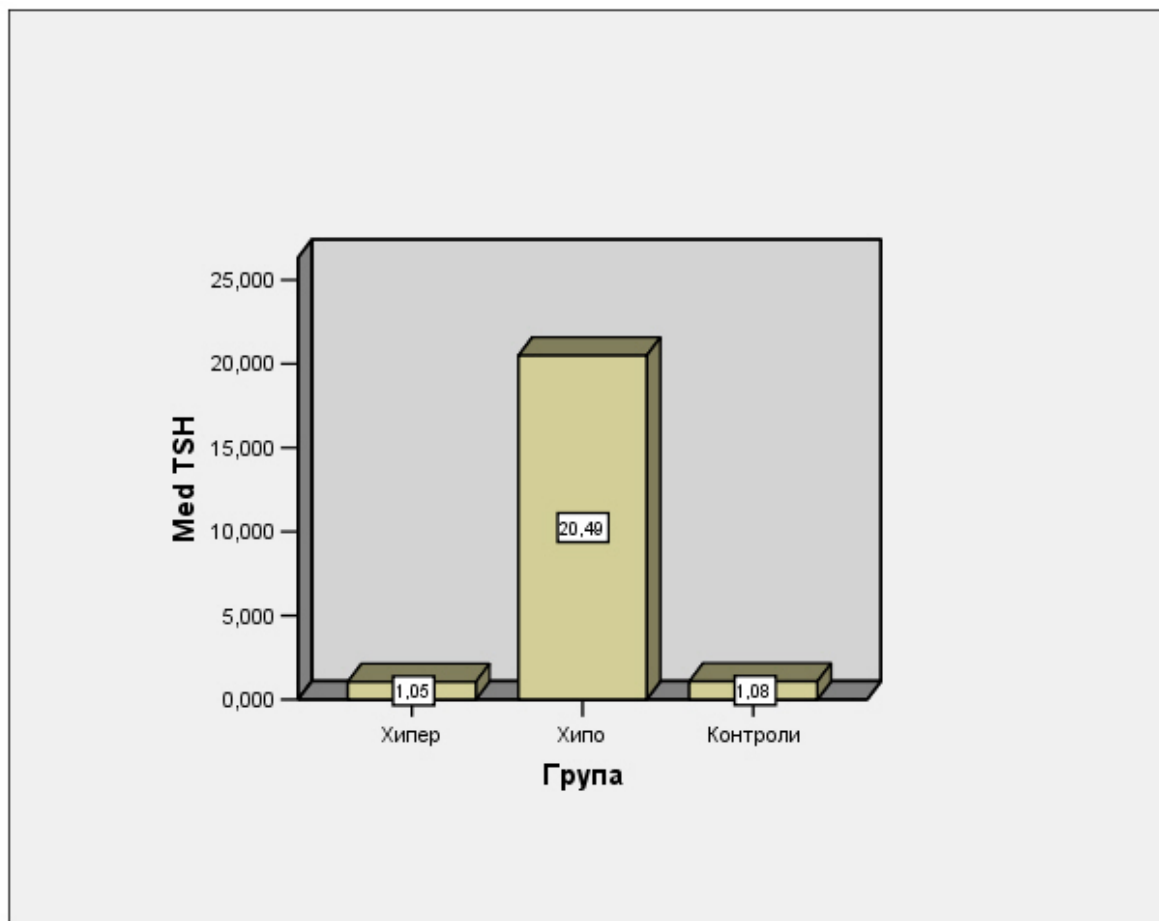
• Student *t*-test-параметричен метод за сравнение на две средни стойности при ниво на значимост  $p < 0.05$  или  $p < 0.001$ .

## **РЕЗУЛТАТИ**

### **А. Експериментални изследвания**

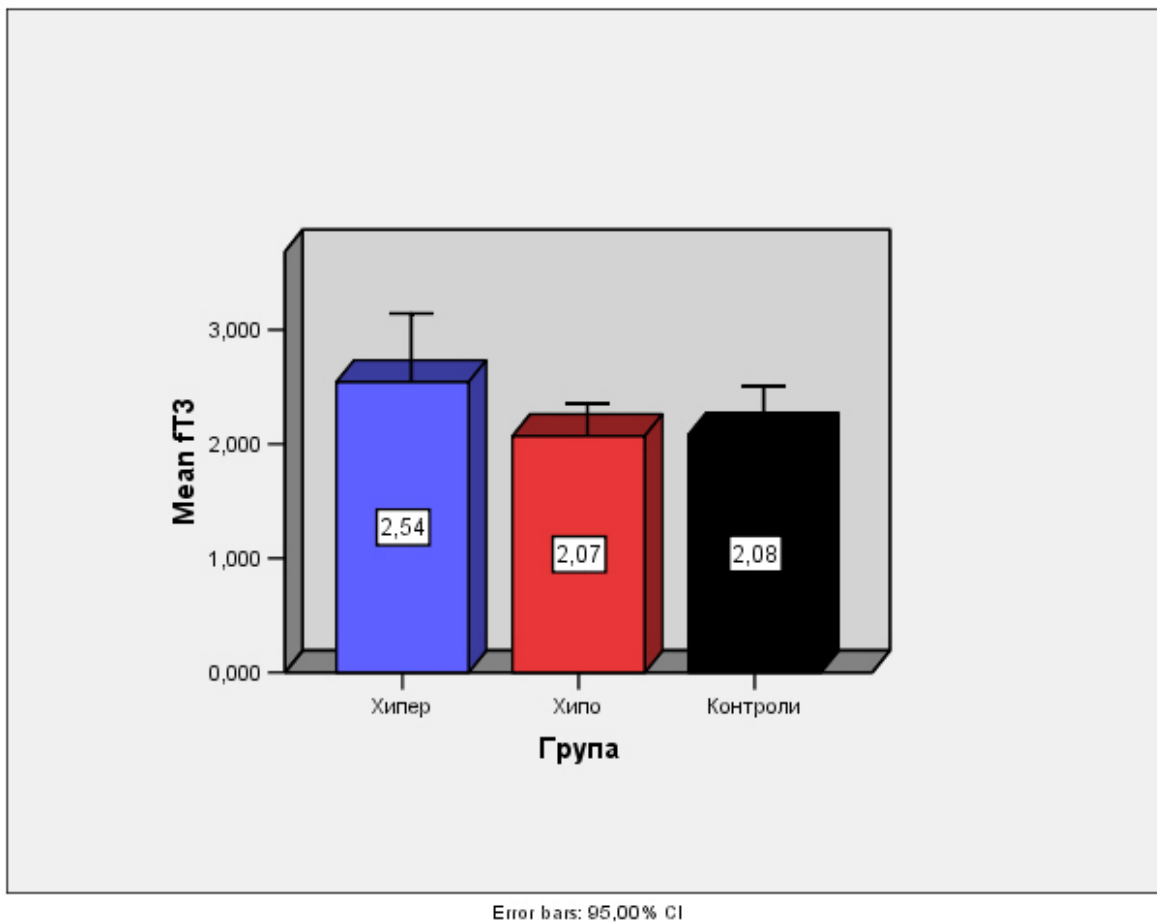
**1. Ефект върху хормоналната активност на щитовидната жлеза при експериментално индуцирана хипо- и хиперфункция на жлезата**

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. \* $p < 0,005$

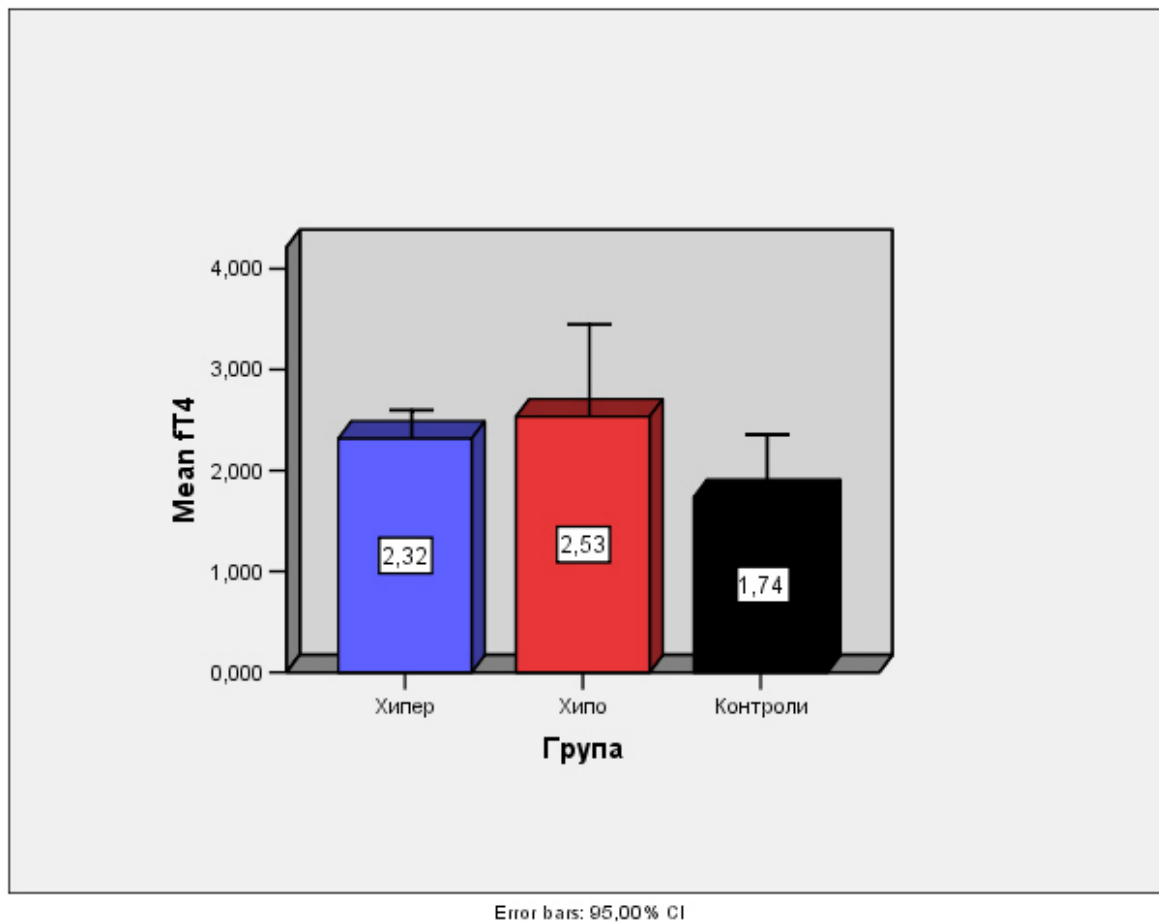
Допълнителното определяне на периферните хормони дава по-пълна информативност за степента на повлияване на щитовидната функция. За fT3 се отчитат нормално разпределение на стойностите на хормоните за отделните групи, което отразява очакваните промени във функцията на жлезата (Фигура 2).



