

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ**

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ, ГЕНЕТИЧНИ И ГЕННО -  
ЕКСПРЕСИОННИ ПРОУЧВАНИЯ НА ГЛЮКОЗНАТА  
ХОМЕОСТАЗА И ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА  
СТЕПЕН „ДОКТОР“

**НА Д-Р ИВЕЛИНА ДИМИТРОВА МИХАЛЕВА**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ: ДОЦ. Д-Р ПАВЛИНА ГАТЕВА, ДМ**

**ПРОФ. Д-Р ИВАНКА ДИМОВА, ДМ**

СОФИЯ

2022 г.

## СЪДЪРЖАНИЕ

Съкращения.....	4
Въведение.....	9
Глава Първа – Литературен обзор.....	13
1.1. Регулация на глюкозната хомеостаза.....	13
1.2. Инсулин.....	16
1.2.1. Структура и синтез на инсулин.....	16
1.2.2. Секреция на инсулин.....	17
1.2.3. Механизъм на действие на инсулина.....	19
1.2.4. Особености в анатомията на панкреаса и на гените за инсулин при гризачи.....	20
1.3. Захарен диабет тип 2.....	21
1.3.1. Определение.....	21
1.3.2. Епидемиология на ЗД.....	22
1.3.3. Класификация на ЗД.....	23
1.3.4. Диагноза на ЗД.....	23
1.3.5. Патогенеза на ЗД.....	24
1.4. ЗД и сърдечно-съдови заболявания.....	27
1.5. Роля на някои маркери, включително и генетични, за определяне на риска от сърдечно-съдови заболявания при ЗД тип 2.....	29
1.5.1. Роля на фибриноген.....	31
1.5.2. Роля на метилентетраhydrofolат редуктаза (MTHFR).....	32
1.5.3. Роля на фактор V Leiden.....	33
1.5.4. Роля на PAI-1.....	33
1.5.5. Роля на гликопротеин GP IIb/IIIa.....	34
1.5.6. Роля на протромбин.....	34
1.5.7. Роля на фактор XIII.....	34
1.5.8. Роля на PAAC.....	35
1.5.9. Роля на apoB и apoE.....	35
1.6. Генна експресия и епигенетика.....	36
1.6.1. Самоподдържащи се метаболитни вериги.....	37
1.6.2. Некодиращи РНК (ncRNA – non-coding RNA).....	37
1.6.3. ДНК метилиране.....	39
1.6.4. Модификация на хистоните.....	39
1.6.5. Регулация на хроматина.....	41
1.7. Захарен диабет, сърдечно-съдови заболявания и епигенетика.....	41
1.7.1. Метаболитен синдром и епигенетика.....	41
1.7.2. Сърдечно-съдови усложнения при ЗД.....	43
1.7.2.1. Damage-associated molecular patterns (DAMPs).....	43
1.7.2.2. Neutrophil extracellular traps (NETs).....	45

1.7.2.3. Хиперхомоцистеинемия.....	46
1.7.2.4. Ендотелна дисфункция.....	46
1.8. Роля на някои miRNA в развитието на сърдечно-съдови усложнения и ЗД.....	48
1.9. Експресия на някои съдово-ендотелни маркери при ЗД тип 2.....	53
1.9.1. Ендотелни прогениторни клетки.....	53
1.9.2. Влияние на хипергликемията върху съдовото увреждане.....	54
1.9.3. Роля на VEGF и неговите рецептори.....	55
1.9.4. ЕРС при захарен диабет и неговите усложнения.....	56
1.10. Влияние на витамин D и кетогенната диета върху показатели на метаболитния синдром.....	59
1.10.1. Роля на витамин D.....	59
1.10.2. Роля на кетогенната диета.....	65
Глава втора – Научна хипотеза, цел и задачи.....	70
2.1. Цел на проучването.....	70
2.2. Задачи на проучването.....	71
Глава трета – Материали и методи.....	72
3.1. Изследване на генетични варианти, свързани със сърдечно-съдов риск при пациенти със ЗД тип 2.....	72
3.2. Анализ на нивото на някои miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2.....	80
3.3. Анализ на експресията на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2.....	87
3.4. Анализ на ефектите на кетогенната диета и на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром.....	89
Глава четвърта – Резултати.....	96
4.1. Резултати от изследването на генетични варианти, свързани със сърдечно-съдов риск при пациенти със ЗД тип 2.....	96
4.1.1. Резултати от генотипирането на фактори за вродена тромбофилия.....	98
4.1.1.1. Резултати от генотипирането на Фактор V Leiden и HR2.....	100
4.1.1.2. Резултати от генотипирането на Протромбин.....	100
4.1.1.3. Резултати от генотипирането на PAI-1.....	100
4.1.1.4. Резултати от генотипирането на Фактор XIII.....	100
4.1.1.5. Резултати от генотипирането на $\beta$ -fibrinogen.....	100

4.1.1.6. Резултати от генотипирането на HPA1 (гликопротеин GP IIb/IIIa).....	101
4.1.2. Резултати от генотипирането на MTHFR.....	103
4.1.3. Резултати от генотипирането на ACE.....	104
4.1.4. Резултати от генотипирането на ApoB.....	105
4.2. Резултати от анализа на експресионните нива на някои miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2.....	106
4.3. Резултати от анализа на експресията на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2.....	108
4.4. Резултати от анализа на ефектите на кетогенната диета и на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром.....	111
Глава пета – Обсъждане.....	120
5.1. Роля на генетичните варианти, свързани със сърдечно-съдов риск при пациенти със ЗД тип 2.....	120
5.2. Роля на експресионните нива на miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2.....	123
5.3. Експресия на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2.....	127
5.4. Ефекти на кетогенната диета и на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром.....	129
Глава шеста – Изводи.....	134
Глава седма – Приноси.....	136
Библиография.....	137

## СЪКРАЩЕНИЯ

АТФ – аденозин трифосфат

АХ - артериална хипертония

ВГТТ - венозен глюкозо-толерантен тест

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

ДПНП - диабетна полиневропатия

ЗД – захарен диабет

ИТМ - индекс на телесна маса

иРНК - информационна РНК

КАБ - коронарна артериална болест

кДНК - комплементарна ДНК

КЗГ - кръвна захар на гладно

МИ - миокарден инфаркт

ОГТТ – орален глюкозо-толерантен тест

РААС - ренин-ангиотензин-алдостеронова система

РНК - рибонуклеинова киселина

СЗО - Световна здравна организация

СМК - свободни мастни киселини

СН - сърдечна недостатъчност

ССЗ - сърдечно-съдови заболявания

ТГ- триглицериди

ФИ - фракция на изтласване

ХБЗ - хронично бъбречно заболяване

ЦЕК - циркулиращи ендотелни клетки

ЦНС – централна нервна система

$\beta$ -МЕ -  $\beta$ -Mercaptoethanol

АСЕ - ангиотензин конвертиращ ензим

AGEs - advanced glycation end products – крайни продукти на гликирането

Аро – аполипопротеин

BNP - B-type natriuretic peptide

CCL 2 - C-C motif chemokine ligand 2

СЕТР - cholesterol ester transfer protein

СрG - цитозин-фосфат-гуанин

CRP - C-reactive protein

DAMPs - damage-associated molecular patterns

DNMT – ДНК метилтрансферази

ECFC - endothelial colony forming cells - ендотелни колония-формиращи клетки

eNOS - endothelial nitric oxide synthase

EPC - endothelial progenitor cells - ендотелни прогениторни клетки

FVL - фактор V Leiden

GIP - gastric inhibitory polypeptide - гастро-инхибиторен полипептид

GLP-1 - glucagon-like peptide-1 - глюкагоноподобен пептид 1

GWAS - genome-wide association study

HATs - histone acetyltransferases

HbA1c – гликиран хемоглобин

HDACs - хистонови деацетилази

HDL - high density lipoprotein

HIF – hypoxia-inducible factor

HMGB-1 - high mobility group box 1

HMTs - хистонови метилтрансферази

HRP - horseradish peroxidase

HUVEC – human umbilical vein endothelial cells - човешки ендотелни клетки от умбиликалната вена

IDF – International Diabetes Federation - Международна диабетна федерация

IGF-1 - insulin-like growth factor 1

IL-1 $\beta$  - интерлевкин 1 $\beta$

IL-6 – интерлевкин 6

iNOS - inducible nitric oxide synthase - индуциращата форма на NOS

IRS-1 - инсулин-рецепторен субстрат 1

LDL - low density lipoprotein

lncRNA - long non-coding RNA - дълги некодиращи РНК

LVMI - left ventricular mass index

MAP киназа - mitogen-activated protein киназа

MCP1 - monocyte chemotactic protein 1

miRNA – микроРНК

MODY - Maturity Onset Diabetes of the Young

MTHFR - Methylene tetrahydrofolate reductase

NAD - nicotinamide adenine dinucleotide

NHANES III - The Third National Health and Nutrition Examination Survey

NOD - non-obese diabetic mice

ncRNA – non-coding RNA

NETs - neutrophil extracellular traps

NF- $\kappa$ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO - азотен оксид

NOS - азотен оксид синтаза

NYHA - New York Heart Association

OASIS - Organization to Assess Strategies for Ischaemic Syndromes

PAD4 – peptidylarginine deiminase 4

PAI-1 - plasminogen activator inhibitor-1

PCR - полимеразна верижна реакция

PKC $\beta$ II - протеин киназа C  $\beta$ II

PI3-киназа - фосфатидилинозитол 3-киназа

PPAR - peroxisome proliferator – activated receptor

RAGE –receptor for advanced glycation end products

Ras - Rat sarcoma oncogene

ROS - reactive oxygen species

RQ - relative quantification

SCF – stem cell factors - стволовоклетъчни фактори

SCFA - късоверижни мастни киселини

SCN - супрахиазматично ядро

SDF-1 - stromal-derived factor 1

TNF- $\alpha$  - tumor necrosis factor alpha

tPA - tissue plasminogen activator - тъканен плазминогенен активатор

VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule

VDR – vitamin D receptor - рецептор за витамин D

VDRE - витамин D респондери елементи

VEGF - Vascular endothelial growth factor

VEGFR – рецептор за VEGF

VLDL - very low density lipoprotein

## ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет е хронично метаболитно, но и социално-значимо заболяване, което показва тенденция за все по-широко разпространение в световен мащаб. Според последните данни на Международната диабетна федерация през 2021 г. броят на хората с диабет в света е 537 милиона във възрастта 20-79 години. През 2030 г. се очаква той да достигне 643 милиона, а през 2045 г. – 783 милиона, което представлява нарастване с 46%. От друга страна, съществува силна връзка между диабета и сърдечно-съдовите заболявания, които са водеща причина за морбидност и смъртност сред диабетната популация. Установено е, че атеросклеротичният процес настъпва в по-ранна възраст и има по-обширно засягане при пациентите със захарен диабет. Сърдечно-съдовите заболявания настъпват средно с около 10-15 години по-рано при пациенти с диабет. Изчислено е, че около 2/3 от хората със захарен диабет тип 2 ще починат от някаква форма на сърдечно-съдово заболяване.

Повишеният тромботичен риск и преждевременната атеросклероза са ключови фактори за повишения сърдечно-съдов риск при диабет. Захарният диабет се характеризира с количествени и качествени промени в коагулационните протеини, които колективно повишават резистентността към фибринолизата, което съответно увеличава риска от тромбоза. Много съвременни проучвания показват, че генетичните рискови резултати вече в някои случаи биха могли да надминат традиционните рискови фактори при прогнозиране на риска. Генетичните рискови резултати започват да се включват все по-активно в клиничната практика. Оценката на риска на базата на единични генетични варианти показва устойчива способност за идентифициране на пациенти с висок риск, което води до подобрене и “реклаифициране” на риска. Такива проучвания, които биха могли да моделират протичането на заболяванията, показват, че генетичните фактори осигуряват допълнително силна оценка на риска при всички заболявания, като се явяват значима добавка към традиционните рискови фактори. По този начин най-новите генетични оценки на риска показват значителни подобрения в ефективността при прогнозиране на риска от сърдечно-съдови инциденти. В тази връзка е от особено важно значение да се идентифицират генетичните фактори, които биха могли да допринасят за увеличаване на сърдечно-съдов риск при пациентите със захарен диабет.

Съществуват данни, че регулацията на генната експресия е от съществено значение. Тя оказва влияние върху времето, мястото и количеството на определения генен продукт в дадена клетка и може да има ефект върху клетъчната структура и функция. Регулацията на генната експресия е основата за клетъчната диференциация, развитие, морфогенеза и адаптивността на всеки организъм. Установено е, че факторите на средата, външни и вътрешни, играят важна роля в определянето на функцията и варибилността на клетките. Повечето клетки имат различна степен на фенотипна пластичност, а от друга страна фенотипът, определен от генотипа, зависи от външни фактори. Епигенетичните модификации представляват унаследяеми промени във функциите на гените, които се появяват без да има промяна в нуклеотидната последователност. Те са потенциално обратими. Унаследените или спорадични епимутации, или нарушаване на регулацията на епигенома, могат да доведат до развитие на заболяване. Епигенетичните механизми може би играят съществена роля във все още липсващите унаследяеми детерминанти на комплексни заболявания като метаболитния синдром, атеросклерозата, артериалната хипертония, захарния диабет. Епигенетичните вариации са специфични, динамични и разнообразни. Предполага се, че епигенетични механизми играят важна роля не само в развитието, но и в предиспозицията към метаболитни заболявания като захарен диабет тип 2. От друга страна съществуват данни, които подкрепят факта, че епигенетични процеси участват както в прогресията на плаките, така и в тяхното появяване при атеросклероза. Заключение е, че патогенетичните пътища, които са отговорни за развитието на захарен диабет тип 2 и сърдечно-съдови заболявания може би също имат епигенетичен произход и е важно тези епигенетични детерминанти, които участват в развитието и прогресията на тези заболявания да бъдат установени и изучени по-задълбочено. Установена е връзка на промените в нивата на циркулиращите miRNA с определени физиологични състояния. Но нивата на циркулиращите miRNA могат да варират и при различни заболявания. Тяхната експресия е различна при здрави хора и при такива със сърдечно-съдови заболявания. Предполага се, че miRNA могат да се използват и като биомаркери за диагнозата и прогнозата на съдовото ангажиране при болни от диабет пациенти, поради което установяването им е от много важно значение.

Известно е, че хипергликемията при захарен диабет води до увреждане на кръвоносните съдове и до поява на усложнения на заболяването. Ендотелните прогениторни клетки (ЕРС) участват във възстановяването на ендотела и в процеса на ангиогенеза чрез секретирание на ангиогенни фактори или чрез инкорпориране в нарушения ендотел и диференциране в ендотелни клетки. Те се определят като основни участници в поддържането на ендотелната хомеостаза. ЕРС експресират различни маркери върху клетъчната си повърхност, които са подобни на тези на съдовите ендотелни клетки. Установено е, че балансът на нивата на ЕРС отразява здравния статус на ендотела. Аберантни техни нива в периферната кръв са открити при различни клинични състояния като сърдечно-съдови, метаболитни, белодробни, онкологични, а също и при атеросклероза. Хипергликемията и ендотелната дисфункция са основните причини за съдовите усложнения при пациенти със захарен диабет. Необходимо е да се изучи експресията на съдово-ендотелните маркери, които имат отношение към развитието на диабета и възникването на неговите усложнения.

Освен участие в регулацията на калциево-фосфорната хомеостаза в организма, витамин D притежава и много други роли. Адекватното ниво на витамин D намалява оксидативния стрес, подобрява митохондриалните и ендокринните функции като по този начин редуцира риска от някои нарушения в организма като автоимунитет и някои метаболитни заболявания. Витамин D участва в регулацията на епигенетични механизми, което представлява допълнителен начин за модулиране на генната експресия. От друга страна, дефицитът на витамин D води до промяна в инсулиновите синтез и секреция при животински модели и при хора. Той може да предразположи към нарушение в глюкозния толеранс, нарушена инсулинова секреция и захарен диабет тип 2. Възстановяването на нивото на витамин D подобрява гликемията и инсулиновата секреция при пациенти с диабет тип 2 с установена хиповитаминоза D, като това предполага ролята му в патогенезата на заболяването. От друга страна, честотата на провокираните от диетата метаболитни състояния непрекъснато се увеличава и това дава да се проучат точните механизми, които водят до тези промени. Кетогенната диета представлява нисковъглеводороден, високомазнинен начин на хранене, който намира приложение при различни състояния - тя е подходяща за потискане на гърчовата активност при деца с рефрактерна епилепсия; евентуални терапевтични ползи от кетогенната диета са изучавани и в други неврологични състояния като болест на Алцхаймер, амиотрофична латерална склероза, главоболие, болест

на Паркинсон, а също и при някои видове рак, гликогенози, синдром на поликистозни яйчници и много други. Ограничаването на въглехидратите, приемани с храната, има позитивни ефекти върху сърдечно-съдовите параметри, намалява затлъстяването и подобрява метаболитния синдром. Съществуват данни, че кетодиетата води до намаляване на нивата на глюкозата и подобрява инсулиновата чувствителност. С оглед на изнесените по-горе данни е интересно да се установи влиянието на витамин D и на кетогенната диета върху експресията на инсулина и върху някои параметри на метаболитния синдром.

В светлината на данните от различни проучвания става ясно, че пациентите със захарен диабет тип 2 са с повишен сърдечно-съдов риск, развиват различни тежки микро – и макроваскуларни усложнения, а също така имат и промени в някои метаболитни показатели в сравнение със здравите хора. В тази връзка са установени различни маркери, които в голяма степен допринасят за увеличаването на тези рискове, а именно генетични, епигенетични, съдово-ендотелни. От друга страна, все по-често се коментира участието на някои диетични режими като кетогенната диета и на витамин D, които пък биха имали позитивно влияние върху глюкозната хомеостаза. От съществено значение е да се положат усилия да бъдат идентифицирани тези маркери с оглед откриването на хората в риск да развият заболяването, а също така и своевременно да могат с тяхна помощ да се вземат мерки за намаляване честотата на развитие на сърдечно-съдовите усложнения на захарния диабет.

# ГЛАВА ПЪРВА

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### 1.1. Регулация на глюкозната хомеостаза

Глюкозният метаболизъм е от особено важно значение за правилното функциониране на организма. Глюкозата освен енергиен източник е и субстрат за множество биологични реакции. При физиологични условия глюкозните нива в кръвта се променят в изключително тесни граници въпреки редуването на периоди на гладуване с прием на храна. Тази стабилност е резултат от балансирания хормонален контрол върху съхраняването и синтеза на глюкоза.

Мозъкът използва около 120 г глюкоза на ден, което е 60 – 70 % от общия ѝ метаболизъм. Неговата функция се засяга в голяма степен при нива на кръвната захар под 2,2 ммол/л – той не може да използва мастните киселини като източник на енергия (те не преминават кръвно-мозъчната бариера), а при спешни състояния може да утилизира кетотела. Черният дроб е основният орган, който регулира глюкозния метаболизъм. Около 90% от кръвната захар е от него. Той разполага със сериозни количества складиран гликоген – 100 – 110 г, които при нужда могат бързо да се освободят в кръвта под формата на глюкоза в резултат на гликогенолиза [1]. Образуването на глюкоза от черния дроб е свързано с процеса на глюконеогенеза - метаболитен път, при който се синтезира глюкоза от невъглекислородни източници – лактат, глицерол, аланин, глутамат, субстрати от цикъла на Кребс – те са отговорни за до 90% от глюконеогенезата [2]. Окислението на свободните мастни киселини, освободени от мастната тъкан в процеса на липолиза, осигурява енергията, която е нужна за глюконеогенезата, а също и кетотела, които са алтернативен източник на енергия за централната нервна система (ЦНС) при продължително гладуване. Мускулите не освобождават глюкоза в системното кръвообращение, но могат да увеличат усвояването ѝ, ако нивото ѝ в кръвта внезапно се повиши. Скелетните мускули освобождават аминокиселини в циркулацията, които се използват за глюконеогенезата в черния дроб. Мускулите използват като енергийни източници освен глюкоза, но също и мастни киселини и кетотела [1]. Те притежават значително количество складиран гликоген, който при критични състояния би могъл да се разгради в процеса на гликогенолиза до глюкозо-6-

фосфат за гликолиза (превръщане на глюкозата в пируват, при което се освобождава аденозин трифосфат - АТФ), като така се осигурява енергиен източник за мускулното съкращение [3]. Бъбреците могат да освобождават глюкоза в кръвообращението. Те не притежават гликогенови запаси, поради което глюконеогенезата е единствен източник за образуване на глюкоза. Като субстрат в този процес се използва глутамин. При нормални условия процесът на бъбречна глюконеогенеза осигурява малка част от глюкозата в кръвта, но в условията на продължително гладуване приносът на бъбреците може да достигне този на черния дроб. Бъбреците имат важна роля в контрарегулаторния ефект при хипогликемия – повишаването на катехоламините стимулира глюконеогенезата в кортекса на бъбреците; глюкагонът няма ефект върху тях; инсулинът потиска глюконеогенезата и освобождаването на глюкоза. Бъбреците имат значение за глюкозната хомеостаза и поради факта, че глюкозата непрекъснато се филтрира през тях и трябва ефективно да се реабсорбира, за да се предотврати нейната загуба. Маснатият тъкан е основно място за складиране на мастни киселини под формата на триацилглицерол, който се синтезира от глицеролфосфат и свободни мастни киселини. Глицеролфосфатът е резултат от гликолизата в маснатият тъкан. Масният тъкан осигурява свободни мастни киселини и глицерол за чернодробната глюконеогенеза в случай на необходимост.

Установени са няколко различни глюкозни транспортери GLUT, чрез които се осъществява пасивният, независим от енергия, транспорт на глюкозата през клетъчната мембрана. GLUT 1 и GLUT 3 се експресират от повечето тъкани и са от особено важно значение за мозъчния транспорт на глюкоза. Те имат висок афинитет към нея и я транспортират ефективно в рамките на нормалните й плазмени концентрации. GLUT 1 е широко разпространен във fetalните тъкани; при възрастни в най-висока концентрация се намира в еритроцитите, а също и в ендотелните клетки на кръвно-мозъчната бариера. GLUT 3 е експресиран основно в невроните, където е основен глюкозен транспортер, и в плацентата. GLUT 2 е двупосочен транспортер и се открива основно в  $\beta$ -клетките на панкреаса, бъбречните тубулни клетки, базолатералната мембрана на тънъкочревния епител и в черния дроб. Двупосочно в чернодробните клетки е необходим за усвояването на глюкоза за гликолиза и глюконеогенеза, и за освобождаването й при глюконеогенезата. Трите монозахарида глюкоза, галактоза и фруктоза се транспортират от интестиналните мукозни клетки в порталната циркулация от GLUT 2. GLUT 4 е хормонално зависим. Намира се в скелетните мускули, миокарда и

мастната тъкан, и се експресира върху мембраната под влиянието на инсулин; кортизолът има обратно действие. GLUT 5 се открива в черва, черен дроб, сперматозоиди. Смята се, че той работи основно като транспортер на фруктоза. GLUT 6 се счита за нефункциониращ псевдоген. GLUT 7 е чернодробен вътреклетъчен протеин, който отговаря за транспорта на глюкозо-6-фосфат в ендоплазмения ретикулум. GLUT 8 се открива в тестиси, мозък, мускули и мастна тъкан, GLUT 9 – в черен дроб и бъбреци, GLUT 10 – в черен дроб и панкреас, GLUT 11 – в сърце и скелетни мускули, GLUT 14 – в тестиси [1, 4].

Гликолизата е основен път за образуване на енергия. В черния дроб и панкреаса образуването на глюкозо-6-фосфат в този процес се катализира от глюкокиназа и е под хормонален контрол. Фосфорилирането на глюкозата я предпазва от излизането ѝ от клетките. Глюкозата може да се фосфорилира във всички тъкани, но ензимът за обратното превръщане на глюкозо-6-фосфат в глюкоза се намира само в черния дроб и в бъбреците. Това позволява освобождаването на глюкозата в системното кръвообращение от тези органи. В черния дроб и мускулите притокът на глюкоза към гликолитичния път е хормонално регулиран от инсулин, кортизол, катехоламини, глюкагон. От друга страна е установено, че глюкозата може да регулира донякъде собствения си метаболизъм независимо от инсулина. Глюконеогенезата е в общи линии път, обратен на гликолизата, като голяма част от ензимите са общи за двата процеса. Всички аминокиселини без левцин биха могли да се използват като субстрати за глюконеогенезата. Най-използван от черния дроб е аланин.

Глюкозната хомеостаза се регулира от различни хормони – инсулин, глюкагон, катехоламини, кортизол, растежен хормон. Инсулинът е основен регулаторен хормон във въглехидратната обмяна. В черния дроб той стимулира гликолизата, синтеза на гликоген, а потиска гликогенолизата и глюконеогенезата. Черният дроб може да реагира директно на високи нива на глюкоза в кръвта като увеличава усвояването ѝ и синтеза на гликоген по инсулинонезависим механизъм, но голяма част от участието му в глюкозната хомеостаза си остава под влияние на инсулин. Инсулинът стимулира усвояването на глюкоза от мастната тъкан и инхибира хормон-чувствителната липаза. В мускулите увеличава поглъщането на глюкоза и синтеза на гликоген. Глюкагонът, катехоламините (адреналин и норадреналин), кортизолът и растежният хормон повишават нивата на глюкоза в кръвта. Техните действия

са противоположни на тези на инсулина поради което се означават като контрарегулаторни хормони. Освобождаването на глюкагона от  $\alpha$ -клетките на панкреаса се стимулира от ниски плазмени концентрации на глюкоза в кръвта, а също и от катехоламините и кортизола. Обратно, секретията му се потиска от инсулина и соматостатина. Той има противоположни на инсулина ефекти върху глюкозния метаболизъм и осигурява поддържането на глюкозните нива в периодите между храненията. Глюкагонът действа основно върху черния дроб като стимулира постъпването на аминокиселини в него, глюконеогенезата, гликогенолизата, освобождаването на глюкоза, а потиска гликолизата, синтеза на гликоген и мастни киселини. Адреналинът се отделя от надбъбречната медула вследствие на стресови стимули като например хипогликемия, а норадреналинът се освобождава основно от симпатиковите неврони. Катехоламините имат важна роля в поддържането на нивата на глюкоза при стресови ситуации за организма. Те стимулират освобождаването на глюкагон, потискат секретията на инсулин. Адреналинът стимулира глюконеогенезата и гликогенолизата в черния дроб, а също и гликолизата и гликогенолизата в мускулите. Той инхибира синтеза на гликоген в черния дроб и мускулите, и потиска гликолизата в черния дроб. Кортизолът се отделя от надбъбречния кортекс и стимулира глюконеогенезата, а също и синтеза на гликоген в черния дроб, а потиска усвояването на глюкоза от мускулите и мастната тъкан. Остро инхибира освобождаването на инсулин, а в дългосрочното му действие води до намаляване на инсулиновото действие. Растежният хормон се отделя от предния дял на хипофизата при намалено ниво на глюкоза в кръвта. Той стимулира липолизата и потиска действието на инсулина [1].

## **1.2. Инсулин**

### **1.2.1. Структура и синтез на инсулин**

Инсулинът е изолиран от тъкан на панкреас за пръв път през 1921г. от Frederick Banting и Charles Best. Името му идва от латинската дума *insula*, което означава остров. Синтезира се от  $\beta$ -клетките на панкреаса първоначално като прекурсорна молекула – препроинсулин, като почти веднага след синтеза микрозомални ензими го превръщат в проинсулин. Проинсулинът се транспортира до апарата на Голджи, където се пакетира в покрити с клатрин секреторни гранули. Узряването на секреторните гранули се свързва със загуба на клатриновата обвивка и превръщането на проинсулин в инсулин, като се отделя С-пептид.

Зрелите секреторни гранули съдържат инсулин и С-пептид в еквимоларно количество, и много малко количество проинсулин. Тъй като проинсулинът не се метаболизира в черния дроб, той има плазмен полуживот три до четири пъти по-дълъг от този на инсулина, поради което се натрупва в кръвта и съставлява 12-20% от циркулиращия имунореактивен инсулин. Проинсулинът има 7-8% от биологичната активност на инсулина и се деградира основно в бъбреците. С-пептидът няма известна биологична активност и също не се метаболизира в черния дроб, а се разгражда или екскретира от бъбреците. Полуживотът му е приблизително 30 минути. Ендогенният инсулин има полуживот 3 до 5 минути и се разгражда от инсулинази в черния дроб, бъбреците и плацентата. Преминаването му през черния дроб води до намаляването му с около 50% [5].

### **1.2.2. Секреция на инсулин**

Скоростта на инсулиновата секреция зависи от промяната в плазмените концентрации на глюкозата. Глюкозата навлиза в панкреасните  $\beta$ -клетки през GLUT 2. Първият скорост-лимитиращ етап в процеса е фосфорилирането на глюкозата до глюкозо-6-фосфат, който се медира от глюкокиназа – ензим, определящ скоростта на гликолизата и по този начин функциониращ като глюкозен сензор на  $\beta$ -клетките и това е първият механизъм, по който скоростта на секрецията на инсулина се адаптира към промените в кръвната захар. По този начин при повишаване в нивата на глюкозата, повече от нея навлиза в  $\beta$ -клетките и скоростта на инсулиновата секреция расте. Намаляването в нивата на плазмената глюкоза води до спад в скоростта на гликолиза и в намаляване в секрецията на инсулина. Глюкозният метаболизъм води до образуване на пируват и впоследствие увеличаване в цитозолния АТФ, който от своя страна предизвиква блокиране на АТФ-зависимите калиеви канали върху мембраната на  $\beta$ -клетките. Настъпва мембранна деполяризация, увеличаване на калциевите йони в цитозола и секреция на инсулин чрез екзоцитоза вследствие сливането на инсулиновите гранули с клетъчната мембрана. АТФ-зависимите калиеви канали се състоят от сулфонилурейни рецептори (SUR1/ABCC8) и насочен навътре калиев канал (Kir6.2/KCNJ11). Те контролират навлизането на калиевите йони, породено от електрохимичния потенциал. Отварянето им ще намали мембрания потенциал под прага за активиране на волтаж-зависимите калциеви канали, когато нивата на глюкозата са ниски, и така ще се намали секрецията на инсулин.