**Фигура 2.** Средни стойност на fT3 в ng/ml при трите групи експериментални плъхове. Експериментална група на индуциран хипертиреоидизъм спрямо контрола.

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. Близките стойности, демонстрирани в хипо- групата и контролата, показват тази зависимост при изследваните стойности на fT3.

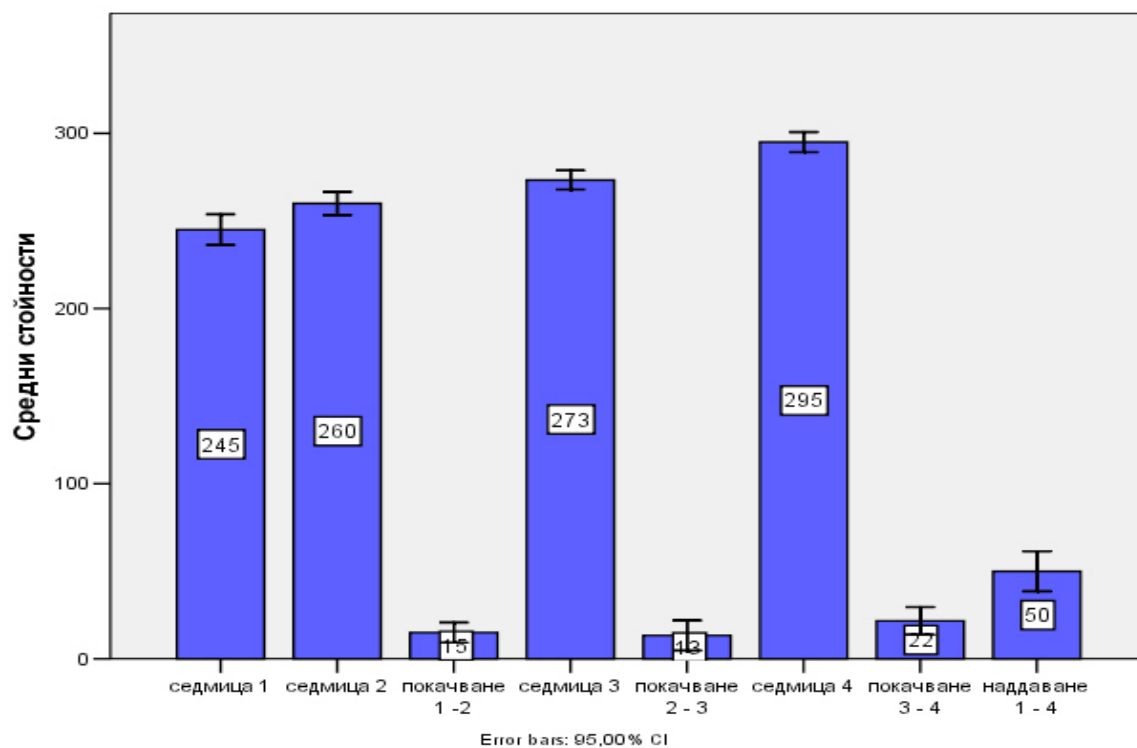
При проследяване зависимостта на fT4, също се демонстрират промени, характерни за двете състояния на дисфункция на жлезата (Фигура 3).



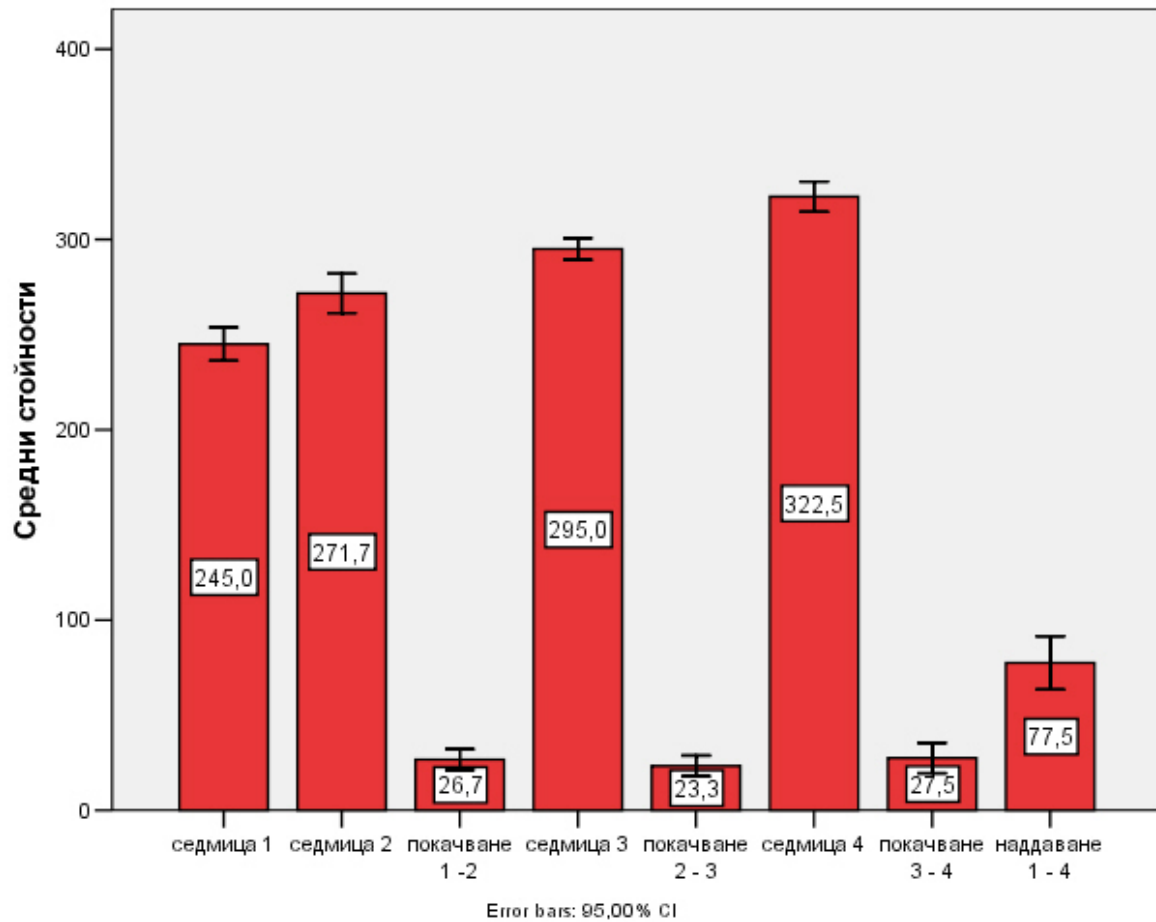
**Фигура 3.** Средни стойност на fT4 ng/ml при трите групи плъхове.

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

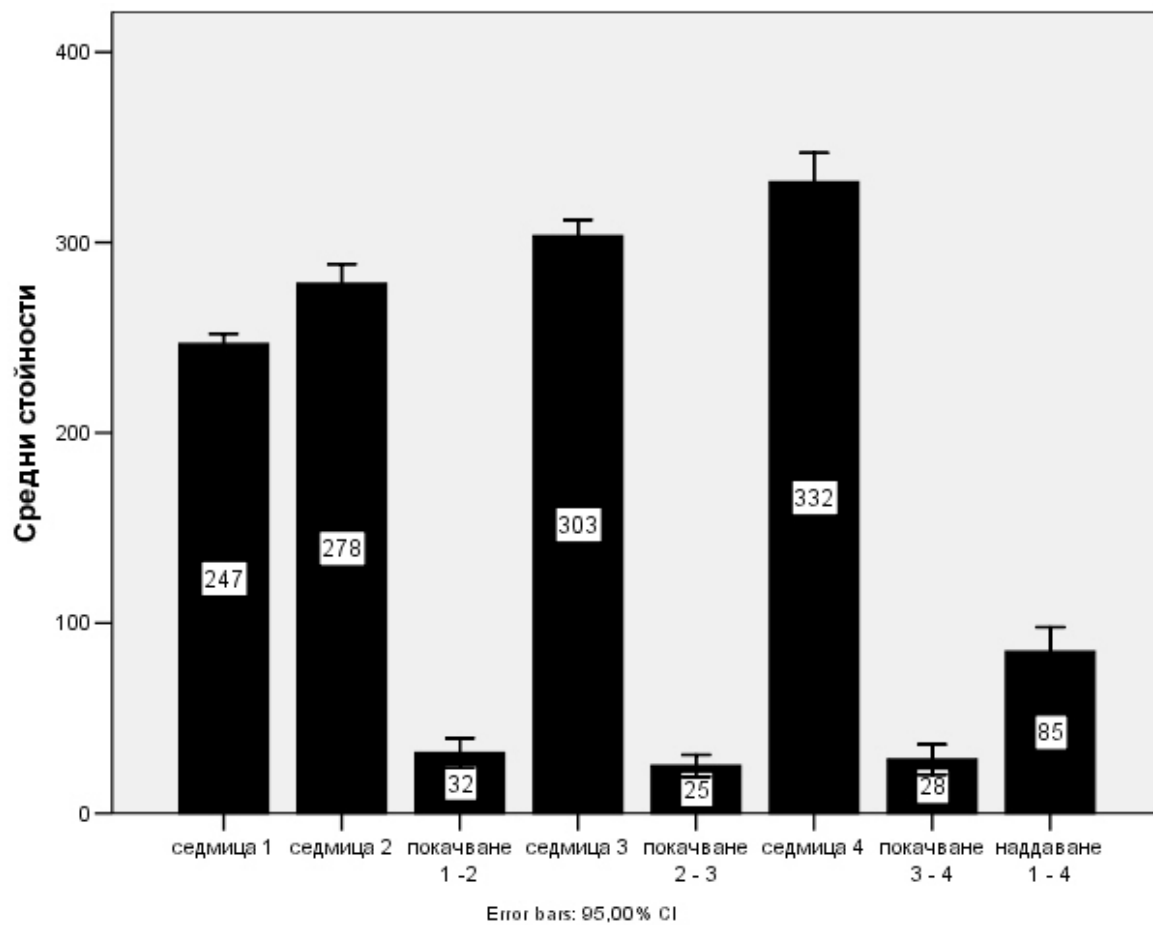
Метаболитната роля на щитовидната жлеза се определя чрез проследяване на динамиката на телесното тегло при мъжки плъхове порода Вистар (Фигури 4 а,б,в).