Различни физиологични фактори регулират секрецията на инсулина. Основният от тях е глюкозата. Секреторният отговор на инсулина е по-голям след перорално постъпване на глюкозата отколкото след интравенозното ѝ въвеждане – т.нар. инкретинов ефект, при който абсорбцията на глюкозата в гастроинтестиналния тракт стимулира освобождаването на инкретини, които допълнително стимулират секрецията на инсулин. Такива са глюкагоноподобният пептид 1 (GLP-1), който се образува от L-клетките на мукозата на илеума и колона, гастро-инхибиторният полипептид (GIP), който се синтезира в K-клетките на дванадесетопръстника и йеюнума [6]. Глюкозата, като най-мощен стимул за секреция на инсулин, предизвиква отделянето му в две фази. Когато глюкозната концентрация се увеличи внезапно, настъпва краткотраен пик и отделяне на предварително синтезиран и складиран в зрелите гранули хормон (първа фаза). Ако нивата на глюкозата продължат да се увеличават, освобождаването на инсулина първо намалява, а по-късно отново расте за сметка вече на новосинтезиран такъв до достигане на стабилно ниво (втора фаза). От друга страна обаче продължително високи нива на глюкозна стимулация (над 4 часа *in vitro* и над 24 часа *in vivo*) водят до обратима десенситизация на  $\beta$ -клетъчния отговор към глюкоза и глюкозотоксичност, но се запазва реакцията към други стимули [5]. Аминокиселините също стимулират инсулиновата секреция, най-вече левцин, аргинин и лизин. За разлика от тях, различни липиди и техни метаболити имат ограничен ефект върху секрецията на хормона. Въпреки че богати на въглехидрати и мазнини храни стимулират отделянето на инсулин, бедни на въглехидрати и богати на мазнини храни оказват минимален ефект. Редица хормони оказват влияние върху секрецията на инсулин – глюкагонът, растежният хормон, глюкокортикостероидите, пролактинът, плацентарният лактоген и половите хормони я стимулират, а соматостатинът я инхибира. Фактори на нервната система също оказват влияние върху освобождаването на инсулин. Въпреки че симпатиковата и парасимпатиковата стимулация увеличават секрецията на глюкагон, отделянето на инсулин се стимулира от *p. vagus*, а се потиска от симпатиковите нервни влакна. Адренергичната инхибиция на  $\beta$ -клетките се медира от  $\alpha$ -адренорецепторите.

Около половината от общото количество секретирани инсулин от панкреаса за денонощие се освобождава в базални условия – базалната инсулинова секреция се изчислява на 18-32 единици за 24 часа. След хранене инсулиновият секреторен отговор е бърз и секрецията се увеличава около пет пъти като достига пик в рамките на 60 минути. Нормалният профил на

инсулиновата секреция се характеризира със серии от секреторни пикове. In vivo проучвания върху  $\beta$ -клетъчната секреторна функция са установили, че инсулинът се освобождава по пулсативен начин – наблюдават се бързи осцилации на всеки 8-15 минути, които са насложени върху бавни ултрадианни такива с по-висока амплитуда и с периодичност 80-150 минути. Открити са и циркадианни осцилации – максималният постпрандиален отговор на инсулина се измерва след закуска [6].

### **1.2.3. Механизъм на действие на инсулина**

Първият етап в инсулиновото действие е неговото свързване с инсулиновия рецептор. В мастната тъкан, мускулите и черния дроб това води до реализиране на биологичните му ефекти. Инсулиновият рецептор е трансмембранен гликопротеин, съставен от две  $\alpha$  и две  $\beta$  субединици.  $\alpha$  субединицата е се намира изцяло екстрацелуларно и се свързва с по-малката  $\beta$  субединица с дисулфиден мост. В субединицата преминава трансмембранно и цитоплазменият ѝ участък притежава тирозин-киназна активност. След свързване на инсулина с рецептора се стимулира тирозинкиназната му активност, настъпва автофосфорилиране и се стимулира каталитичната му активност. Следва фосфорилиране на редица вътреклетъчни протеини, което отключва биологичните ефекти на инсулина. Първият установен субстрат на рецептора е инсулин-рецепторен субстрат 1 (IRS-1) като впоследствие са установени още. Тирозин-фосфорилираните форми на IRS действат като вторичен посредник. След фосфорилирането на IRS се стимулират два основни пътя. Единият е активиране на фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3-киназа), която превръща фосфатидилинозитол дифосфата в трифосфат. Тези нуклеотиди се свързват с плазмената мембрана и с фосфоинозитол зависима киназа и водят до активиране на протеин киназа B. Този път на инсулина осъществява неговите основни метаболитни ефекти като стимулира транслокацията на GLUT 4 върху клетъчната мембрана, стимулира синтеза на белтъци и на гликоген и др. Другият път е резултат от активиране на Ras (Rat sarcoma oncogene) пътя и на MAP киназата (mitogen-activated protein). Този път е свързан с растежните ефекти на инсулина и на митогенезата. След свързване с рецептора и извършване на биологичните си ефекти инсулинът може да се върне обратно в екстрацелуларното пространство или да се разгради в клетката. Черният дроб разгражда по-голямото количество инсулин по време на

първото му преминаване през него докато бъбреците разграждат по-голямата част от него, която е в системното кръвообращение.

#### **1.2.4. Особености в анатомията на панкреаса и на гените за инсулин при гризачи**

Панкреасът на гризачи (мишки и плъхове) е локално разпръснат в мезентериума на проксималното тънко черво, съседно на дванадесетопръстника, за разлика от хората, където той е компактен орган. Макроскопски могат да се разграничат три основни части при панкреаса на мишките: дуоденален, далачен и гастрален лоб. Най-големият лоб, който съставлява над половината от общия обем на панкреаса, е далачният лоб, който се простира хоризонтално между дванадесетопръстника и далака, и е хомоложен на тялото и опашката на човешкия панкреас. Дуоденалният лоб е разположен в мезентериума, заобикалящ дванадесетопръстника, и е хомоложен на главата на панкреаса при човека. Третият и най-малкият лоб е гастралният лоб, който може да се разглежда като голяма част от далачния лоб, от който се развива. Основните дялове на панкреаса на мишките са разделени от мастна, съединителна и лимфна тъкан [7].

При гризачите Лангерхансовите острови, които представляват ендокринната част на панкреаса, са по-големи и интерлобуларни като цяло. При мишките те се състоят от периферия, съдържаща предимно не- $\beta$ -клетки, и ядро, което е изградено практически основно от  $\beta$ -клетки [8].  $\beta$ -клетките преобладават при гризачите (60-80%), докато при хората те са по-малко и  $\alpha$ -клетките са по-многобройни отколкото при гризачите (10-20%) [9]. Панкреасът на мишките съдържа приблизително 1000–5000 острова, а човешкият панкреас - приблизително 1 000 000 – 15 000 000 [10]. Общата островна маса в нормален панкреас на мишка се оценява на 1–8 mg. При мишките разпределението на островите и масата на  $\beta$ -клетките в различни лобове е доста хетерогенно. Броят им на единица обем е най-голям в гастралния лоб, следван от дуоденалния и далачния лоб [7]. Панкреасните острови при мишки имат много сложна и хетерогенна структура и съдържат Aa, Ab, Ac, B, C, D, E и F клетки. Класификацията на всички тези клетъчни типове се основава на формата, размера и електронната непрозрачност на секреторните гранули, и на пространствената връзка на гранулите с техните мембрани [11].

За разлика от хората, при които има само едно копие на инсулиновия ген (*Ins*), инсулиновите гени при мишки и плъхове формират система от два гена. Тази система се състои от препроинсулин 2 (*Ins2*), който е сходен с инсулиновите гени при другите бозайници, и препроинсулин 1 (*Ins1*), специфичен за гризачи ретроген. Както *Ins2*, така и *Ins1* се експресират в панкреаса и те кодират проинсулиновите пептиди, които са съставени от четири части: сигнален пептид, В верига, С-пептид и А верига. *Ins1* произхожда от обратно транскрибирана частично обработена иРНК на *Ins2* и задържа само един от двата интрона, който е хомоложен на първия интрон на *Ins2* [12]. В генома на мишките тези два инсулинови гена се намират в различни хромозоми - хромозома 7 за *Ins1* и 19 за *Ins2* [13]. Експерименти с мишки с диабет без затлъстяване (NOD - non-obese diabetic mice) разкриха, че тези два инсулинови гена имат различни нулеви фенотипи, свързани с етиологията на диабета. Различните фенотипове между *Ins2* и *Ins1* нокаут NOD мишки предполагат функционална дивергенция между тези два гена. На първо място, без наличието на *Ins2* алели, мишките, носещи *Ins1* (*Ins1* +/+, *Ins2* -/- и *Ins1* +/-, *Ins2* -/-), са били с дефицит на инсулин, който е ускорил появата на диабет тип 1, особено при мъжките NOD мишки. За разлика от това, не е установено намаляване на съдържанието на инсулин при мишки, които имат *Ins2* алели (*Ins1* -/-, *Ins2* +/- или *Ins1* -/-, *Ins2* +/+) [14]. Тези наблюдения предполагат, че ретрогенът *Ins1* може да има някои негативни ефекти, които влошават диабета [15]. Проучване установява, че мутация в гена *Ins2* индуцира диабет с тежка дисфункция на  $\beta$ -клетките на панкреаса на мишки с MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) [16].

## **1.3. Захарен диабет тип 2**

### **1.3.1. Определение**

Захарният диабет (ЗД) е хронично метаболитно заболяване, което се характеризира с повишени нива на кръвната захар, като това е резултат от нарушение на инсулиновата секреция, на инсулиновото действие или на двете заедно [17]. ЗД е и социално-значимо заболяване. Социално-значимите заболявания са хронични неинфекциозни групи, които се характеризират с широко разпространение и все по-често засягат млади хора в трудоспособна възраст. Нелекувани, те протичат тежко и могат да доведат до сериозни физически, но и психологически усложнения [18].

### 1.3.2. Епидемиология на ЗД

Според последните данни, предоставени от Международната диабетна федерация (IDF), през 2021 г. броят на хората с диабет в света е 537 милиона във възрастта 20-79 години или 10,5%. През 2030 г. се очаква той да достигне 643 милиона (11,3%), а през 2045 г. – 783 милиона (12,2%), което представлява нарастване с 46%. В същата възрастова група статистиката за Европа е следната – 61 милиона за 2021 г., 67 милиона за 2030 г. и 69 милиона през 2045 г. или увеличение с 13%. Хората със ЗД тип 2 са около 90% от пациенти с диабет. Установено е, че трима от всеки четирима хора със ЗД са в активна възраст. 6,7 милиона души на възраст 20-79 години са починали през 2021 г. от свързани със заболяването причини, което представлява 12,2% от всички смъртни случаи. Според данни от 2019 г. отчасти като резултат от възрастовото разпределение в съответните популации Мозамбик (91,1%), Кения (88,4%), Уганда (88%) и Зимбабве (86,4%) са страните с най-голяма честота на смъртни случаи, свързани с диабет при лица между 20 и 60 годишна възраст. Япония (15,8%), Северна Македония (15,8%), Словакия (17,3%), Сърбия (17,7%) и България (17,9%) са сред държавите с най-ниска честота на смъртни случаи, свързани със ЗД. Броят на децата и младежите със ЗД се увеличава ежегодно като над 1 милион от тях са със ЗД тип 1. През 2019г. пациентите с предиабет са 374 милиона или 7,5%. Очаква се броят им през 2030 г. да се увеличи до 8,0%, а през 2045 г. – до 8,6%. Друг проблем е т.нар. хипергликемия, установена през бременността – 16,7% или 21,1 милиона раждания. Тя засяга една от шест бременности и увеличава риска от усложнения по време на бременността и раждането като същевременно може да застраши живота на майката и детето. От съществена важност е и броят на недиагностицираните пациенти с диабет – през 2021г. един от всеки двама души със заболяването (44,7%) не знае, че страда от него [19, 20].

Съгласно данните за България се смята, че диагностицираните хора с диабет са около 426 000, или това са 9,6% от населението - 7,1% е известният ЗД, а 2,5% - новодиагностицираният. Установено е, че честотата на диабета е значимо по-висока при мъжете – 56,7%, а при жените е 43,3%. 83% от пациентите със ЗД са над 50 годишна възраст. Предиабетът е с честота 3,7% (нарушена гликемия на гладно – 1,6%, нарушен глюкозен толеранс – 2,1%). Прави впечатление, че честотата на ЗД за периода 2006 – 2012 г. сред

лицата в трудоспособна възраст е нараснала с 6,8%, а се е увеличила като цяло с 21% основно за сметка на хората в трудоспособна възраст. Сред населението над 20 годишна възраст в България за същия период от 6 години е настъпило повишение в абсолютния брой на известните пациенти със ЗД с почти 115 000 – те са били 312 100 през 2006 г. и съответно 426 831 през 2012 г., т.е. наблюдава се повишение с около 40% [21, 22].

### **1.3.3. Класификация на ЗД**

Класификацията на ЗД се основава предимно на етиологията на заболяването. Различават се следните типове [1]:

- ЗД тип 1 – развива се в резултат от деструкция на бета-клетките, които образуват инсулин, и обичайно води до абсолютен инсулинов дефицит
- ЗД тип 2 – следствие на прогресиращ дефект в инсулиновата секреция при наличие на инсулинова резистентост
- Други специфични типове – резултат от заболявания на панкреаса, на ендокринни болести, следствие влияние на различни медикаменти или химически съединения, причинен от инфекции, от генетични дефекти в бета-клетъчната функция или в инсулиновото действие, среща се при генетични синдроми
- Гестационен ЗД – който се диагностицира за пръв път по време на бременност

### **1.3.4. Диагноза на ЗД**

Световната здравна организация (СЗО) публикува периодично технически доклади с препоръки за диагнозата на ЗД. През 1999 г. утвърждава четири степени на глюкозен толеранс – нормален глюкозен толеранс, нарушена гликемия на гладно, нарушен глюкозен толеранс и ЗД, които са подробно разгледани в доклада на СЗО от 2006 г [23]. Нарушената гликемия на гладно и нарушеният глюкозен толеранс се обозначават като предиабет:

- Нормален глюкозен толеранс – кръвна захар на гладно (КЗГ) под 6,1 ммол/л и на втория час от орален глюкозо-толерантен тест (ОГТТ) под 7,8 ммол/л
- Нарушена гликемия на гладно – КЗГ между 6,1 и 6,9 ммол/л и на втория час от ОГТТ под 7,8 ммол/л
- Нарушен глюкозен толеранс – КЗГ под 7 ммол/л и на втория час от ОГТТ между 7,8 и 11,1 ммол/л

- ЗД – КЗГ над 7 ммол/л, над 11,1 ммол/л на втория час от ОГТТ или случайно измерена КЗ по което и да е време на денонощието над 11,1 ммол/л, придружено със симптоми като полидипсо-полиурия

Стойност на гликирания хемоглобин HbA1c, изследван по стандартизиран метод (NGSP, DCCT), над 6,5% също е показателен за ЗД, а между 5,7 и 6,4% - за предиабетно състояние.

При поставянето на диагноза ЗД с един от посочените методи е необходимо резултатът от изследването да се повтори, за да се изключи лабораторна грешка, освен в случаите, когато диагнозата е ясна на базата на клинични данни, например класически симптоми на хипергликемия. Предпочита се повторение на същия тест за потвърждение, но е възможно провеждане и на друг тест. Ако резултатите и от двата теста са в диагностичните граници, се потвърждава наличието на ЗД. При разминаване между двата теста трябва да се повтори този, чиято стойност е диагностична за ЗД, и ако резултатът е потвърдителен, се поставя диагнозата [22, 24].