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

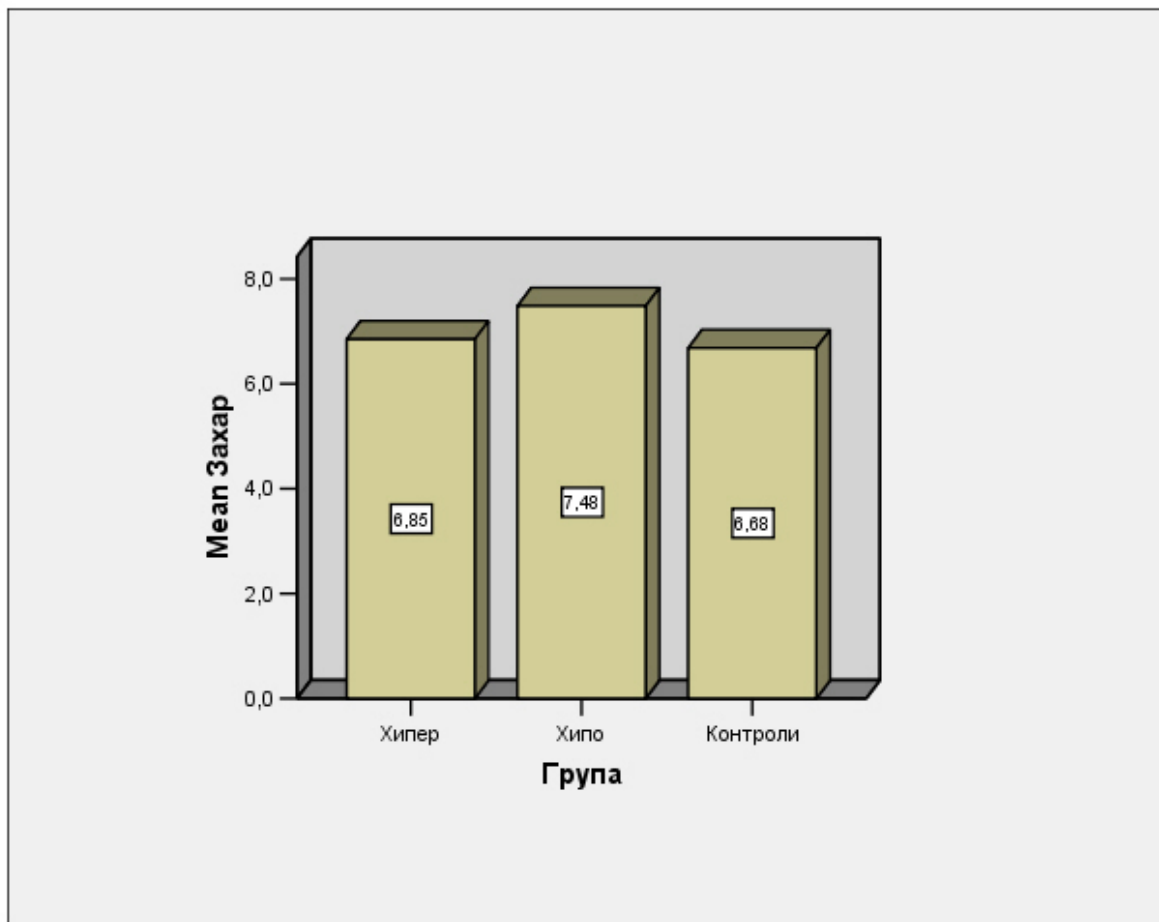


**Фигура 4б.** Телесното тегло (г) в динамика в групата с експериментално индуцирана хипофункция на щитовидната жлезата. Проследяване на средни стойности на теглото на база 4 седмично измерване.



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

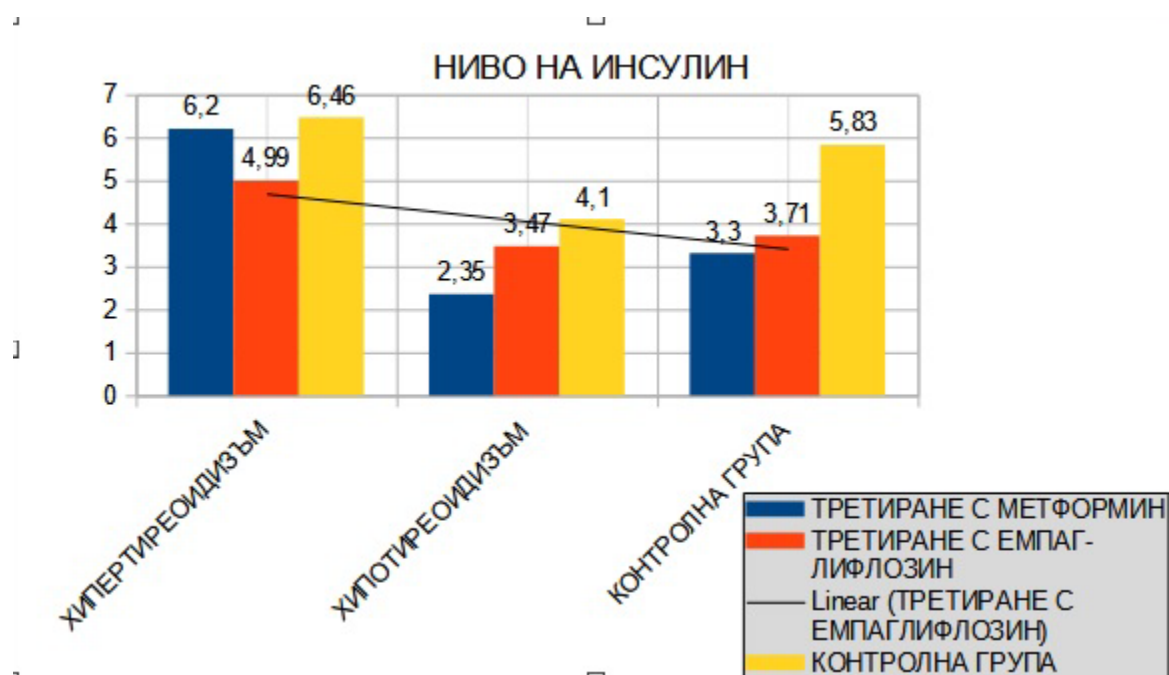
В допълнение се отчита разликата в телесното тегло, като се съпоставят отделните групи една спрямо друга (Фигура 4).



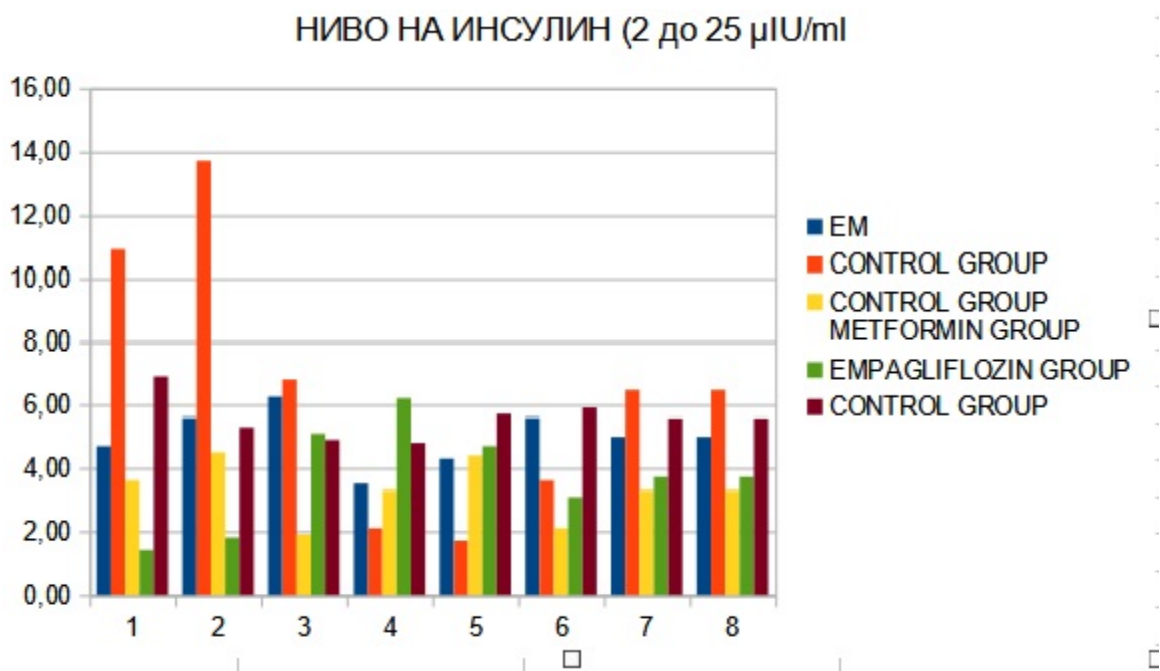
**Фигура 5** Средни стойност на кръвната захар (mmol/l), измерена и сравнена за трите групи. \* $p < 0,1$ .

### **3. Плазмени нива на инсулин (2 до 25 $\mu$ 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 Вистар третирани с Метформин, група 2- мъжки плъхове порода Вистар третирани с Емпаглифлозин, група 3- контролна група.