### **1.3.5. Патогенеза на ЗД тип 2**

ЗД тип 2 е хронично заболяване, при което се наблюдава инсулинова резистентност и прогресивно отпадане на  $\beta$ -клетъчната функция. Той се приема за мултифакторно полигенно заболяване и се свързва с повишен сърдечно-съдов риск.

Редица проучвания демонстрират тясната връзка, която съществува между мастната тъкан и риска от развитие на ЗД. Продължителността на затлъстяването и наднорменото тегло играят роля за възникване на заболяването. От особено важно значение е и видът на разпределението на мастната тъкан. Абдоминалното ѝ отлагане е независим рисков фактор за ЗД и други метаболитни и сърдечно-съдови усложнения. Наднорменото тегло и затлъстяването, особено при абдоминално разпределение на мастната тъкан, са свързани със системно нискостепенно хронично възпаление, което се характеризира с повишени нива на циркулиращи проинфламаторни цитокини и свободни мастни киселини (СМК). Те индуцират инсулинова резистентност и играят роля и за  $\beta$ -клетъчната дисфункция. Мастната тъкан функционира като ендокринен орган, който произвежда множество фактори като адипокини, интерлевкин 6 (IL-6), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), резистен, естрогени, лептин, ангиотензиноген, адипонектин, висфатин, MCP1 (monocyte chemotactic

protein 1) и др. [25]. Адипонектин се секретира от адипоцитите. Установено е, че нивата на адипонектин са намалени при затлъстяване и инсулинова резистентност. Нивата на резистин са увеличени при затлъстяване и ЗД. TNF- $\alpha$  се среща в множество тъкани, включително адипоцитите. Той работи като паракринен ефектор и причинява инсулинова резистентност, включително и в скелетните мускули, а също и стимулира липогенезата в черния дроб. MCP1, известен още като CCL 2 (C-C motif chemokine ligand 2), е повишен пропорционално на мастната тъкан и корелира с инсулиновата резистентност. Той регулира набирането на моноцити и макрофаги и е необходим за зависимите от макрофагите възпалителни отговори. Нивата на IL-6 са пропорционални на степента на затлъстяване. Около една трета от него се секретира от адипоцитите [6]. Ренин-ангиотензин-алдостероновата система (РААС) регулира кръвния обем и съдовото съпротивление. Също така има роля в патогенезата на атеросклеротичното заболяване като води до развитие на артериална хипертония, инсулинова резистентност, ЗД, затлъстяване, съдово и системно възпаление. Ангиотензин II активира вътреклетъчни сигнални пътища, които обуславят атеротромбоза чрез възпаление, ендотелна дисфункция, нарушена фибринолиза [26]. Затлъстяването е свързано с повишени нива на СМК и проинфламаторни цитокини, които водят до инсулинова резистентност и последващи дислипидемия, артериална хипертония (АХ) и секреция на протромботични фактори. Наблюдава се и ендотелна дисфункция поради намаляване на азотния оксид и повишена активност на вазоконстрикторния пептид ендотелин 1, който съучаства в нарушаването на съдовата хомеостаза на мастната тъкан. Повишената интраваскуларна активност на ендотелин 1 и намаляването на зависимия от азотния оксид вазодилаторен капацитет води до повишено натрупване на вазоконстрикторни медиатори в съдовете на хора със затлъстяване, което пък води до затруднено постъпване на инсулин в периферните тъкани [25].

Установена е връзка между инсулиновата резистентност и дислипидемията. Потискането на липопротеин липазата и на образуването на VLDL (very low density lipoprotein) от инсулина е нарушено в условията на инсулинова резистентност, което води до повишен приток на СМК към черния дроб, повишено образуване на VLDL и до увеличена концентрация на циркулиращи триглицериди (ТГ). ТГ се трансферират към LDL (low density lipoprotein) и HDL (high density lipoprotein), и VLDL частиците се обогатяват с холестеролови естери благодарение на дейността на CETP (cholesterol ester transfer protein). Това води до повишен

катаболизъм на HDL в черния дроб и загуба на аполипопротеин (Аpo) А, при което концентрациите на HDL намаляват. Богатите на TG LDL се лишават от TG и се натрупват атерогенни малки плътни LDL.

Чернодробната инсулинова резистентност играе важна роля за хипергликемията при ЗД тип 2. Има директна връзка между повишеното образуване на глюкоза от черния дроб и повишената КЗГ. В норма инсулинът потиска ендогенното глюкозно образуване чрез директни и индиректни механизми. Инсулинът в порталното кръвообращение директно намалява продукцията на глюкоза като инхибира гликогенолизата. Индиректните или периферните ефекти на инсулина действат в две посоки. От една страна той намалява секрецията на глюкагон и така се потиска активирането на гликогенолизата и глюконеогенезата. От друга, инсулинът намалява нивата на СМК като потиска липолизата. СМК увеличават образуването на глюкоза от черния дроб като стимулират глюконеогенезата. В условията на инсулинова резистентност тези механизми са нарушени.

Поради наличието на инсулинова резистентност, пациентите със ЗД тип 2 често имат хиперинсулинемия, но степента ѝ е несъответно ниска спрямо глюкозните концентрации.  $\beta$ -клетъчният дефект при ЗД тип 2 се характеризира с липсваща първа фаза на инсулиновата секреция и намалена втора след венозно глюкозно натоварване. Установено е, че абнормната първа фаза при хора с диабет с добър гликемичен контрол не се подобрява, което навежда на мисълта че пациентите със ЗД тип 2 имат вътрешен дефект в  $\beta$ -клетките. За разлика от здравите хора, при които се секретират равни количества инсулин базално и постпрандиално, при тези със ЗД тип 2 се отделя повече инсулин при базални условия. Това намаление в инсулиновата секреция може да е свързана по-скоро с редуцията в амплитудата на секреторните пулсове след нахранване, отколкото намаляване на техния брой. Бързите инсулинови пулсове в секрецията също са нарушени, не се наблюдават регулярни бързи осцилации, те са по-скоро по-кратки и неправилни. Нарушенията в осцилациите в инсулиновата секреция могат да бъдат първа изява на  $\beta$ -клетъчната дисфункция [6].

През последните години чревният микробиом се разглежда като част от патогенезата на затлъстяването и инсулиновата резистентност. Тези пациенти имат различен състав на чревната флора (дисбиоза) в сравнение със здравите индивиди [27]. Човешкият микробиом

съдържа около 100 трилиона микроби, повечето от които са в гастроинтестиналния тракт. Той се състои от бактерии, вируси, фунги и има много важна роля в нормалното функциониране на метаболизма и имунната система [28]. Установено е, че в норма доминират щамове от семействата Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Verrucomicrobia (Bacteroidetes и Firmicutes представляват над 90%) [29]. Въпреки че съществуват вариации в състава на чревния микробиом между индивидите, различните щамове изпълняват сходни функции и формират „функционално ядро“. При ЗД и затлъстяване е налице намалено разнообразие в микробиома. Установяват се по-малко бактерии, които произвеждат късоверижни мастни киселини (SCFA) [27]. SCFA са важни медиатори, модулиращи ендокринния отговор, развитието и функцията на левкоцитите, а също и активността на различни ензими и транспортни фактори. Те са основни продукти от ферментацията на фибрите, приети с храната и са важен фактор за свързаната с хранителните фибри превенция на метаболитния синдром [30].

#### **1.4. ЗД и сърдечно-съдови заболявания**

Диабетната макроангиопатия е по същество атеросклеротичен процес, който е по-често срещан при ЗД, настъпва в по-ранна възраст, има по-обширно засягане и проявява повишена тенденция към нестабилност на атеросклеротичните плаки. При огромна част от пациентите със ЗД тип 2 заболяването се установява още при диагностицирането на диабета. Сред основните форми на макроангиопатията се включват коронарна артериална болест (КАБ), мозъчно-съдова болест, периферна артериална болест. Много често срещана е и АХ при пациенти със ЗД като тя е и рисков фактор, заедно с дислипидемията, за развитие на атеросклеротични изменения по съдовете. Атеросклерозата е комплексно мултифакторно заболяване и ускоряването на атеросклеротичния процес при ЗД може да се обясни с хипергликемията, оксидативния стрес, натрупване на крайни продукти на гликирането (AGEs), дислипидемия, хиперинсулинемия, свръхобразуване на възпалителни маркери и генетични вариабилности. Рисковите фактори за развитие на сърдечно-съдови заболявания (ССЗ) при ЗД включват наднорменото тегло и затлъстяването, асоцииращи се с инсулинова резистентост, която е важен елемент в патогенезата на ЗД тип 2, АХ, която е следствие от атеросклеротичните съдови изменения, дислипидемията. От своя страна дори и

предиабетните състояния се свързват със значимо повишен сърдечно-съдов риск в сравнение с нормалния глюкозен толеранс [5].

Установена е силна връзка между ЗД и ССЗ. ССЗ са водеща причина за морбидност и смъртност сред диабетната популация [31]. ССЗ настъпват 10-15 години по-рано при пациенти със ЗД. Установено е, че около 2/3 от хората със ЗД тип 2 ще починат от някаква форма на ССЗ. Смъртността от ССЗ при пациентите със ЗД е 2 до 4 пъти по-висока в сравнение с хората без ЗД. Относителният риск за съдов инцидент при хората с диабет е по-висок при жени и при по-млади пациенти. Рискът е по-изразен при тези с по-голяма давност на заболяването и които имат микроваскуларни усложнения като протеинурия и хронично бъбречно заболяване (ХБЗ). Има данни, че пациенти със ЗД без прекаран миокарден инфаркт (МИ) имат същия риск за КАБ както тези с вече реализиран такъв [32]. Проспективни проучвания са изчислили, че рискът при хората с диабет от развитие на съответните ССЗ е увеличен както следва: за КАБ – със 160%, а за хеморагичен инсулт – с 56% [19]. Въпреки развитието в грижите и лечението на диабета и съпътстващите го заболявания преживяемостта при ЗД тип 2 е намалена с 6 години; ако пациентът е преживял МИ или инсулт тя се скъсява с 12 години, а ако е прекарал и двете – с 15 години [33].

ЗД е важен рисков фактор за развитие на сърдечна недостатъчност (СН) независимо от АХ и КАБ – рискът е увеличен с 2,4 пъти при мъжете и 5 пъти при жените; увеличаването на HbA1c с 1% се свързва с нарастване на опасността от СН с 12% при хората със ЗД [34]. При наличие на СН при тях смъртността расте 10 пъти и 5-годишната преживяемост е едва 12,5% [35]. Нерезпознатата СН при ЗД се среща при 28% от пациентите (при 25% с намалена фракция на изтласкване – ФИ, и при около 75% при тези със запазена ФИ) [36].

Данните от проучването върху българската популация, проведено през 2012г, сочат, че с АХ са 84,5% от пациентите със ЗД, а хората с АХ в общата популация са 49,6%; пациентите със ЗД и затлъстяване са 51%, а за сравнение в общата популация са 32,7% [37]. ТГ са повишени при 30,6% от недиабетиците и при 51,5% от лицата със ЗД. С повишен общ холестерол са 51% от пациентите с диабет и 50,7% от тези без заболяването; с нисък HDL холестерол са половината от хората със ЗД и 33,9% от общата популация [38].

Според Европейското дружество по кардиология (European Society of Cardiology) при пациенти със ЗД и ССЗ, или ЗД и увреждане на таргетни органи (например протеинурия, ГФ под 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) са с много висок риск – 10 годишен риск от сърдечно-съдова смърт над 10%. Хора с диабет с три или повече рискови фактори или с давност на диабета над 20 години са също с много висок риск, а също и такива със ЗД тип 1 на 40 годишна възраст с начало на заболяването преди 10 годишна възраст, особено жените. Повечето от останалите пациенти със ЗД принадлежат към групата с висок сърдечно-съдов риск - 10 годишен риск от сърдечно-съдова смърт 5-10%, с изключение на млади хора под 35 години със ЗД тип 1 с давност под 10 години и без рискови фактори, които принадлежат към групата с умерен риск. При наличието на ЗД, женският пол вече не се явява протективен фактор по отношение развитието на ССЗ както е в общата популация. В регистъра на проучването за организация за оценка на стратегии при исхемични синдроми OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischaemic Syndromes) е регистрирана по-висока със 75% смъртност при хора с нестабилна ангина пекторис и ЗД в сравнение с тези без диабет [33].

### **1.5. Роля на някои маркери, включително и генетични, за определяне на риска от сърдечно-съдови заболявания при ЗД тип 2**

Според европейската статистика за ССЗ, те са водеща причина за смъртност - всяка година причиняват около 3,9 милиона смъртни случая в Европа, което представлява 45% от всички смъртни случаи. За 2015г е имало 11,3 милиона нови случаи на ССЗ в Европа като КАБ съставлява малко над половината от тях. За същата година статистиката сочи общо над 65 милиона души със ССЗ в Европа като най-честите заболявания са периферна съдова болест и КАБ. В България през 2015г ситуацията на новите случаи на ССЗ е следната –71 531 души при мъжете и 69 733 души при жените, като общият им брой при мъжете е 490 216, а при жените – 498 810 [39].

Както вече е известно, ССЗ са водеща причина за заболяемост и смъртност сред хората със ЗД. ССЗ и ЗД споделят сходни патогенетични механизми по отношение развитието на атеросклеротичните изменения. ЗД, затлъстяването и инсулиновата резистентост се свързват със субклинично възпаление, характеризиращо се със свръхекспресия на цитокини, които се образуват от мастните клетки, активираните макрофаги и други клетки.

Възпалителни медиатори като инхибитора на плазминогенен активатор 1 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), CRP (C-reactive protein), фибриноген, ангиотензин и други участват в сигнални пътища, в инсулиновото действие и усилването на възпалителния отговор [40]. Тези цитокини са свързани и с хроничните възпалителни процеси, обуславящи липидното натрупване с последващо развитие на атеросклероза и ССЗ [41]. Атеросклерозата е комплексно мултифакторно заболяване и ускоряването на атеросклеротичния процес при ЗД може да се обясни с хипергликемията, оксидативния стрес, натрупване на AGEs, дислипидемия, хиперинсулинемия, свръхобразуване на възпалителни маркери, а не на последно място и на някои генетични вариабилности [42].

Повишеният тромботичен риск и преждевременната атеросклероза са ключови фактори за повишения сърдечно-съдов риск при диабет. Оклузивният съдов тромб, образуван вторично от взаимодействията между тромбоцитите и коагулационните протеини, е съставен от скелет от фибринови влакна с клетъчни елементи, вградени в тази мрежа. ЗД се характеризира с количествени и качествени промени в коагулационните протеини, които колективно повишават резистентността към фибринолизата, което съответно увеличава риска от тромбоза [43].

Оценката на рисковите фактори за вземане на решения при ССЗ има дълга история в медицината. Ранните опити за допълване на традиционните рискови фактори с резултати от генетичния риск бяха затруднени от твърде малкото разбиране на генетичната основа на сложните ССЗ. По-нови проучвания, основани на стотици хиляди хора и милиони генетични варианти, показват, че генетичните рискови резултати вече в някои случаи биха могли да надминат традиционните рискови фактори при прогнозиране на риска. Генетичните рискови резултати започват да се включат все по-активно в клиничната практика. Развитието на програми за оценка на генетичния риск става възможно благодарение на големите, репликационни открития от цялостно-геномните асоциативни проучвания (GWAS - genome-wide association study). Оценката на риска на базата на единични генетични варианти показва устойчива способност за идентифициране на пациенти с висок риск, което води до подобрене и “рекласифициране” на риска. В наши дни, в резултат на широкомащабно сътрудничество, мета-анализи и появата на биобанки на национално и интернационално ниво, са налице резултатите от GWAS на чести варианти, получени от

тестването на повече от 1 милион индивиди. Такива проучвания, които биха могли да моделират протичането на заболяванията, показват, че генетичните фактори осигуряват допълнително силна оценка на риска при всички заболявания, като се явяват значима добавка към традиционните рискови фактори. По този начин най-новите генетични оценки на риска показват значителни подобрения в ефективността при прогнозиране на риска от сърдечно-съдови инциденти [44].

### **1.5.1. Роля на фибриноген**

Фибриногенът (фактор I) е гликопротеин, който се синтезира в черния дроб. В случай на тъканна или съдова увреда той се превръща от тромбина във фибрин и така участва в процеса на кръвосъсирване. Като острофазов протеин неговите нива се повишават при някои условия като системно възпаление и нараняване на тъкани [45]. Проучванията доказват, че високите нива на фибриноген се свързват с КАБ, а той също така може да допринесе за съдово заболяване като увеличи кръвния вискозитет и така стимулира формирането на фибрин, или чрез повишаване взаимодействието между тромбоцитите [46]. Фибриногенът взема участие в тромботичната оклузия и в крайния етап от атеротромбозата. Някои проучвания предполагат, че той би могъл да играе важна роля във възникването и прогресията на атеросклеротичната плака [47]. Известно е, че съществува връзка между повишените нива на фибриноген и риска от ССЗ [48]. Високите нива на фибриноген в плазмата влияят върху структурата на съсиреците като модулират плътността и твърдостта на фибриновата мрежа. Повишеният риск от МИ в тези случаи би могъл да се дължи отчасти на формирането на по-плътни съсиреци при тези индивиди [49]. От друга страна, установено е също така и че образуването и плазмените нива на фибриногена са завишени при пациенти със ЗД тип 2. Не е известно дали промененият отговор към инсулина води до хиперфибриногенемия при хората с диабет. образуването на фибриноген се повишава от инсулина дори и при хора с добре контролирано заболяване, но не и при здрави. Смята се, че това играе основна роля за асоциирания сърдечно-съдов риск при ЗД [50]. Фибриногенът стимулира затлъстяването, възпалението на мастната тъкан и развитието на метаболитните последствия по-нататък. Подкрепящи ролята на фибриновите отлагания са предишни проучвания, които откриват, че екстраваскуларният фибриноген е мощен модификатор на възпалителния процес при артрит, невровъзпалителни заболявания, мускулна дистрофия,

колит [51, 52]. Проучвания пряко отнасят  $\gamma$ -390-396 мотива към фибриноген-индуцираното затлъстяване като той поддържа свързването с левкоцитен интегринов рецептор  $\alpha$ M $\beta$ 2.  $\beta$ 2-интегриновият фамилен член  $\alpha$ X $\beta$ 2 свързва фибриногена през този мотив и се експресира в моноцитите и макрофагите [53]. Образуването и отлагането на фибриноген е повишено при хора със затлъстяване. Това води до покачване на възпалението в адипоцитите и до активиране на макрофагите, което от своя страна потиска усвояването на глюкоза. Но от друга страна връзката между фибриногена и инсулиновата резистентност е противоречива. Евентуално обяснение би могло да бъде повишаването на СМК, което се наблюдава при инсулинова резистентност. Тази връзка може също така да е резултат от възпалителната реакция, която по принцип се среща при атеросклероза [54].

Мутацията -455G/A в промоторния регион на  $\beta$ -фибриновия ген се асоциира с повишени нива на фибриногена в плазмата. Carter et al. са проучили връзката между -455G/A генния полиморфизъм и фибриногеновите нива за развитието на КАБ при пациенти със ЗД тип 2. Резултатите показват сигнификантно увеличени нива на фибриногена при пациенти с КАБ в сравнение с тези без. Тези данни сочат връзка между -455G/A генния полиморфизъм и развитието на КАБ при ЗД [55]. Lam et al. са проучили връзката между същия полиморфизъм и плазмените фибринови концентрации в опит да изяснят ролята му при КАБ при пациенти със ЗД тип 2 и контроли недиабетици. Установява се, че -455G/A генния полиморфизъм в  $\beta$ -фибриногеновия ген е генетична детерминанта за нивата на фибриногена в кръвта и за ролята му като рисков фактор за КАБ [56].

### **1.5.2. Роля на метилентетраhydrofolat редуктаза (MTHFR)**

MTHFR катализира превръщането на 5,10-метилентетраhydrofolat в 5-метилтетраhydrofolat. Ензимът играе роля в метаболизма на фолата и в регулацията на нивата на хомоцистеина. C677T полиморфизмът се свързва с висок риск от развитие на ССЗ. Мутацията води до хиперхомоцистеинемия, което е рисков фактор за атеросклероза [57]. От друга страна е установено, че мутации в гени, кодиращи фактор V Leiden (FVL) и MTHFR може да имат принос за развитието на дълбока венозна тромбоза – състояние, което се дължи на повишена съсирваемост и може да бъде вродено или придобито. Проучване изследва честотата на FVL, MTHFR C677T и MTHFR A1298C генни полиморфизми при

пациенти с това заболяване. Резултатите установяват MTHFR A1298C полиморфизма в 77% от случаите, MTHFR C677T при 67% и FVL при 17% от пациентите [58].

### **1.5.3. Роля на фактор V Leiden**

FVL е вариант (мутирала форма) на човешкия фактор V, който се свързва с венозна и артериална тромбоза, а също така и с усложнения по време на бременността. Връзката между FVL и атеросклерозата е обект на дебати поради разнопосочни данни. Изказана е хипотеза за връзка между мутацията и ЗД тип 1 и 2, но резултатите са противоречиви [59, 60]. Известна е асоциацията на FV G1691A (Leiden) с венозния тромбемболизъм [61]. Проучване установява увеличение в честотата на ЗД сред пациенти с венозен тромбемболизъм, които са носители на мутацията, сравнени с неносители, но връзката не е статистически значима [62].

### **1.5.4. Роля на PAI-1**

PAI-1 е известен и като ендотелен инхибитор на плазминогенния активатор или серпин E2, и е серин протеазен инхибитор, който е основен инхибитор на тъканния плазминогенен активатор (tPA) и на урокиназата – активаторите на плазминоген –свързания процес на фибринолиза. Повишените му нива са важен рисков фактор за тромбоза и атеросклероза [63]. Той е увеличен при пациенти с КАБ. Различни проучвания показват, че инсулиновата резистентност може да бъде регулатор на експресията на PAI-1. Образоването му от мастната тъкан би могло да допринесе за повишените му нива, което се откриват при пациенти с инсулинова резистентност и с метаболитен синдром. Проспективни проучвания на хора с МИ или КАБ откриват връзка между увеличените му нива и риска от коронарна болест [64, 65]. Скорошен метаанализ доказва, че 4G/5G полиморфизмът се свързва с МИ [66]. Генотипът 4G/4G води до повишени нива на PAI-1 и като резултат – хипофибринолитично състояние и повишен тромботичен риск [67]. Съществува асоциация между повишените нива на PAI-1 и коремното затлъстяване, тъй като мастната тъкан го експресира и е негов важен източник при тези пациенти [68]. Комбинацията от ЗД тип 2 и затлъстяване допринася за по-съществено увеличаване на PAI-1 в сравнение с обезитета и ЗД поотделно [69]. PAI-1 има отношение и към РААС, който има голям принос в иницирането на съдовото заболяване и за прогресията му [70]. Създадени са малки

молекули за инхибиране на PAI-1 – Tiplaxtinin, PAI-039, piperazine-chemotype [71]. Някои са тествани върху животински модели с добри резултати *in vitro*, но за съжаление не са събрани достатъчно данни във връзка с тяхната употреба в клиничната практика [72].

#### **1.5.5. Роля на гликопротеин GP IIb/IIIa**

Гликопротеин GP IIb/IIIa е интегринов комплекс, който се открива в тромбоцитите. Той е рецептор за фибриноген, за фактора на von Willebrand и подпомага активирането на тромбоцитите. След активирането на тромбоцитите се формира мембранният рецепторен комплекс GP IIb/IIIa, който свързва фибриногена и се получава съсирек [73]. Инхибиторите на GP IIb/IIIa се използват за намаляване риска от формиране на кръвни съсиреци при пациенти с риск от КАБ или инсулт. При дефекти в гликопротеин GP IIb/IIIa се развива коагулопатията тромбастения на Glanzmann, която се характеризира с нарушена тромбоцитна агрегация и повишен риск от кървене [74]. Установено е, че полиморфизмът НРА-1 на GPIIb/IIIa се асоциира с развитието на АХ при пациенти с терминална бъбречна недостатъчност [75].

#### **1.5.6. Роля на протромбин**

В процеса на кръвосъсирване протромбин се разцепва протеолитично и се формира тромбин, който от своя страна превръща фибриногена във фибрин. Мутацията протромбин G20210A причинява повишени нива на протромбин и увеличава риска от формиране на съсиреци, включително и от дълбока венозна тромбоза, а също и белодробен тромбемболизъм. След фактор V Leiden, тя е един от най-честите генетични варианти, асоцииращи се с венозен тромбемболизъм [76]. Метаанализ установява 1,3 пъти повишен риск от КАБ [77].

#### **1.5.7. Роля на фактор XIII**

Фактор XIII или фибрин стабилизиращ фактор е зимоген, който след активиране свързва фибрина. Дефицитът му води до нарушена стабилност на кръвния съсирек и повишен риск от кървене [78]. Метаанализ разкрива, че мутацията V34L играе протективна роля срещу венозен тромбемболизъм, умерено намалява риска от МИ и КАБ [79]. От друга страна обаче се установява, че комбинацията от фактор XIII V34L и PAI-1 4G/5G генните полиморфизми

сигнификантно увеличават риска от повтарящи се спонтанни аборти. Полиморфизмът 4G/4G на PAI-1 също се счита, че намалява протективния ефект на V34L [80].

### **1.5.8. Роля на РААС**

РААС регулира кръвните обем и налягане, и участва в развитието на АХ. Има също така роля и в патогенезата на атеросклерозата, съдовото и системно възпаление, инсулиновата резистентност, ЗД и затлъстяването. РААС притежава проинфламаторни и протромботични ефекти на клетъчно и молекулно ниво. Съдовото възпаление води до ендотелна дисфункция, набирание на клетки на възпалението в мястото на увредата и прогресия на ССЗ. Редица проучвания доказват, че ангиотензин II провокира проинфламаторни отговори в стените на артерии, в сърцето, бъбреците като регулира експресията на цитокини и хемокини. В клетките на съдовата гладка мускулатура води до активиране на NF- $\kappa$ B, експресия на IL-6, MCP-1 и на TNF $\alpha$  в моноцитите. Той е и протромботичен фактор. Проинфламаторните и протромботични ефекти на РААС се медираат и от алдостерон. Той участва в органната фиброза и тъканната исхемия, и заедно с макрофагите провокира сърдечна фиброза. Алдостеронът води до инсулинова резистентност и съдово ремоделиране, и повлиява развитието на атеросклерозата [81]. Генетичен полиморфизъм на гена за ангиотензин конвертирация ензим (ACE), който също е част от РААС, взема участие в патогенезата на атеросклерозата [26]. DD генотипът на ACE е свързан с по-високата му активност и увеличен риск от левокамерна хипертрофия, АХ и КАБ [82].

### **1.5.9. Роля на apoB и apoE**

Плазмените липопротеини са изградени от хидрофобно ядро, съдържащо триглицериди и холестеролови естери, и повърхностен монослой, изграден от фосфолипиди, неестерифициран холестерол и аполипопротеини. Повишени нива на аполипопротеин В (apoB) – съдържащи липопротеини като LDL и хиломикроните останки се свързват с развитие на атеросклероза. Хиломикроните, които съдържат apoB 48 се секретират в червата постпрандиално, докато VLDL, които имат apoB 100, се образуват в черния дроб. Усвояването на останките от хиломикрони и VLDL в черния дроб се улеснява от аполипопротеин Е (apoE). ApoB 100 е отговорен за усвояването на LDL в черния дроб [83]. При генетичен дефект в apoB 100 повишено количество LDL се натрупва в плазмата, което

води до хиперхолестеролемиа и преждевременна атеросклероза [84]. От друга страна пациенти, които нямат apoE, акумулират липопротеинови останки. В атеросклеротичните лезии липопротеините съдържат apoE и apoB 100. Липопротеиновите останки с apoE стимулират натрупването на холестеролови естери в макрофагите [85]. В лезиите повечето от apoE молекулите се синтезират локално от макрофагите [86].

## **1.6. Генна експресия и епигенетика**

Генната експресия представлява процес, при който информацията от даден ген се използва, за да се синтезира функционален продукт. В генетиката генната експресия е най-фундаменталното ниво, при което генотипът дава начало на фенотипа. По този начин фенотипът се експресира чрез синтез на протеини, които контролират определени структури на организма, а също и неговото развитие. Регулацията на генната експресия е от много важно значение. Тя оказва влияние върху времето, мястото и количеството на определения генен продукт в дадена клетка и може да има ефект върху клетъчната структура и функция. Регулацията на генната експресия е основата за клетъчната диференциация, развитие, морфогенеза и адаптивността на всеки организъм [87].

Клетките на многоклетъчния организъм са структурно и функционално хетерогенни поради диференцираната експресия на гените. Много от тези различия се пораждат по време на развитието и впоследствие се запазват и се предават на дъщерните клетки. Установено е, че факторите на средата, външни и вътрешни, играят важна роля в определянето на функцията и вариабилността на клетките. Повечето клетки имат различна степен на фенотипна пластичност, а от друга страна фенотипът, определен от генотипа, зависи от външни фактори [88]. Епигенетичните модификации се дефинират като унаследяеми промени във функциите на гените, които се появяват без да има промяна в нуклеотидната последователност. Те са потенциално обратими [89]. Унаследените или спорадични епимутации, или нарушаване на регулацията на епигенома, могат да доведат до развитие на заболяване. Известни се няколко различни клетъчни епигенетични механизми: самоподдържащи се метаболитни вериги, ДНК метилиране, хистонови модификации, некодиращи РНК [90].

### **1.6.1. Самоподдържащи се метаболитни вериги**

Външните фактори, оказали влияние върху генната активност, определят свойствата на гена, процес, наречен "транскрипционен хистерезис" [91]. Персистиращите кумулативни ефекти върху генната експресия благоприятстват или изменят отговорите към последващи промени. Самоподдържащите се метаболитни вериги се отнасят към авторегулацията на генната активност чрез своите протеинови продукти [92]. Много вътрешни фактори като хормоните например, а също и растежни фактори, цитокини, ензими и ДНК-свързващи протеини могат да ur-регулират своя собствен синтез или синтеза на компоненти от техните сигнални системи. Процесът се нарича "интракринна памет" [93]. Положителната обратна връзка може да генерира биостабилност, т.е. наличието на две алтернативни стабилни състояния при идентични условия. Биостабилното състояние при регулацията на транскрипцията се наблюдава, ако настъпят много чувствителни молекулярни реакции. Промотерите на гените, които имат няколко свързващи места, могат едновременно да реагират с няколко транскрипционни фактора. От друга страна, повечето от транскрипционните фактори формират димери. Тези две условия значително увеличават чувствителността на регулацията на транскрипцията [94]. Генетичният локус TCF7L2, който е известен със своята силна асоциация със ЗД тип 2, съдържа множество енхансери, които са активни в различни клетки [95].