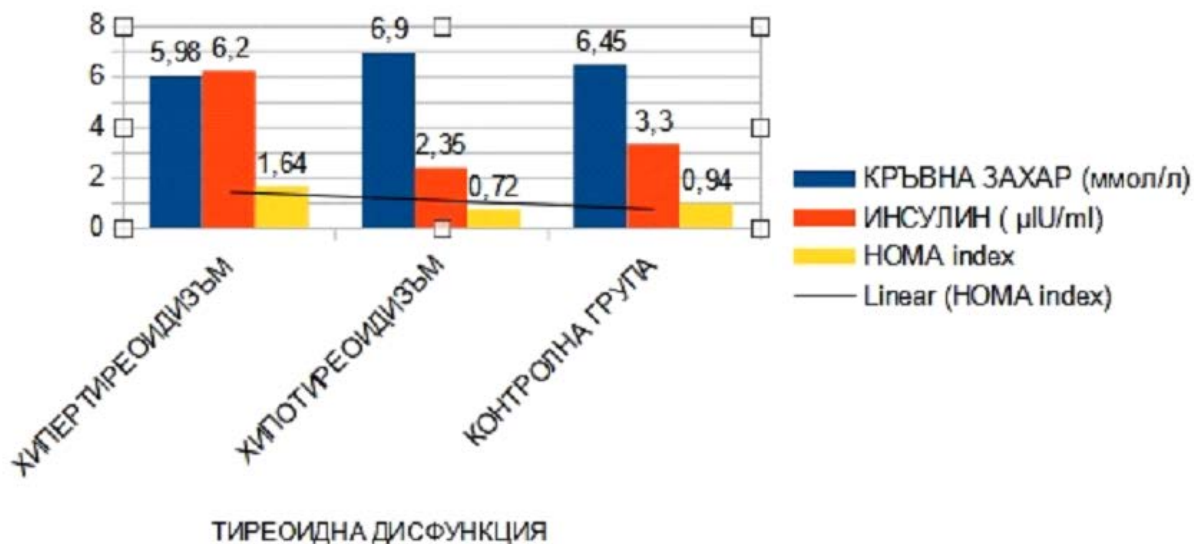


**Фигура 6.** Средни стойности на инсулин за трите групи тиреоидна дисфункция.  
 \* $p < 0.05$



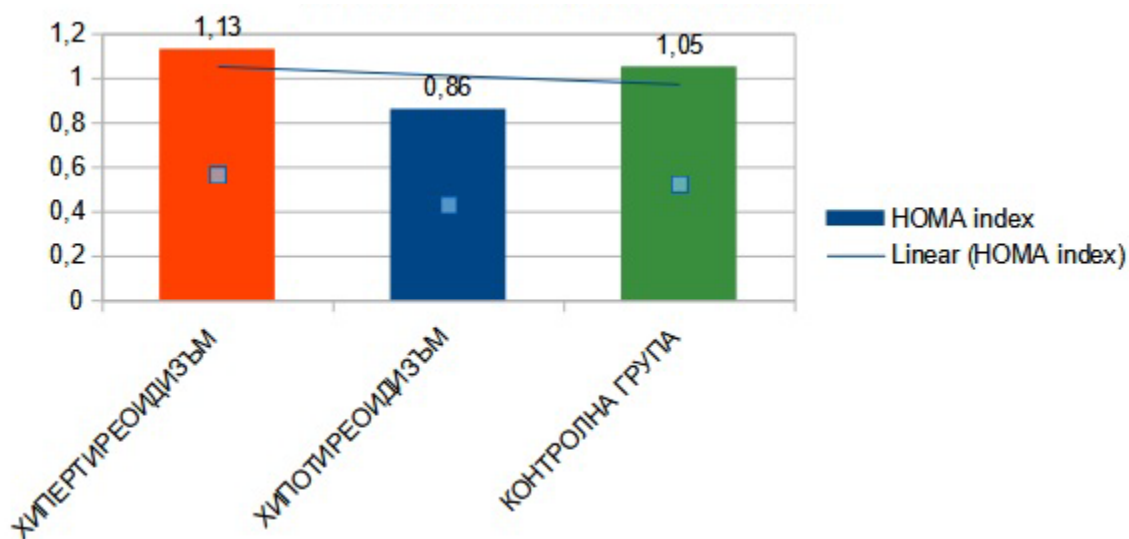
**Фигура 7.** Средни стойности на инсулин (  $\mu\text{IU/ml}$ ) при третиране с Метформин и Емпаглифлозин.

**4. Ефект на Метформин върху НОМА index при мъжки плъхове порода Вистар**



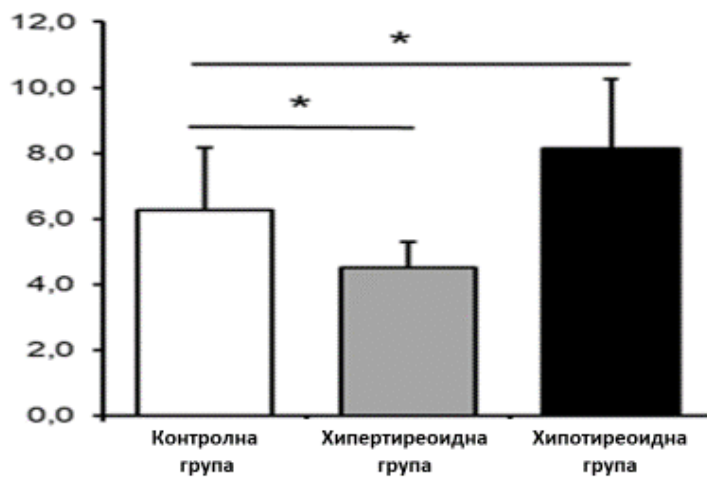
**Фигура 8.** Оценка на НОМА индекс при трите групи тиреоидна дисфункция, след третиране с Метформин. \* $p < 0.05$ .

**5. Оценка на НОМА index при мъжки плъхове Вистар с установена тиреоидна дисфункция и третиране с Емпаглифлозин 5 мг**

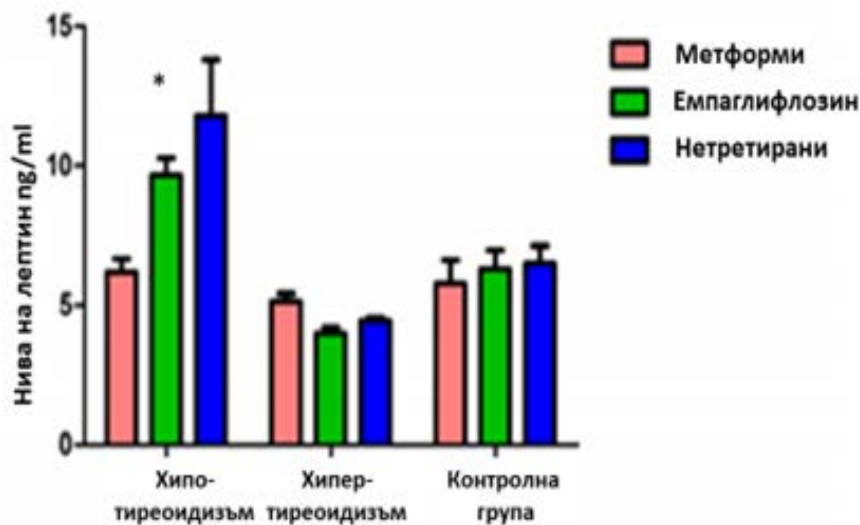


**Фигура 9.** Оценка на НОМА индекс при дисфункция на щитовидната жлеза при мъжки плъхове Вистар, третирани с Емпаглифлозин . \* $p < 0.01$ .

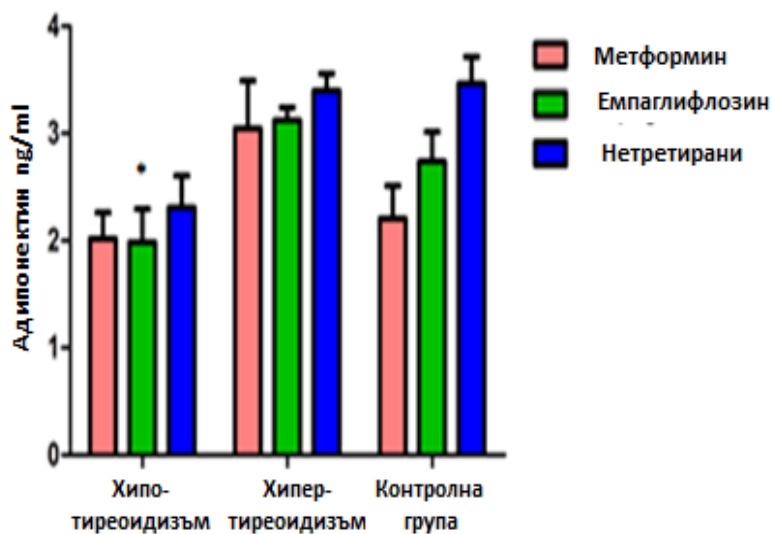
**6. Проучване влиянието на Метформин и Емпаглифлозин върху хормоните, които регулират метаболизма и апетита (адипонектин, лептин и грелин)**



**Фигура 10.** Оценка на средни стойности на лептин за трите групи, \* $p < 0.05$ .

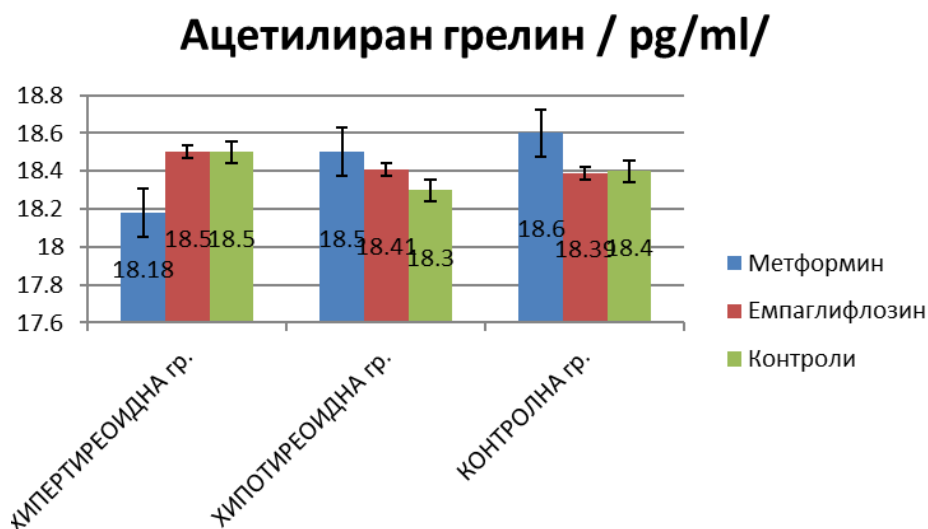


**Фигура 11.** Плазмени концентрации на лептин(ng/ml) в двете групи с тиреоидна дисфункция и контролна група, третирани с Метформин и Емпаглифлозин.