### **1.6.2. Некодиращи РНК (ncRNA – non-coding RNA)**

Не повече от 2% от човешкия геном има протеин-кодиращ потенциал. Частта от генома, която претърпява транскрипция, е над 70%. От тук следва изводът, че по-голямата част от транскриптома е съставен от некодираща РНК [96]. Известно е, че некодиращите РНК също могат да оказват влияние върху генната експресия. Те са съставени от няколко класа РНК и се класифицират в различни групи в зависимост от тяхната дължина, локализация, функция. МикроРНК (miRNA) са клас, съставен от малки некодиращи РНК молекули, които са изградени от 21 до 23 нуклеотида и действат като посттранскрипционни регулатори на генната експресия. Около половината от тях се намират в такива участъци на хромозомите, които са могат да бъдат подложени на структурни промени [97]. Те се свързват към таргетни информационни РНК (иРНК) и ги модифицират като по този начин потискат протеиновата трансляция [98]. Единична miRNA може да свърже няколко иРНК, а няколко miRNA могат

да регулират една единствена иРНК. Проучванията показват, че miRNA могат също така да доведат до ремоделиране на хроматина чрез регулиране на хистоновите модификации. От друга страна, други проучвания доказват, че miRNA могат да въздействат върху ДНК метилирането чрез регулиране на ДНК метилази [99]. MiRNA са от особено важно значение за развитието на панкреаса и също така участват в развитието на ЗД [100]. Някои проучвания показват, че експресията на различни miRNA се променя в различните тъкани по време на развитието на диабета [101].

Дългите некодиращи РНК (long non-coding RNA-lncRNA) обичайно са с над 200 нуклеотида. Те се състоят от различни видове функционални РНК, които включват ехансер-асоциирани РНК (eRNA), смислови и антисенс lncRNA, транскрибирани ултрасъхранени региони (T-UCRs) и интергенни lncRNA (lincRNA). Те също така могат да наберат ДНК метилтрансферази (DNMT) и хистонови модификатори към техните таргетни гени и така да улеснят експресията на близко разположените гени [102]. Особена уникална lncRNA е съдържаща повторно теломерна РНК (TERRA), която регулира поддържането на теломери и стабилността на генома [103].

Има и други видове lncRNA – малки интерфериращи РНК (дълги 21-22 нуклеотида, които участват в транскрипционното потискане на гени чрез ДНК метилиране и хистонова модификация) [104], PIWI-интерактивни РНК (с 26-30 нуклеотида; те регулират състоянието на хроматина и транспозонната активност), промотер-асоциирани РНК и малки нуклеоларни РНК (и двете могат да регулират експресията на гените). Други наскоро описани некодиращи РНК с по-малко изучена функция включват Х.инактивиращи РНК, Sno-производни РНК, micro-RNA-offset RNA, производни на транспортната РНК, MSY2-свързани РНК, малки теломерни РНК, центрозом-асоциирани РНК [105].

Кръгови РНК, на които 3' и 5' краят е ковалентно свързан чрез обратно включване на екзони от единична пре-иРНК, са изненадващо разпространен клас РНК. За кръговите РНК, които служат като шаблони за синтеза на протеини, се предполага, че притежават и други неизвестни до този момент функции [106].

NcRNA участват в генната регулация. От гледната точка на епигенетиката се предполага, че те директно взаимодействат с хистонови модификатори. Те могат да направляват или да

определят специфични субнуклеарни домейни и генетични локуси, върху които действат хистоните, а също така могат и да бъдат опора за специфични хроматин-регулаторни комплекси [96].

### **1.6.3. ДНК метилиране**

ДНК метилирането включва добавянето на метилова група на 5' позиция на цитозиновия пръстен и това се случва основно цитозиновите остатъци в цитозин-фосфат-гуанин (СрG) динуклеотидите. Метилната група, отговорна за ДНК и хистоновото метилиране, произлиза от S-аденозин метионин [107]. СрG динуклеотидите са слабо представени в генома на бозайниците (1-2%), но се групират в СрG острови в промотерните региони на гена. По време на развитието начинът на СрG метилиране се променя и това се случва предвидимо. По време на ранната ембриогенеза метилирането се изтрива от генома и след това се възстановява навсякъде с изключение на СрG островите. Обичайно тези острови остават хипометилirани до по-късен етап, когато някои от тях се метилират. Хиперметилирането им води до транскрипционно затихване [108]. По този начин някои участъци от генома са по-силно метилirани от други, като те са по-слабо транскрипционно активни. ДНК метилирането се нуждае от активността на DNMT (включително DNMT1, DNMT3A, DNMT3B). DNMT1 основно е отговорна за установяването на клетъчните нива на СрG метилирането. При ембриогенезата процесът на de novo метилиране се провежда от DNMT3A и DNMT3B [109]. Освен DNMT, деметилази от 10-11 транслокационното (TET) семейство на ДНК диоксигенази също контролират метилационния статус на генома и премахват метилови групи от метилirания цитозин [110].

### **1.6.4. Модификация на хистоните**

Хистоните представляват уникални протеини, които улесняват пакетиранието на ДНК в нуклеозоми. Посттранслационни модификации на хистоните настъпват в техните N-терминални краища, което определя достъпността на ДНК за транскрипция. Хистоновите модификации, включително ацетилиране, метилиране, фосфорилиране, убиквитиниране и сумоилиране, водят до активиране или потискане на активността на гените [111]. Ацетилирането на хистоновите лизинови остатъци например увеличава достъпността на

хроматина и активира генната експресия. В повечето случаи хистоновите промени протичат заедно с ДНК метилиране [112].

Интересен мотив, наречен бромодомейн, се намира в различни протеини, които вземат участие в тези хроматинови и транскрипционни процеси. Думата етимологично се свързва с *brahma*, важен регулатор в развитието на *Drosophila* [113]. Бромодомейнът е еволюционно консервативен и представлява мотив от около 110 аминокиселини, който се свързва към ацетилизирани лизини в хистоните и доставя асоциирани хистонови модификации и нуклеозомна активност на хроматина. Бромодомейните протеини са критични неизобилни участници в контрола на адипогенезата, енергийния метаболизъм и възпалението [114].

Хистоновото деацетилиране корелира с CpG метилирането и неактивното състояние на хроматина. Съществуват различни класове ензими хистонови деацетилази (HDAC), които могат да деацетилират хистоните, а също и други протеини. Гените на ген-инактивиращия информационен регулатор (SIR) (сиртуини) са силно консервативно семейство протеини с хистонова деацетилазна активност, които участват в хистонното ремоделиране. Има седем типа при човека (SIRT1-SIRT7) и SIRT1 деацетилазната активност се куплира с хидролизата на метаболита NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adenine dinucleotide, оксидиран) по начин, по който ендогенните флуктуации на нивата на NAD<sup>+</sup> определят функциите на SIRT1. Тъй като SIRT1 регулира функцията на биологичния часовник, той се смята за нутритивен сензор, който свързва вътреклетъчното енергийно състояние с функционирането на биологичния часовник [115]. Пакетирането на ДНК в хромозомите включва енергия-зависими механизми. Те се медираат от четири фамилии хроматин ремоделиращи протеини и са основен детерминант на достъпността на различни фактори до ДНК. Сиртуините също така осъществяват директна връзка между митохондриалния метаболизъм и епигенетичното модифициране с деацетилирането на хистоните.

Крайният ефект от метилирането на хистоните е различен в зависимост от специфичните метилирани остатъци и броя на добавените метилови групи. Хистоновите модификации играят важна роля в регулирането на възпалителните и метаболитни нарушения, и също така свързват ССЗ със съдовата хомеостаза [116].

### **1.6.5. Регулация на хроматина**

Регулацията на хроматина е необходим компонент за медираните от биологичния часовник транскрипционни осцилации. При бозайниците биологичният часовник позволява на организма да се адаптира към промените на околната среда [117]. Супрахиазматичното ядро (SCN) на хипоталамуса направлява циркадните ритми и циркадната физиология. Независимо от наличието на ендогенни и самоподдържащи се ритми, SCN осъществява приспособяването към външни светлинни стимули чрез ретинохипоталамичния тракт. Освен това факторите на околната среда като достъп до храна, физически усилия или медикаменти донагласяват основния осцилатор в SCN.

На клетъчно ниво коровите компоненти на циркадната система представляват транскрипционни фактори, които регулират с времето своя собствен синтез и разграждане в 24-часови цикли и формират саморегулиращи се обратни връзки [118]. Транскрипционните връзки, които се управляват от молекулярния биологичен часовник, настъпват в хроматина с помощта на множество регулаторни фактори, които произхождат от епигенетиката. Интересен факт е, че адаптацията на SCN към определени светлинни периоди зависи от ДНК метилирането на специфични гени, свързани с невротрансмитерни рецептори и йонни канали [119]. В периферните тъкани цитозиновото метилиране също така има циркадни осцилации, които участват в епигенетичите механизми и стареенето [120]. ССЗ, затлъстяването и метаболитния синдром се характеризират с циркадни нарушения [121]. Наскоро бромокриптин, D2 рецепторен агонист, който се прилага за лечение на хиперпролактинемия, галакторея, болест на Паркинсон, беше пуснат под формата на формула с бързо освобождаване за подобряване на инсулиновата резистентност. Когато се приема рано сутринта в началото на светлата част на деня, той рестартира циркадните ритми на допамин и серотонин в хипоталамуса [122].

## **1.7. Захарен диабет, сърдечно-съдови заболявания и епигенетика**

### **1.7.1. Метаболитен синдром и епигенетика**

Много автори считат, че факторите на околната среда, участващи през критични периоди от живота, включително феталното развитие, могат да повлияят върху риска от развитие на ССЗ и метаболитен синдром по-късно. Например Barker et al. установяват, че бебета, родени

с ниско тегло, имат увеличен риск от КАБ и че увеличаването на теглото при раждането намалява този риск [123]. Резултати от проучвания от бременности по време на гладуването в Дания посочват, че недохранването по време на бременността води до метаболитни промени в поколението, които персистират и в периода на зрялост. Мъже, родени от майки, които през първия триместър са гладували, са били с повишен риск от затлъстяване в сравнение с онези, родени от майки, при които недохранването настъпило през последния триместър от бременността [124]. В тази връзка би могло да се заключи, че тези дългосрочни промени започват поне отчасти от епигенетично медираните промени в генната експресия, които настъпват много рано в живота [125].

Метаболитният синдром включва различни симптоми и играе важна роля в сърдечно-съдовата заболяемост и смъртност. Той е прогресивен и се характеризира с инсулинова резистентност, абдоминално затлъстяване, дислипидемия, ЗД тип 2. Хиперинсулинемията е важна характеристика на метаболитния синдром. Епигенетичните механизми може би играят съществена роля във все още липсващите унаследяеми детерминанти на комплексни заболявания като метаболитния синдром, атеросклерозата, АХ, ЗД. Епигенетичната вариация е специфична, динамична и разнообразна, и въпреки че е интересна за изучаване, поставя много въпроси. Неяснотите относно причинността все още си стоят поради обратимостта на епигенетичните промени. Промяната в епигенетичния профил може да бъде разглеждан едновременно като причина и като следствие на фенотипа.

Епигенетичните модификации могат също така да променят експресията на инсулиновия ген. ДНК хипометилиране в промотерния му участък в  $\beta$ -клетките е от особена важност за тъканноспецифичната инсулинова експресия [126]. Пациенти със ЗД имат повишено метилиране на няколко CpG места в инсулиновия промотер в островите в сравнение с хора, които не са диабетици. Установено е, че излагането на  $\beta$ -клетъчни линии на високи глюкозни концентрации за три дни води до увеличаване на метилационния статус на инсулиновия промотер [127].

Предполага се, че епигенетични механизми играят важна роля в развитието на и предиспозицията към метаболитни заболявания като ЗД тип 2 и затлъстяване [128]. Има данни, които също подкрепят факта, че епигенетични процеси участват в прогресията на плаките и тяхната уязвимост при атеросклероза [42]. Заключение е, че патогенетичните

пътища, които са отговорни за развитието на ЗД тип 2 и ССЗ може би също имат епигенетичен произход [129].

Хипертриглицеридемия, повишен LDL и нисък HDL са характерни за метаболитния синдром и високия сърдечно-съдов риск. Въпреки че е установена наследственост от порядъка на 48% до 87% [130], известни генетични варианти обясняват около 10% от наблюдаваните вариации в плазмените липиди [131]. Основната част от тази вариабилност може да се отдаде на епигенетиката.

Ролята на епигенетиката в прогресията на диабета може също да се свърже и с оксидативния стрес. Хроничната хипергликемия увеличава формирането на крайни продукти на гликирането, което настъпва чрез реакции на неензимно гликозилиране между протеини и въглехидрати. Свързването на AGEs към техните рецептори RAGE върху  $\beta$ -клетките води до повишено образуване на свободни радикали – (ROS - reactive oxygen species) и индуциране на апоптоза [132].

## **1.7.2. Сърдечно-съдови усложнения при ЗД**

### **1.7.2.1. *Damage-associated molecular patterns (DAMPs)***

Молекули, които се освобождават от тъкани или клетки в отговор на нараняване или смърт, се наричат damage-associated molecular patterns (DAMPs). Те се освобождават от различни субклетъчни компоненти, включително плазмената мембрана, ендоплазмения ретикулум, ядрото и митохондриите. Те също така могат да произхождат от извънклетъчни източници като екстрацелуларния матрикс. Тези молекули изпращат различни сигнали към организма – за фагоцитоза, имуностимулация, имунен толеранс, регенерация и др. [133]. От гледна точка на сърдечно-съдовите усложнения две основни клетъчни популации са засегнати – ендотелните клетки и моноцитите/макрофагите. Дисфункцията на ендотелните прогениторни клетки и нарушената тъканна репарация в резултат на увреждащи сигнали се смятат за най-вероятната липсваща връзка между ЗД и сърдечно-съдовите усложнения [134]. Тези сигнали могат едновременно да увредят ендотела или да провокират епигенетични промени. Много свързани със ЗД фактори могат да нарушат функцията на митохондриите на клетките на ендотела и на моноцитите/макрофагите. Хипергликемията, липотоксичността, хипоксията са едни от най-изучаваните.

Важни DAMPs, които произхождат основно от митохондриите, са ROS и протеинът HMGB-1 (high mobility group box 1). Paneni et al. демонстрират, че в ендотелни клетки на човешка аорта и аорти от диабетни мишки, които са изложени на хипергликемия, се наблюдава персистиращо активиране на митохондриалния адапторен протеин и критичен регулатор на нивата на ROS p66(Shc) от увеличената протеин киназа C  $\beta$ II (PKC $\beta$ II) въпреки възстановяването на нормогликемия [135]. Високите глюкозни нива водят до епигенетична up-регулация на експресията на p66(Shc) и образуване на ROS, PKC $\beta$ II се активира и това поддържа високите нива на p66(Shc). По този начин се поддържат ROS-зависими епигенетични промени. Хистоните съдържат множество лизинови остатъци и това ги прави уязвими към ефектите на оксидативния стрес [136]. Прогресията на инсулиновата резистентност и ЗД, а също и на стареенето, се свързват с нарушения в оксидативен капацитет и митохондриална функция [137]. Възпалението предизвиква специфични промени в miRNA в култури от човешки адипоцити. Този ефект би могъл да свързва свързаното със затлъстяването възпаление и експресията на miRNA в  $\beta$ -клетки, което може да повлияе тяхната функционалност, екзоцитозата на инсулин и апоптозата [138]. Комбинацията от състояние на възпаление, митохондриална дисфункция и образуването на ROS описва един вероятен модел за патогенезата на ЗД тип 2 и би могла да обясни промените в епигенетичната регулация на генната експресия по време на влошаване на гликемичния контрол.