**Фигура 12.** Стойности на Адипонектин ( $\mu\text{g/ml}$ ) в двете групи експериментални животни с тиреоидна дисфункция и контролна група, третирани с Метформин и Емпаглифлозин, \* $p < 0.01$

Резултатите показват статистически значимо понижаване в стойностите на адипонектин при третираните животни, спрямо контролната група, \* $p < 0.01$



**Фигура 13.** Оценка на стойностите на ацетилиран грелин (pg/ml) при експериментален модел на мъжки плъхове Вистар с хипертиреоидна, хипотиреоидна и контролна група, третирани с Метформин и Емпаглифлозин.

## Б. Клинични изследвания

### 1. Научно-изследователския 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

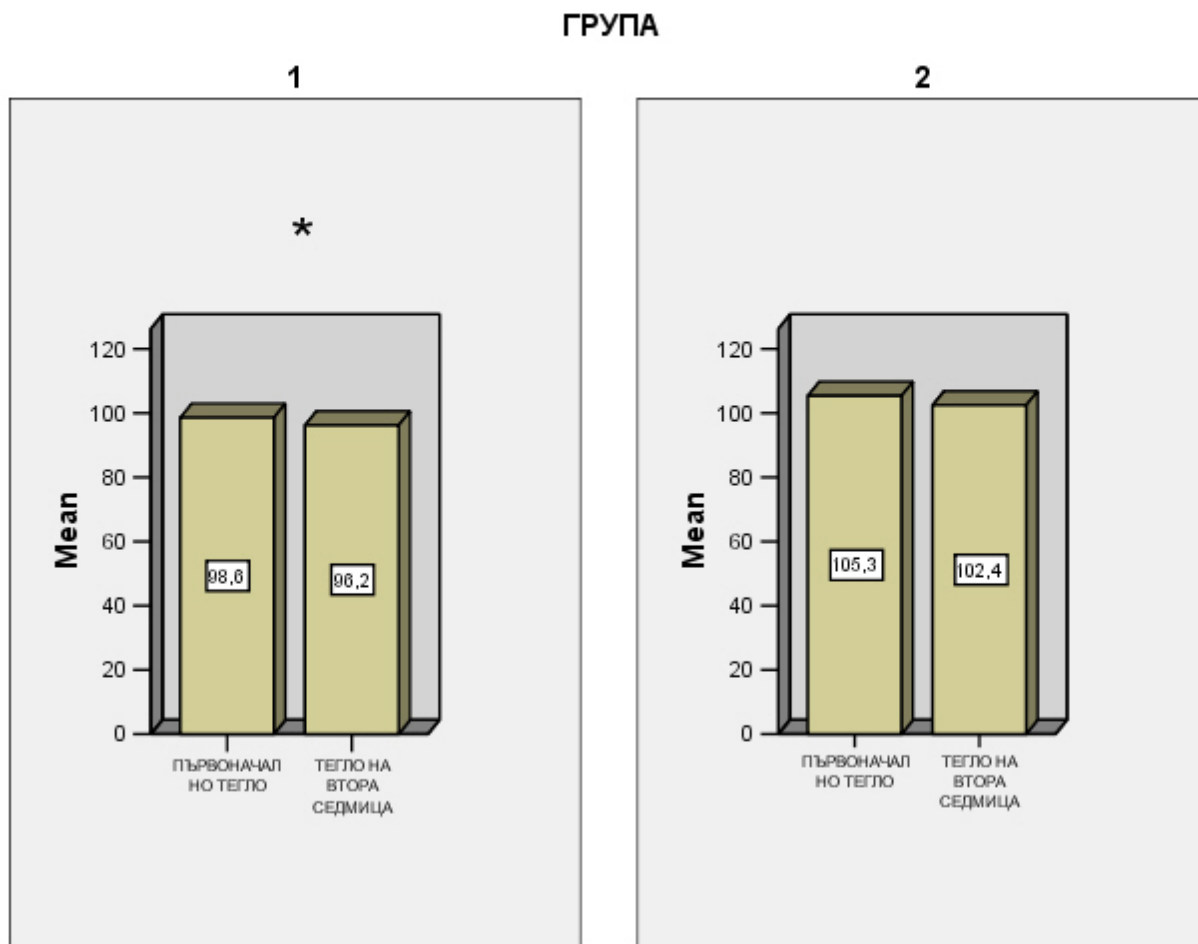
#### Клинични данни от участниците в европейски проект PREVIEW

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.

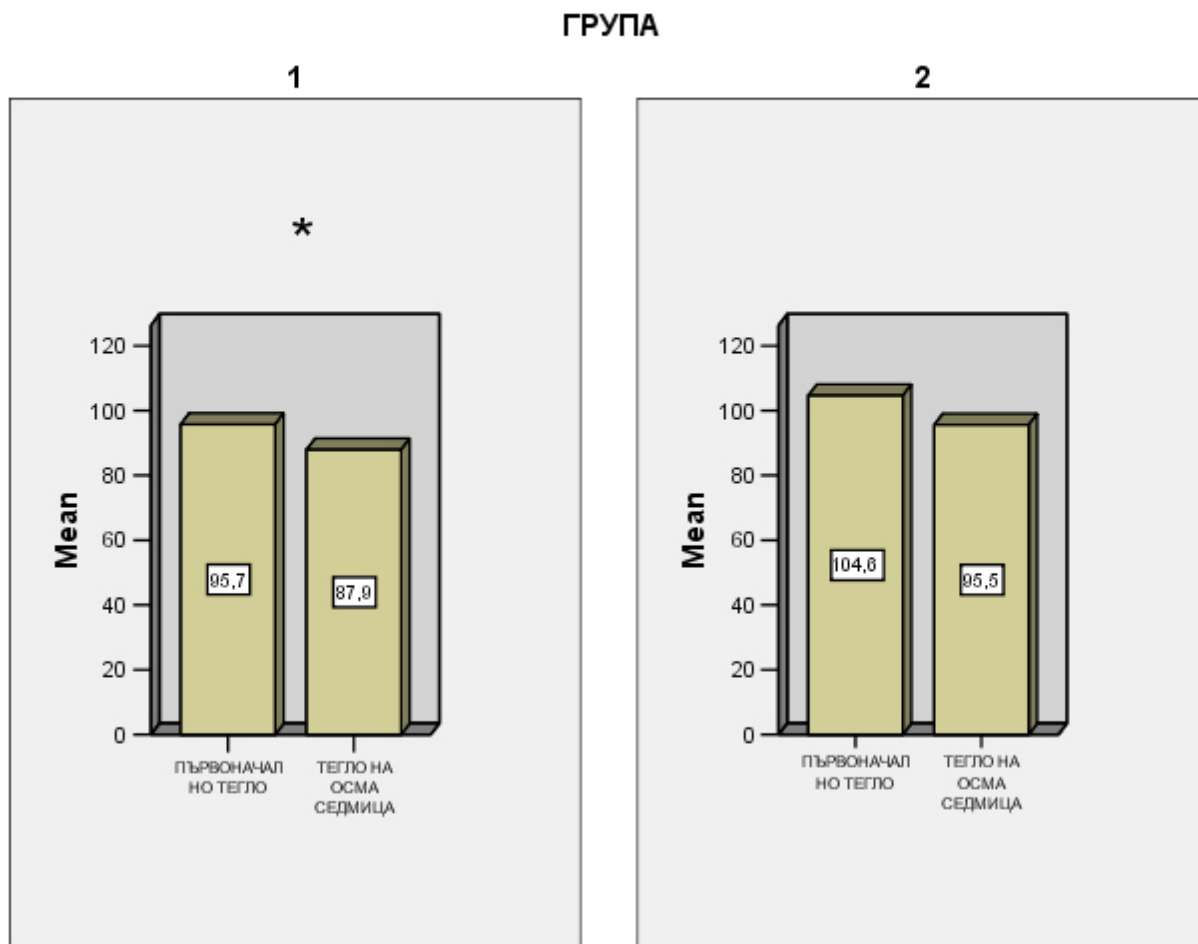
**Проследяване редукцията на телесно тегло при пациенти с хипотиреоидизъм, съпоставени с контролната група (без хипотиреоидизъм). Представените резултати са за българската кохорта**

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  $\mu\text{g}$ , 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 14) и осмата седмица (крайно тегло), (Фигура 15).



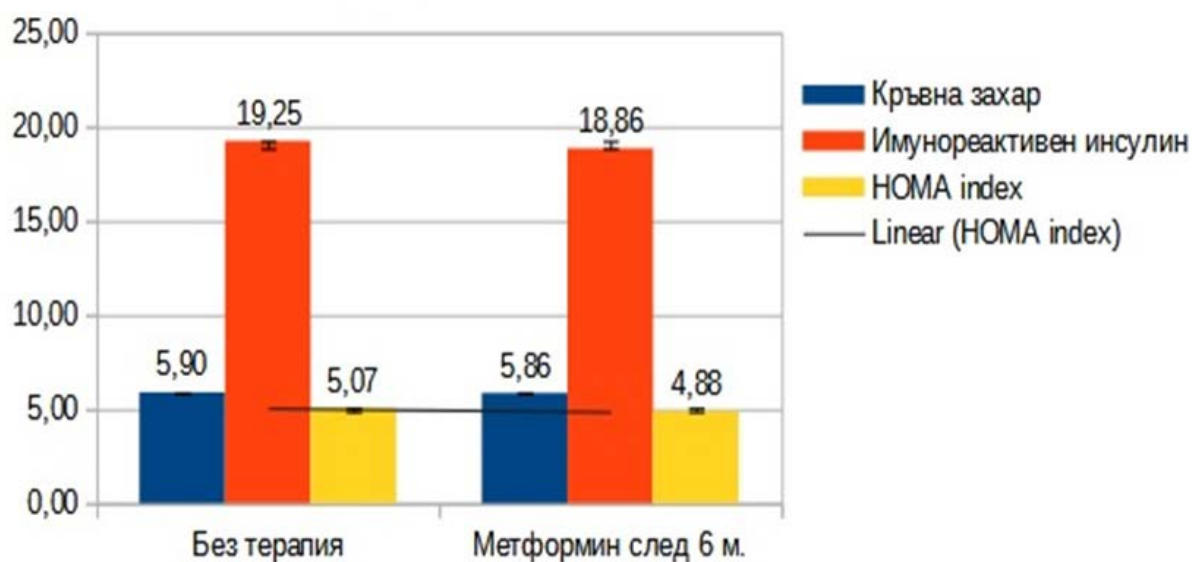
**Фигура 14.** Измерени стойности на телесното тегло (кг) на втората седмица от нискокалорийния хранителен режим. Легенда: 1-ва група- пациенти с лекуван хипотиреозидизъм; 2-ра група- контролна, без патология на щитовидната жлеза.



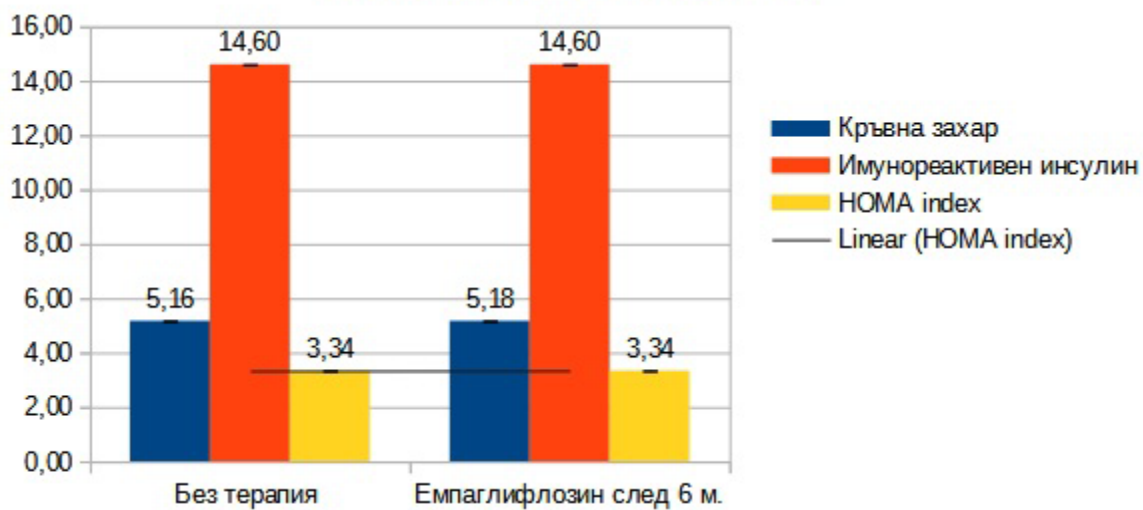
**Фигура 15.** Измерени стойности на телесното тегло (кг) на осмата седмица от нискокалорийния хранителен режим. Легенда: 1-ва група- пациенти с лекуван хипотиреозидизъм; 2-ра група- контролна, без патология на щитовидната жлеза; \*  $p < 0.005$ .

## 2. Резултати от пациентите с еутиреоидна функция на щитовидната жлеза, на фона на известно аутоимунно тиреоидно заболяване.

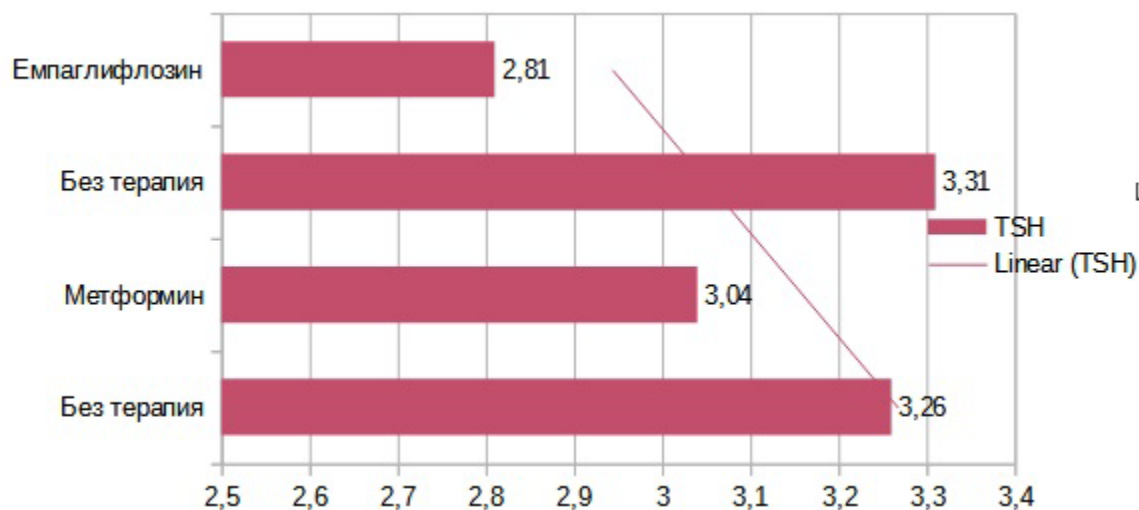
Кохортите от пациентските групи са с оценка на метаболитни маркери на фона на доказано еутиреоидно състояние на щитовидната жлеза за последните 6 месеца. Проследяване на метаболитните показатели при пациенти със затлъстяване, еутиреоиден статус на щитовидна жлеза на фона на провеждано хормонозаместително лечение с Левотироксин.



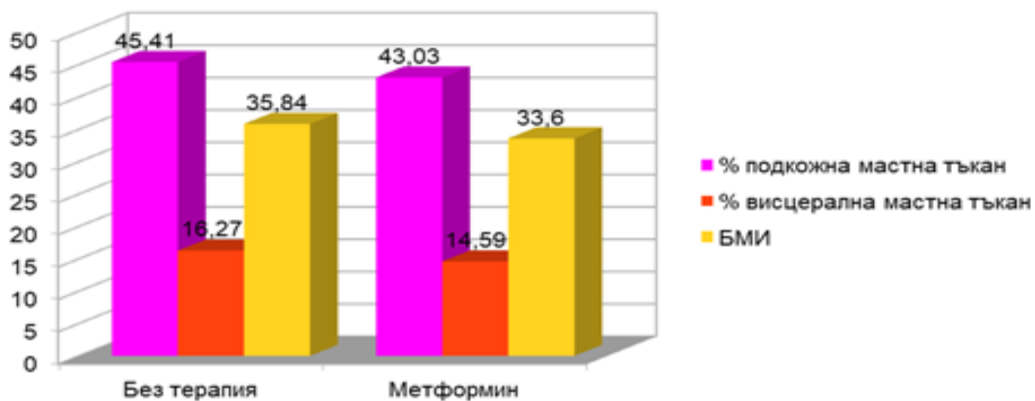
**Фигура 16.** Оценка на кръвна захар, имунореактивен инсулин и HOMA index, при пациенти със затлъстяване и постигнат еутиреоиден статус на щитовидна жлеза на фона на заместително лечение с Левотироксин. Провежданата терапия с Метформин в максимална дневна доза до 2500 гр.



**Фигура 17.** 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.

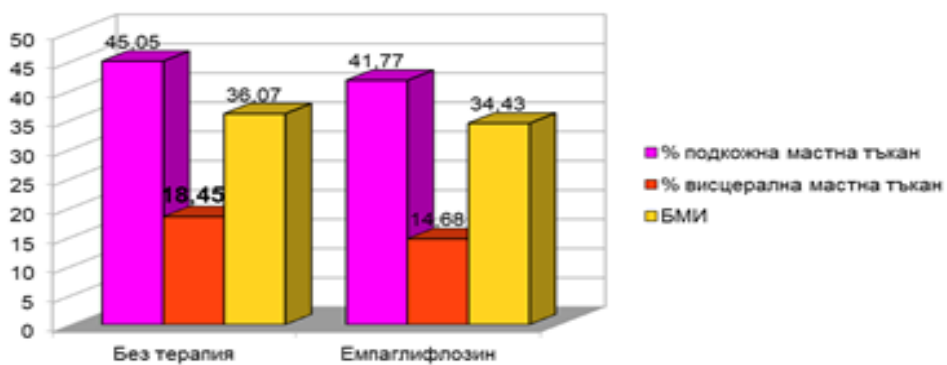


**Фигура 18.** Оценка на TSH при пациенти, провеждащо дългогодишно лечение с Левотироксин и добавена терапия с Метформин и Емпаглифлозин.

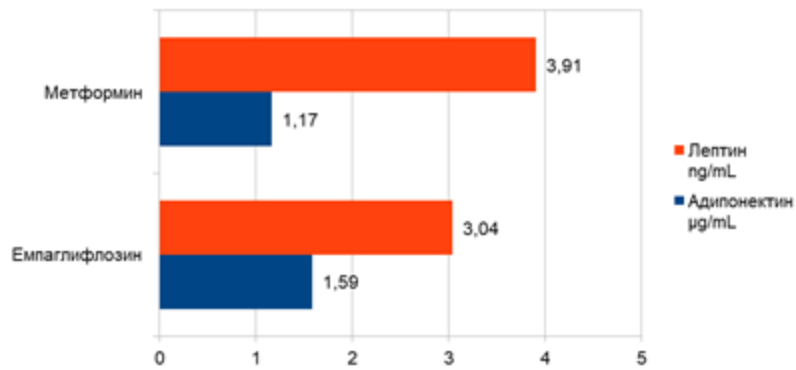


**Фигура 19.** Анализ на телесен състав при пациенти с проведена терапия с Метформин и такива без терапия.

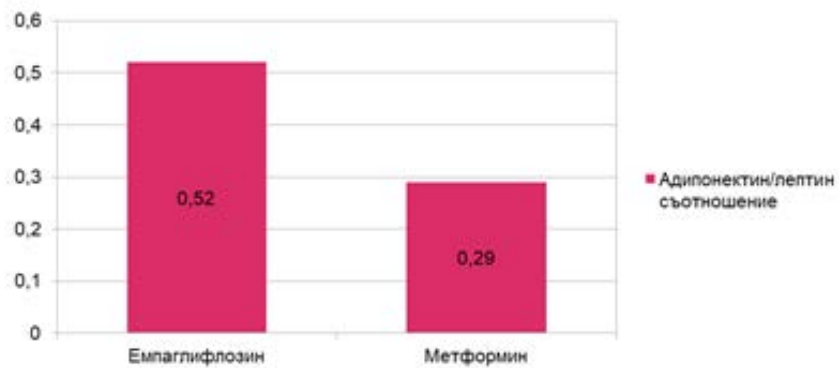
Не се установяват статистически значими промени в двете групи пациенти по отношение на процентното разпределение на висцерална мастна тъкан.