Важна връзка между оксидативния стрес и възпалението идва от генерирането на дисулфидна изоформа на HMGB-1. Той е важен хроматинов протеин като в ядрото взаимодейства с нуклеозоми, транскрипционни фактори и хистони, и по този начин участва в регулацията на генната транскрипция [139]. След клетъчна увреда или патофизиологично активиране на клетките HMGB-1 се ацетилира във висока степен, премества се в цитоплазмата, а след това и екстрацелуларно с активирана инфламазома [140]. В извънклетъчното пространство той отчасти се оксидира до дисулфидна форма с проинфламаторна активност. След стабилизирането на свободните радикали и на тази форма се стартира порочен кръг с увеличаване на възпалителния процес. Освободеният HMGB-1 по-нататък индуцира моноцитите и макрофагите, неутрофилите и дендритните клетки, които да секретират инфламаторни цитокини [141].

При ЗД тип 2, затлъстяване и инсулинова резистентност се развива субклинично и хронично възпаление. То се характеризира със свръхекспресия на цитокини, които се образуват от адипоцитите, активираните макрофаги и други клетки. Проучване върху мастната тъкан на монозиготни близнаци, при които само единият е със ЗД, съобщава за повишена експресия на гени на възпалението заедно с вариации в общото и локално ДНК метилиране [142]. Инфламаторни медиатори като PAI-1, CRP, фибриноген и други взимат участие в сигнални пътища, в инсулиновото действие и в увеличаване на възпалителния отговор. Тези цитокини също са свързани с хронични възпалителни процеси, които причиняват натрупване на липиди и развитие на атеросклероза, и на ССЗ.

#### **1.7.2.2. *Neutrophil extracellular traps (NETs)***

NETs са описани за пръв път от Brinkmann et al. като екстрацелуларно освободен хроматин, покрит с гранулиран протеин с антимикробни свойства [143]. Това е уникална форма на неутрофилна смърт с освобождаване на декондензиран хроматин и е един от първите стадии на формиране на тромб [144]. При този процес хроматинът се подлага на посттранслационни промени, които се катализират от ензими, и така се регулира нагъването на протеините. Цитрулинирането е най- добре охарактеризираната посттранслационна модификация [145]. Декондензацията на хроматина, извършвана от пептидиларгинин деиминаза 4 (PAD4), ензим, който цитрулинира аргининовите остатъци на хистоните, също е описана като транскрипционен корепресор, потискащ експресията на някои гени, като в този процес критичен епигенетичен феномен е иницирането на формирането на NETs и тромбозирание [146]. Наскоро е установено, че HMGB-1 може би е индуктор на образуването на NETs [147]. Това би могло да обясни връзката между оксидативния стрес, субклиничното и хронично възпаление и протромботичното състояние, наблюдавани при ЗД. Хипергликемията сама по себе си също води до формирането на NETs [148], а от друга страна и същото се установява и за хиперхомоцистеинемията при ЗД [149]. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), който е важен промотер за моноцитната адхезия към артериалните ендотелни клетки, а също и MCP1, който контролира инфилтрацията с макрофаги, се повишават при транзиторна хипергликемия и остават високи при последващото възстановяване нивата на плазмената глюкоза [150]. Образуването на NETs играе важна роля в съдовите усложнения при ЗД като иницира или ускорява ефектите на липотоксичността, микросъдовото възпаление и

нарушената васкуларна репарация, ендотелната дисфункция, директната съдовоклетъчна увреда, инсулиновата резистентност, формирането на автоантитела, тромбозата и хиперкоагулацията, атероклерозата, руптурата на плаките и кръвоизливите вътре в тях [151].

### ***1.7.2.3. Хиперхомоцистеинемия***

Хомоцистеинът е сярна-съдържаща непротеиногенна аминокиселина. Взема участие в множество метаболитни пътища и се образува от метионин чрез премахване на крайната метилова група. Ензимът МТНFR катализира превръщането на 5,10-метилентетрахидрофолат в 5-метилтетрахидрофолат, а също и участва в транспорта на метилови групи към цитозин, което е епигенетичен механизъм. Скорошно епигенетично проучване установява, че хипеметилирането в промотера на гена за МТНFR се асоциира с диабетна ретинопатия и нефропатия, а също и има връзка с някои биохимични показатели като общ холестерол, LDL и общия антиоксидантен капацитет [152]. При ЗД тип 2 плазмените нива на хомоцистеин са увеличени [153]. Смята се, че увеличеният хомоцистеин чрез генериране на оксидативен стрес води до инсулинова резистентност [154]. Хиперхомоцистеинемията ускорява ефекта на хипергликемията, а също така и развитието на диабетна кардиомиопатия, като индуцира оксидативен стрес и намалява PPAR  $\gamma$  (peroxisome proliferator – activated receptor gamma) [155]. Пациенти със съдови заболявания имат повишени нива на хомоцистеин, но и намалено ДНК метилиране, което подкрепя ролята на хиперхомоцистеинемията в модулирането на епигенетични механизми [156].

### ***1.7.2.4. Ендотелна дисфункция***

Диабетните съдови усложнения се дължат на атеросклеротични промени в кръвоносните съдове. Ролята на повишената експресия на проинфламаторните фактори от ендотелните клетки изглежда от особено важно значение за ускоряването на атеросклерозата и руптурата на плаките при ЗД. Хипергликемията индуцира миграция и пролиферация на съдовите гладкомускулни клетки и увеличава акумулирането на макрофаги [157]. Има данни, че всички тези механизми се модулират от епигенетични фактори. Проучване сравнява проби от човешка аорта от здрави и от хора с атеросклероза. Резултатите показват специфични за атеросклерозата епигенетични промени, които се характеризират с CpG хиперметилиране в

атеросклеротичния съд, и със специфични модификации на гени, функционално свързани със съдовата хомеостаза [158]. Откриват се и множество CpG локуси в гени от атеросклеротичните плаки, при които се увеличава метилирането с прогресирането на лезиите [159]. При ендотелни клетки, изложени на хипергликемия, са установени ДНК метилационни модели, които корелират с транскрипционната активност на различни гени, свързани с метаболитни и сърдечно-съдови заболявания [160]. Установено е, че дори преходна хипергликемия причинява различни лизинови промени в хистоните за до шест дни след възстановяване на нормалните глюкозни нива.

Най-ранните установими промени в увредените от различни процеси съдови стени са нарушения в ендотела, което причинява загуба на нормалната хомеостатична функция. Епигенетични ДНК промени в гена за азотен оксид синтазата NOS могат да засегнат образуването на азотен оксид NO, дебелината на интима-медия на каротидните артерии и атерогенезата [161]. Нарушеното образуване на NO и простаглицин от ендотелните клетки, а също и повишения синтез на PAI-1, стимулират пролиферацията на гладкомускулните клетки на кръвоносните съдове чрез повишаване на експресията на ангиотензин тип 1 рецептора [162].

Транскрипционният фактор NF- $\kappa$ B играе важна роля в амплифицирането и поддържането на възпалителния отговор, и формира молекулната основа на хроничното възпаление при ЗД. Установено е, че HATs (histone acetyltransferases) и HDACs участват в модулирането на активността на NF- $\kappa$ B и по този начин те играят роля в механизмите на пролиферация на гладкомускулните клетки, дисрегулацията на ендотелните клетки на интимата, активирането на фибробластите и на макрофагите, и в участието на протеини на екстрацелуларния матрикс в процеса на съдово ремоделиране [163].

Множество miRNA вземат участие в механизмите на съдово ремоделиране и също допринасят за прогресията на различни ССЗ като МИ, сърдечна недостатъчност, атеросклероза, пулмонална артериална хипертония, рестеноза, аневризми и др. Някои miRNA обаче са включени в превенцията, а други – в напредването на съдовите лезии [164]. В развитието на ЗД моделът на плазмените miRNA е свързан с нарушено периферно ангиогенно сигнализиране [165].

## **1.8. Роля на някои miRNA в развитието на сърдечно-съдови усложнения и ЗД**

Екстрацелуларни miRNA са установени за пръв път в телесните течности през 2008г – в кръв, но също така и в урина, цереброспинална течност и слюнка [166]. От тогава няколко проучвания доказват, че miRNA могат да се секретират в кръвния поток от различни органи като например сърце, съдови ендотелни клетки, скелетни мускули, черен дроб, мозък [167]. Те циркулират в кръвта и са резистентни на деградация, за разлика от повечето РНК [168]. Съществуват данни, че те са протектирани от разграждане поради пакетиране в извънклетъчни везикули или свързване с РНК-свързващи протеинни комплекси [169]. От друга страна проучвания посочват потенциалната роля на екстрацелуларните miRNA като медиатори в междуклетъчната комуникация. MiRNA във везикули могат да постъпят в клетките и да доведат до промени в генната експресия и функцията им [170]. Установена е връзката на промените в нивата на циркулиращите miRNA с определени физиологични състояния като стареене, физическа активност, бременност [171, 172]. Циркулиращите miRNA могат да са в голямо количество при различни заболявания. Тяхната експресия е различна при здрави хора и при такива със ССЗ [168, 173]. Предполага се, че miRNA биха могли да се използват като биомаркери за диагнозата и прогнозата на съдовото ангажиране при болни от ЗД пациенти [174].

Систематичен метаанализ на дисрегулирани miRNA при ЗД тип 2 разглежда 59 независими проучвания с цел да изучи функционалната връзка на miRNA в патологията на диабета [175]. Авторите са идентифицирали 158 дисрегулирани miRNA. Функционалната роля на miRNA в ЗД се изразява чрез следните механизми: негативна регулация на  $\beta$ -клетъчното оцеляване [176]; инхибиране на  $\beta$ -клетъчната пролиферация [177]; модулиране на инсулиновата чувствителност чрез регулиране на молекули от инсулиновия сигнален път в периферните тъкани [178]; клетъчната диференциация [179]. В скелетните мускули са установени 29 miRNA с намалена експресия и 31 с увеличена в сравнение със здрави контроли [180]. Засегнатите miRNA в мастната тъкан взаимодействат с множество транскрипционни фактори като PPAR  $\gamma$ , с GLUT4 и др., като регулират много аспекти на липидния и глюкозния метаболизъм [181]. Дисрегулираните miRNA и техните таргетни иРНК могат да посочат нови гледни точки по отношение на патологията при ЗД тип 2 и да допринесат за

алтернативни начини за мониториране и справяне със заболяването. Проучване показва, че при пациенти със ЗД тип 2 miRNA-28-3 е свръхекспресирана, а нивата на 12 други miRNA са с намалена експресия. Намалването на miRNA-126 е сигнификантен предиктор за развитието на ЗД. MiRNA-15a, miRNA-29b, miRNA-126 и miRNA-223 са намалени при болни от диабет пациенти [165]. В панкреасните  $\beta$ -клетки острови с повишена експресия на miRNA-375 се срещат по-често при ЗД тип 2 и се установява, че тя модулира  $\beta$ -клетъчната функция чрез няколко физиологични механизми. MiRNA-375 потиска секрецията на инсулин и транскрипцията на инсулиновия ген, запазва  $\beta$ -клетъчната маса, пролиферацията и регенерацията, и участва в ембрионалното развитие на панкреаса [182]. Известно е, че miRNA контролират инсулиновата сигнална трансдукция в различните тъкани. Клинични проучвания докладват за намалена експресия на miRNA-133 и повишена на miRNA-503 в скелетните мускули при ЗД [183]. За предиктивни за развитие на ЗД се смятат и miRNA-15a, miRNA-29b, miRNA-126 и miRNA-223, които са по-ниски при хора, които впоследствие развиват болестта [165]. Счита се, че miRNA биха могли да помогнат в прогнозата на ЗД, също така и да бъдат фармакологични таргети при лечението на заболяването.

В големи кохортни проучвания е доказано, че miRNA са потенциални прогностични маркери за развитие на КАБ, включително и при хората с диабети. Полиморфизъм на miRNA-451 се асоциира с по-висока честота на увеличена кръвна захар на гладно, на ЗД тип 2, а също и на по-лоша преживяемост при КАБ [184]. Motawaе et al. доказват, че miRNA-9 и miRNA-370 са много по-високи при пациенти с КАБ и ЗД тип 2 в сравнение с такива, които имат само ЗД или само КАБ [185]. Zampetaki et al. установяват, че miRNA-126 е силен прогностичен фактор за развитие на МИ. При пациенти със ЗД тип 2 и КАБ са налице по-ниски нива на експресия на miRNA-126 в циркулиращи ендотелни клетки [186].

Други проучвания също установяват, че различни miRNA са променени при ЗД и при ССЗ. Добрият гликемичен контрол намалява някои от симптомите при диабета, но е известно, че дори и след оптимизирането на нивата на кръвната захар диабетната кардиомиопатия прогресира. Дори след подобряване на контрола на ЗД при мишки с диабет дисрегулацията на miRNA, които участват в метаболитни пътища от миокардната увреда (дисрегулирани miRNA-221, miRNA-146a, miRNA-34a, miRNA-210, miRNA-19b, miRNA-27a, miRNA-155), персистират [187]. Nielsen et al. установяват, че веднага след физическо натоварване няколко

miRNA, включително miRNA-16 и miRNA-221, сигнификантно се понижават в циркулацията [188]. Данните предполагат, че това е от особено важно значение за отговора на сърцето към физиологичния стрес по време на натоварване. Ikitimur et al. откриват връзката между експресията на miRNA и параметри от електрокардиограмата, свързани с LVMI (left ventricular mass index) при пациенти с хронична СН. Резултатите сочат, че 29 miRNA са променени при хронична СН. Измежду тях miRNA-155 показва директна корелация с LVMI [187]. Доказано е, че при подобряване на СН, изразено чрез спад в нивата на BNP (B-type natriuretic peptide), се понижават нивата на miRNA-210, miRNA-126 и miRNA-423. Циркулиращите miRNA-1306 са позитивно свързани с неблагоприятен изход при остра СН. Повишените нива на miRNA-208b и miRNA-499 имат доказана връзка с повишен риск от СН и смърт [189].

В животински модели с остър МИ серумните нива на miRNA-1, която е регулатор на развитието на сърдечния мускул и диференциацията, достигат своя пик на шестия час след инфаркта и се връщат до изходни стойности след три дни. Нивата ѝ също така са позитивно свързани с големината на МИ [190]. Пациенти с остър МИ имат и сигнификантно увеличени нива на miRNA-21 в сравнение със здрави контроли. Тя би могла да се използва като нов биомаркер за предсказване на ремоделирането на лявата камера след инфаркт. MiRNA-21 корелира и с нивата на общата и МВ-фракцията на креатин киназата, и с тези на тропонина. [191].