**Фигура 20.** Анализ на телесен състав при пациенти с проведена терапия с Емпаглифлозин и такива без терапия.



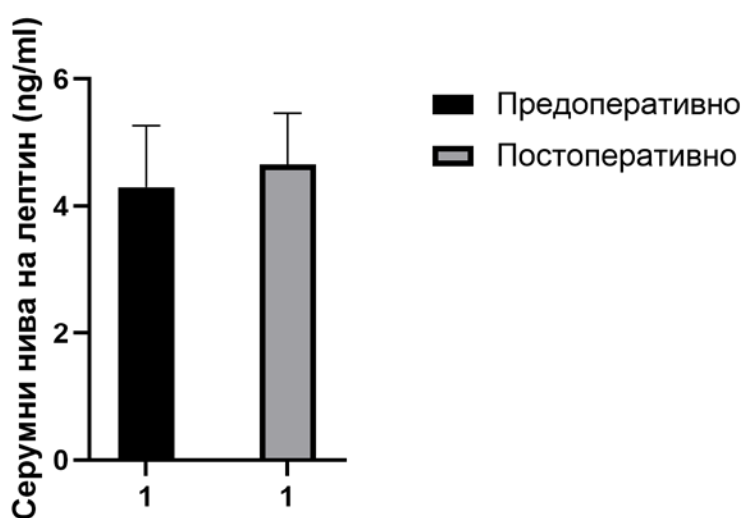
**Фигура 21.** Оценка на лептин и адипонектин при проведена терапия с Метформин и Емпаглифлозин, \*  $p < 0.05$



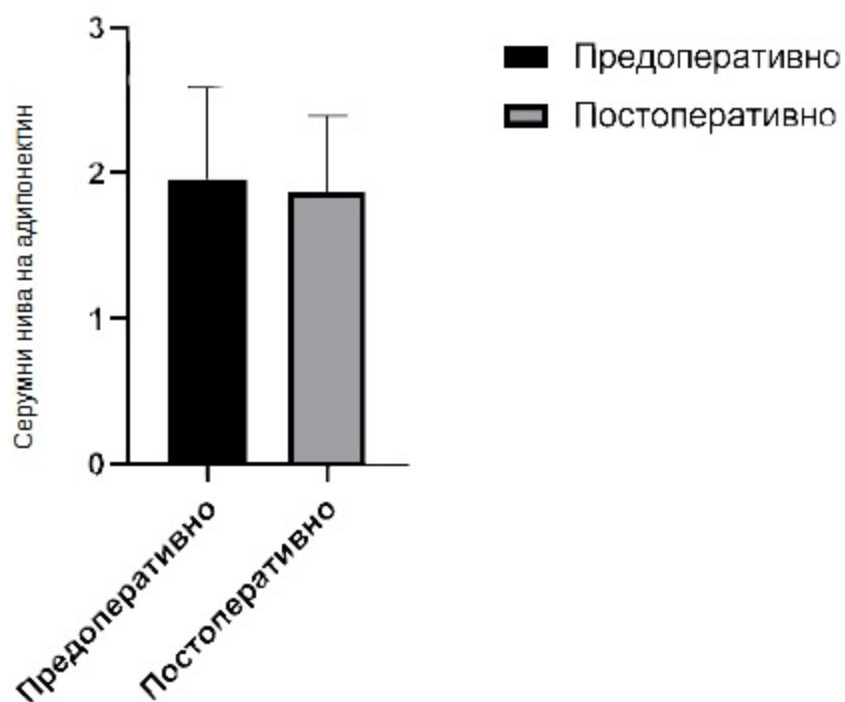
**Фигура 22.** Оценка на съотношението адипонектин/лептин при пациенти със затлъстяване и еутиреоиден статус на щитовидна жлеза.

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

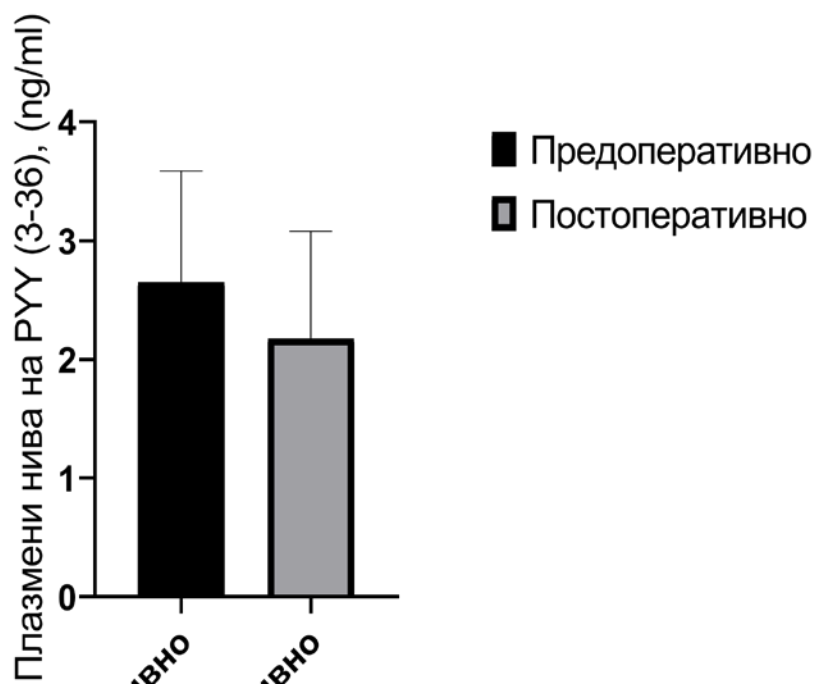
Получените резултати при пациенти след проведена бариатрична процедура отчитат промяна в плазмените/ серумни нива на хормоните, регулиращи апетита. На първия месец след бариатричната интервенция нивата на лептин в кръвта се повишават, докато на адипонектин и на PYY (3-36) намаляват (Фигури 23-25).



**Фигура 23.** Серумни нива на лептин (ng/ml) преди и след операция.

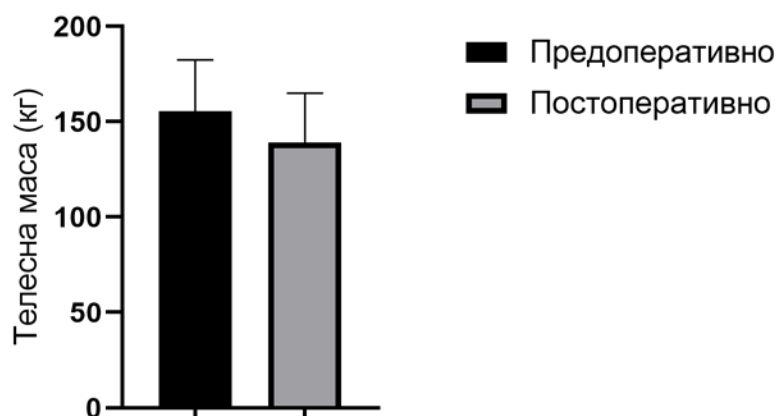


**Фигура 24.** Серумни нива на адипонектин ( $\mu$ /ml) преди и след операцията. Не се установява статистически значима зависимост в двете групи пациенти по отношение на секрецията на адипонектин.

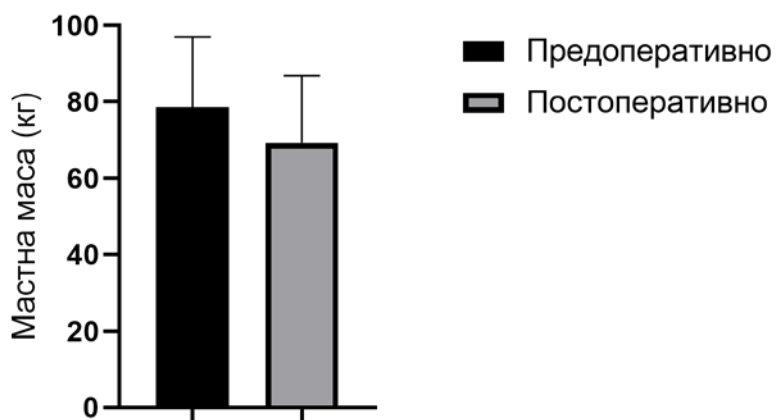


**Фигура 25.** Плазмени нива на PYY (3-36) преди и след операцията

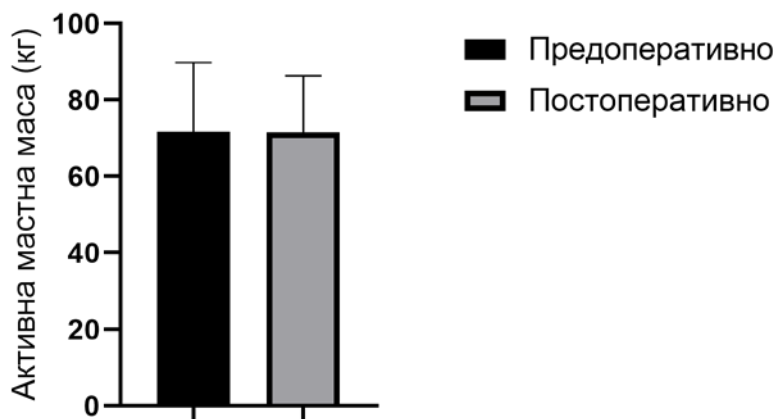
Не се установяват статистически значими разлики в стойностите на телесното тегло (кг), мастната маса (кг) и активната мастна маса (кг) на първия месец след бариатричната интервенция (фигури 26-28). Редукцията на тегло е средно 15 кг на първия месец, което подкрепя данните в литературата (фигура 26).



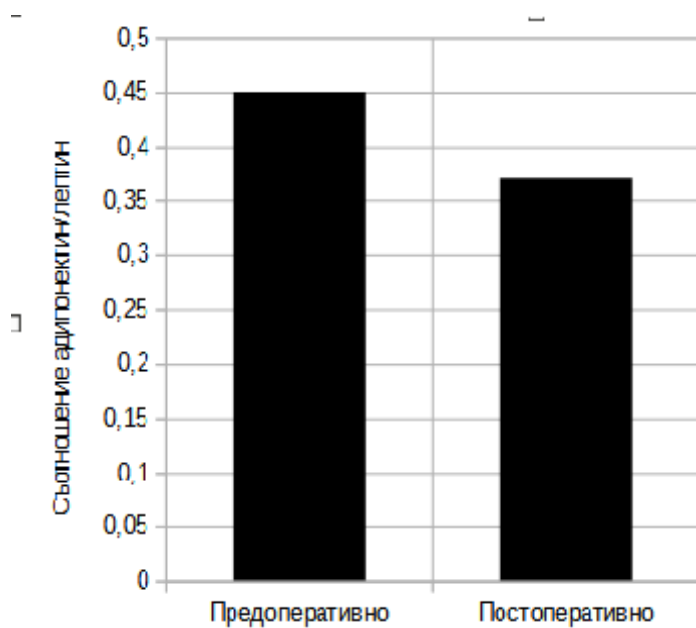
**Фигура 26.** Телесна маса (кг) преди и след операцията.



**Фигура 27.** Масна маса (кг) преди и след операцията.



**Фигура 28.** Активна масна маса (кг) преди и след операцията.



**Фигура 29.** Оценка на съотношението адипонектин/ лептин при пациенти преди и след провеждане на терапия с бариатрична хирургия

## Дискусия

Нашето 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.

Моделите на експериментално индуцираните хипофункция и хиперфункции 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 и на факторите на средата (сезонност, промяна в температурата).

Научните изследвания върху адипонектин в експерименти върху плъхове с модели на тиреоидна патология демонстрират, че при индуцираните хипофункция и хиперфункци 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. 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. Фармакологичните проучвания с Метформин и Емпаглифлозин представят ефектите на веществата, както върху показатели на тегло 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 три 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.

В настоящото научно проучване се фокусира върху посочените хормони и влиянието на фармакологични средства върху механизмите на затлъстяване. Ние фокусираме върху хормона адипонектин, защото е доказано, че ендокринната функция на мастната тъкан е свързана със секрецията на адипокините – представител адипонектин. Ние установихме промени в нивата на адипонектин при пациенти със затлъстяване. Терапията с Метформин и Емпаглифлозин понижи нивата на адипонектин.

Проучванията върху грелин са задачи на настоящите експериментални и клинични изследвания. Резултатите от изследвания на ацетилиран грелин в кръв на мъжки плъхове с експериментален модел на хипертиреоидизъм 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. 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.

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. 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 и понижени нива в кръвта на адипонектин<sup>1</sup>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 адипонектини 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.

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 тегло 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 теглото и телесния състав, така и върху метаболитните промени, свързани с регулацията на апетита и глада.

## **ИЗВОДИ**

1. Доказани са промени във въглехидратната обмяна на мъжки плъхове с патологични нарушения на функцията на щитовидната жлеза.
2. Установени са повишени нива на лептин в кръвна плазма на плъхове с експериментален модел на хипотиреоидизъм.
3. Определени са промените в плазмените нива на лептин на плъхове с експериментален хипертиреоидизъм. Хроничното въвеждане на тироксин на мъжки плъхове намалява плазмения лептин.

4. 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.
5. Резултатите от клиничните изследвания дават основание да се допусне ролята на нарушената функция на щитовидната жлеза в развитието на предиабет със затлъстяване.
6. 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.
7. Съотношението адипонектин/лептин е надежден биомаркер на адипозната дисфункция, който може и да бъде съотнесен към промени в тиреоидната секреция.
8. 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.
9. Бариатричната 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.

## **ПРИНОСИ**

### **Собствени приноси**

1. За първи път се изследва на ефекта на Емпаглифлозин върху адипонектин и лептин при плъхове с индуцирани нарушения на щитовидната жлеза.
2. Получени са данни, документиращи съотношението адипонектин/лептин като сърдечно-съдов маркер при еутиреоидни пациенти на фона на разгърнат метаболитен синдром.

3. За първи път в България се прави сравнение на ефектите върху адипокините при пациенти след бариатрична хирургия и такива със затлъстяване и прилагане на фармакологични средства.

#### **Потвърдителни приноси**

4. Разработени и стандартизирани са два модела на медикаментозни индуцирани хипертиреоидизъм и хипотиреоидизъм на плъхове порода Вистар.

5. Получени са данни за промени в плазмените нива на лептин, адипонектин и грелин на плъхове порода Вистарг с нарушена секреция в тиреоидната функция.

6. Резултатите от нашите изследвания биха допринесли за разработването на нови терапевтични стратегии в лечението на инсулиновата резистентност, затлъстяването и оценката на придружаващия сърдечно-съдов риск посредством съотношението адипонектин/лептин като биомаркер.

#### **Публикации, свързани с дисертационния труд**

**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, 2020

**Миронова Д, Гроздев К, Ханджиева-Дърленска Т.** Регулация на апетита и контрол на телесното тегло след бариатрична хирургия, *Наука Ендокринология*, 53-59, 2, 2019

**Миронова Д, Григоров Е, Ханджиева-Дърленска Т.** Емпаглифлозин - нов клас антидиабетен медикамент за лечение на захарен диабет тип II, съпроводен със затлъстяване, *Медицински преглед*, 59-65, 2018

**Миронова Д, Ханджиева-Дърленска Т.** Роля на хормоните лептин, адипонектин и грелин в патогенезата на инсулиновата резистентност, *Наука Ендокринология*, 3, 5-10, 2016.

## **Курсове, участия в конгреси, свързани с дисертационния труд**

**Курс** „Методология на дисертационния труд“, „Докторантско училище“-  
Медицински Университет София, 23.11.2020- 04.12.2020

**Mironova D., Handjieva-Darlenska T., N. Boyadjieva.** Improvement of female reproductive outcomes after Liraglutide application BA EU EAST AND SOUTH OBESITY EXPERT PANEL MEETING, Warsaw (Poland), 2019.

**Mironova D., Handjieva-Darlenska T., N. Boyadjieva,** Leptin/Adiponectin ratio alterations in male Wistar rats with hypothyroidism after SGLT2 inhibitors application. European Congress of Obesity 2019, Glasgow (Scotland), 2019, <http://eco2019.org/>. Постер № LBP2.10, ObesityReviews, 2019.

**Mironova D., Handjieva-Darlenska T., N. Boyadjieva,** Hypothyroidism leads to leptin alterations in male Wistar rats Hypothyroidism leads to leptin alterations in male Wistar rats“, 25th European Congress on Obesity, Vienna (Austria), <https://eco2018.easo.org/>., Постер № T1P55, ObesityReviews, 2018.

**Миронова Д, Ханджиева-Дърленска Т.,** "Ефект на Емпаглифлозин върху телесното тегло на мъжки плъхове порода Wistar с експериментално индуциран хипотиреоидизъм", 6th Congress of Pharmacy 13-16 октомври 2016.

**Mironova D., Handjieva-Darlenska T.,** Experimental model of hypothyroidism in male Wistar rats, International Congress of Medical Sciences (ICMS) 2016, 12.05-15.06.2016.

## **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.

## **Summary**

“Pharmacological assessment on hormonal dysfunction in thyroid disorders”

## **Introduction**

The thyroid gland plays an important role in energy homeostasis. Thyroid hormones are also crucial for the regulation of total energy consumption and body composition besides their roles in normal growth, development and reproduction. Studies have suggested a positive correlation between serum thyroid stimulating hormone (TSH) levels and body mass index (BMI) as thyroid dysfunction is associated with weight changes. Leptin and adiponectin secreted by the adipose tissue act in conjunction with thyroid hormones. The aim of our study is to follow the effects of thyroid disorders on the hormones of adipose tissue and to investigate whether anti-diabetic drugs, Metformin and Empagliflozin, lead to changes in leptin, adiponectin and their ratio in an animal model and patients with obesity.

## **Materials and methods**

Forty-five male Wistar rats were randomly assigned into three groups for 8 weeks: group I (experimental hyperthyroidism), group II (experimental hypothyroidism) and group III (control). Hyperthyroidism was caused by Levothyroxine (300 µg/kg body weight), and hypothyroidism, by 10 mg/kg/day (1 mL/250 g) propylthiouracil in drinking water. Then,

group I and II were subdivided into: Metformin treatment (350 mg/kg/per day), Empagliflozin treatment (10 mg/kg/d p.o) and a control group on a chow diet for another four weeks. The rats were sacrificed. Fasting plasma Thyroid Stimulating Hormone, fT3, fT4, leptin and adiponectin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The adiponectin/leptin ratio was calculated. Data of patients with morbid obesity after bariatric surgery were followed and changes in adiponectin/leptin ratio were observed and cardiovascular risk was assessed. They were compared with the results of adipokine hormones levels- of patients with obesity and euthyroid status. The results showed higher plasma TSH, fT4 in the hypothyroid group than in the hyperthyroid group. Hypothyroid rats had increased leptin and decreased adiponectin concentration, suggesting disturbed metabolic functions independent of body weight. Both, Metformin and Empagliflozin, reduced adiponectin and leptin levels in our model of hypothyroidism; however, the adiponectin/leptin ratio decreased. This animal model of hypo- and hyperthyroidism is an effective experimental setting to study adipokine hormone variations and pharmacological interventions.