MiRNA-16 играе важна роля в контрола на ангиогенезата и съдовия интегритет, а също така е и свързана с оцеляването, запазването и формирането на нови капиляри [192]. VEGF (Vascular endothelial growth factor) е таргет на miRNA-16 в ендотелните клетки. Chamorro et al. са демонстрирали, че miRNA-16 инхибира ендотелната функция и ангиогенезата чрез модулиране на експресията на VEGF [193]. Fernandes et al. наблюдават промени в експресията на miRNA-16 при мишки със затлъстяване и нарушение в глюкозния толеранс – има увеличение в експресията ѝ в сърцето и същевременно намаляване в експресията на VEGF [194]. Установено е, че нивата на miRNA-16 са повишени в серума и в проангиогенни клетки на пациенти със ЗД с критична исхемия на крайниците [195].

Има данни, че miRNA-155 заема важно място в процесите на хематопоеичната диференциация, имунитетът, възпалението, съдовото ремоделиране, и по този начин се

свързва с различни ССЗ [196]. Проучване демонстрира, че miRNA-155 е специфично експресирана в атеросклеротични плаки и проинфламаторни макрофаги, и стимулира развитието на атеросклероза [197]. От друга страна обаче Yao et al. установяват, че експресията ѝ е намалена при пациенти с остър коронарен синдром [198]. При хора с ранна коронарна атеросклероза miRNA-155 е с потисната експресия в плаките [199]. Като цяло може да се заключи, че тези разнопосочни резултати за miRNA-155 в патофизиологията на атеросклерозата показват комплексността на тази мултифункционална молекула в регулацията на сърдечно-съдовото моделиране. Евентуалните причини за това биха могли да са свързани с различните патологични стадии на това състояние. Установено е, че експресията на miRNA-155 е up-регулирана при СН. В голямо проучване на miRNA от проби от лява камера при мишки със стрептозотоцин-индуциран диабет се открива, че miRNA-155 остава сигнификантно променена в сърдечните тъкани дори след възстановяване на нормалните нива на гликемията [200]. Дефицитът на miRNA-155 би могъл да предотврати развитието на сърдечна фиброза вследствие на ЗД при мишки и да намали синтеза на колаген, провокиран от високите нива на глюкоза във фибробластите на кардиомиоцитите [201].

Проучвания, които използват човешки ендотелни клетки от умбиликалната вена (HUVEC), посочват, че miRNA-221 регулира ангиогенезата в отговор на стволовоклетъчни фактори (SCF) вероятно чрез потискане на клетъчното оцеляване, миграцията и съдовото формиране, а също така взема участие и при диабет-индуцираната ендотелна дисфункция [202]. Въпреки че все още не е ясно дали експресията на miRNA-221e променена по време на физиологичния процес на формиране на капилярите в отговор на SCF, е установено, че модулирането ѝ е потенциален път за терапевтично повлияване на ангиогенезата. Пациенти с хронично артериално заболяване имат увеличени нива на miRNA-221 в ендотелните прогениторни клетки и това води до тяхната мобилизация [203]. Връзката между miRNA-221 и сърдечно-съдовата система е известна. Експресионните ѝ нива са измерени в серумни проби от пациенти с инсулт и така тя става нов биомаркер за това заболяване [204]. Циркулиращите ѝ нива са завишени при хора след остър МИ [205]. От друга страна обаче те са понижени при пациенти със СН и тежка сърдечна фиброза. Това предполага, че miRNA-221 играе важна роля в регулирането на клетъчното оцеляване при пациенти със ССЗ [206].

Експресията на miRNA-210 се повишава в условията на хипоксия, а е установено, че притежава проангиогенни свойства *in vitro* [207]. Свърхекспресията ѝ в ендотелните клетки води до ускорено съдово формиране при нормални условия. Проучванията потвърждават, че miRNA-210 участва в регулацията на хипоксия-индуцирания клетъчен отговор. Тя се ир-регулира в условия на исхемия като МИ и СН при пациенти със ЗД [208, 209]. Съществуват данни, че нивата на miRNA-210 са позитивно свързани със степента на СН по класификацията на NYHA [189]. Промени в експресията на miRNA-210 често са наблюдавани в периферна кръв или увредени тъкани на пациенти със ССЗ, включително атеросклероза, остър коронарен синдром, сърдечно клапно заболяване, белодробна артериална хипертония и СН [210]. В някои клинични проучвания са установени повишени нива на miRNA-210 в плазма и урина на младежи със ЗД тип 1 [211]. Amr et al. изследват експресията на miRNA-210 и miRNA-126 при хора със ЗД тип 2 с или без КАБ и откриват, че и в двете групи експресията на miRNA-210 е ир-регулирана. От двете групи обаче пациентите с КАБ имат по-изразена промяна в нивото на miRNA-210 в сравнение с тези само със ЗД. От друга страна обаче нивото на miRNA-126 при ЗД е намалено в сравнение със здрави контроли, а пациентите с КАБ имат по-ниска експресия в сравнение с онези без. В резултат може да се заключи, че miRNA-210 и miRNA-126 са епигенетични биомаркери за ЗД тип 2 със съдови усложнения, особено КАБ [212].

Проведено е проспективно проучване с 10-годишно проследяване, при което са идентифицирани множество циркулиращи miRNA (включително и miRNA-424-5p), които предсказват развитие на бъдещ фатален МИ при здрави участници. Sayed et al. предполагат, че miRNA-149, miRNA-424 и miRNA-765 биха могли да се използват като нови индикатори за диагнозата на КАБ [208]. Известно е, че miRNA-424 стимулира ангиогенезата при хипоксия [213]. Експресията ѝ е увеличена при компенсаторно уголемяване на сърцето в резултат от прогресията на СН в хроничната ѝ фаза. По този начин miRNA-424 би могло да бъде полезен индикатор за мониториране на напредването на СН, но е неподходяща за предсказване на риска от настъпване на внезапна сърдечна смърт [214].

## **1.9. Експресия на някои съдово-ендотелни маркери при ЗД тип 2**

### **1.9.1. Ендотелни прогениторни клетки**

Известно е, че хипергликемията при ЗД води до увреждане на кръвоносните съдове и поява на усложнения на заболяването. Ендотелните прогениторни клетки (ЕРС) участват във възстановяването на ендотела и в процеса на ангиогенеза чрез секретирание на ангиогенни фактори или чрез инкорпориране в нарушения ендотел и диференциране в ендотелни клетки [215]. Те се определят като основни участници в поддържането на ендотелната хомеостаза. ЕРС са хетерогенна популация. Различни проучвания установяват, че съществуват ендотелни прогениторни клетки, наречени ендотелни колония-формиращи клетки (ЕСFC). Те са способни да генерират фенотипно и функционално компетентни ендотелни клетки [216]. В отговор на нараняване или хипоксия те мигрират към мястото на лезията и се инкорпорират в увредения ендотел [217]. Освен тях, съществуват и хематопоетични прогениторни клетки, които упражняват проангиогенна активност, но не могат директно да проникнат в нарастващите съдове. Те осъществяват този проангиогенен ефект чрез паракринен механизъм, базиран на секрецията на различни растежни фактори и цитокини [216]. ЕРС експресират различни маркери върху клетъчната си повърхност, които са подобни на тези на съдовите ендотелни клетки [218]. Установено е, че балансът на нивата на ЕРС отразява здравния статус на ендотела [219]. Аберантни техни нива в периферната кръв са открити при различни клинични състояния като сърдечно-съдови, метаболитни, белодробни, онкологични, а също и при атеросклероза; могат да бъдат използвани при прогнозиране на риска от развитие на реакция на присадката срещу гостоприемника след алогенна трансплантация на хемopoетични стволови клетки [220, 221]. Циркулиращите ендотелни клетки (ЦЕК), които имат типични ендотелни характеристики, се отделят от стените на съдовете след съдови увреждания или физиологична репарация на ендотела [222]. От друга страна, ЕРС, характеризиращи се с незрял фенотип, са костно-мозъчни резидентни клетки, мобилизирани при специфична стимулация. Веднъж мобилизирани в кръвния поток, те се насочват към таргетните тъкани, където се включват в ремоделирането на ендотела, а също и в постнаталната неоваскуларизация [223]. Характеризирането на ЦЕК и на ЕРС в кръвния поток са предложени като потенциални биомаркери, способни да предоставят ценна информация за патологичните състояния и отговора към лечението, включително и при съдово увреждане, регенерация и растеж [224]. Въпреки това, най-вече

поради тяхната рядкост – открити са под 50 ЦЕК или EPC на милилитър в периферната кръв на здрави индивиди – все още няма приети консеснусни насоки по отношение на идентификацията и количественото им определяне [225].

Предложени са няколко комбинации маркери за идентификация на ЦЕК и EPC. Най-широко приетият фенотип, докладван за ЦЕК, ги идентифицира като CD34+/CD45-/CD146+/CD31+ [226]. Въпреки че профилът на антигените за EPC е бил широко изследван, той продължава да е спорен. В тази връзка EPC са идентифицирани като CD34+/CD133+/VEGFR2+ [227]. Този фенотип до голяма степен се припокрива с антигенния профил, докладван за хемопоеични стволови клетки [228]. Установено е, че използването на CD133 за идентифициране на EPC е довело до изолиране на клетки, които не са били способни да се идентифицират към ендотелната линия [229]. Когато се анализират проби от пъпна връв, VEGFR2 се появява слабо, но е ясно изразен върху всички CD34+/CD45- клетки. От друга страна, CD34+/CD45dim хемопоеични стволови клетки никога не експресират VEGFR2 на техните повърхности, но експресират CD133, когато се наблюдават в проби от периферна кръв. При здрави индивиди класическият фенотип на EPC – CD45dim/CD34+/CD133+/VEGFR2+, не е откриваем, понеже експресията на CD133 и на VEGFR2 взаимно се изключва. Тези резултати са в съответствие с последните данни, които показват, че CD34+/CD133+ клетки от периферна кръв и пъпна връв развиват хемопоеични, но не и ендотелни колонии *in vitro* [228].

### **1.9.2. Влияние на хипергликемията върху съдовото увреждане**

Хипергликемията и ендотелната дисфункция са основните причини за съдовите усложнения при пациенти със ЗД [230]. Експресията и фосфорилирането на азотен оксид синтазата на ендотела (eNOS) са много важни за оцеляването и мигрирането на EPC и на ендотелните клетки [231]. Азотният оксид, който се образува под влиянието на eNOS, води до мобилизация на EPC чрез повишаване на експресията на VEGF и по този начин VEGF играе критична роля в регулирането на функциите на EPC [232]. Известно е, че генерирането на големи количества ROS допринася за ендотелната дисфункция и участва в увреждането на кръвоносните съдове [233]. При пациенти със ЗД образуването на ROS е увеличено и води до развитието на диабетни съдови усложнения. От друга страна, хипергликемията може да наруши образуването на азотен оксид от ендотела и да доведе до формирането на AGEs

[234]. Повишеното образуване на ROS може да стимулира продукцията на AGEs, което стимулира още повече формирането на ROS. И двата процеса също така активират транскрипцията на NF- $\kappa$ B [235]. NF- $\kappa$ B е транскрипционен фактор и повечето от таргетните му гени кодират инфламаторни протеини като интерлевкин 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  и p53, а също така и индуциращата форма на NOS (iNOS), и така каскадата на възпалителния процес се потенциира [236]. Високите нива на кръвна захар също така се свързва с намаляване в броя и функцията на EPC. Също причинява влошаване на EPC чрез един от таргетните гени на NF- $\kappa$ B, а именно тумор супресорния ген p53 [237]. Индуцираният от хипергликемията оксидативен стрес, ROS и AGEs са основните фактори за дисфункцията и апоптозата на EPC. От друга страна, те са мощни индуктори на епигенетични промени в EPC [215].

### **1.9.3. Роля на VEGF и неговите рецептори**

VEGF е сигнален протеин, който се образува от клетките, и стимулира формирането на кръвоносни съдове. Това е под-семејство от растежни фактори, важни за ангиогенезата. Той е част от тази система и участва във възстановяването на кислородното снабдяване в тъканите в условия на хипоксия [238]. Серумните му концентрации са високи при ЗД [239]. Семејството на VEGF се състои от няколко членове. Активността на VEGF-A е най-изучавана върху съдови ендотелни клетки, въпреки че той притежава ефекти и върху много други клетъчни типове. VEGF-A и кореспондиращите му рецептори бързо се up-регулират след травматично увреждане на ЦНС. Той е високо експресиран в острите и подострите стадии на увреждане на ЦНС, но експресията му с времето намалява като тя кореспондира с ендогенния реваскуларизационен капацитет [240]. Въпреки че не е биомаркер за диагнозата на остър исхемичен инсулт, високите нива на VEGF в първите 48 часа се свързват с лоша прогноза [241]. VEGF-A се асоциира и с лоша прогноза при карцином на гърдата. Много проучвания показват намалена преживяемост при пациенти с тумори, които свръхекспресират VEGF. Свръхекспресията на VEGF-A може да бъде първа стъпка в процеса на метастазирането, при което е включена ангиогенеза [242]. VEGF-A е важен за развитието на диабетна ретинопатия. Микроциркулаторните проблеми в ретината на хората с диабет могат да доведат до исхемия, при което се освобождава VEGF-A [243]. В бъбреците повишената експресия на VEGF-A в гломерулите директно води до гломерулна хипертрофия и се свързва с протеинурия [244]. Серумните нива на VEGF-D са

сигнификантно увеличени при пациенти с ангиосарком [245]. VEGF-D е също така свръхекспресиран при лимфангиолейомиоматоза и понастоящем се използва като диагностичен маркер в лечението на това рядко заболяване [246]. Генни терапии при рефрактерна ангина стимулират експресията на VEGF в епикардните клетки, което да доведе до ангиогенеза [247].

VEGF се свързва към няколко рецептора. VEGFR1 е необходим за набирането на хематопоетични стволови клетки и за мигрирането на моноцитите и макрофагите; VEGFR2 регулира съдовата ендотелна функция; VEGFR3 участва в активността на ендотела на лимфните съдове [248]. VEGFR2 медира почти всички известни клетъчни отговори към VEGF. Функцията на VEGFR1 е по-малко известна, въпреки че се счита, че модулира сигнализирането на VEGFR2 [249]. Установено е, че физиологични нива на VEGF стимулират пролиферацията на ендотелни клетки чрез VEGFR2, а също така и активацията на eNOS за образуването на азотен оксид чрез VEGFR1 [215]. образуването на VEGF-A може да се стимулира в клетки, при които има недостиг на кислород. В този случай клетките образуват индуцируем от хипоксия фактор (HIF – hypoxia-inducible factor), който стимулира освобождаването на VEGF-A. Циркулиращият VEGF-A след това се свързва към рецепторите си върху ендотелните клетки, което стартира процеса на ангиогенеза [248]. При диабетните микросъдови усложнения се наблюдава аберантна ангиогенеза, която се характеризира с локална експресия на индуцирания от хипоксията VEGF, намаляване на нивата на азотен оксид, оксидативен стрес, повишен съдов пермеабилитет и възпаление. VEGF провокира абнормна пролиферация на ендотелните клетки чрез VEGFR-2 [215]. Различни проучвания установяват, че EPC експресират VEGFR-2 и неговото активиране регулира клетъчната пролиферация [250].

#### **1.9.4. EPC при захарен диабет и неговите усложнения**

Различни цитометрични и други методи демонстрират, че пациентите със ЗД тип 1 и тип 2 имат по-малко циркулиращи EPC в сравнение със здрави контроли. От друга страна, EPC при пациенти със ЗД показват функционални нарушения като намалена пролиферация, адхезия, миграция [251]. Механизмите, които водят до намаляването на EPC при ЗД включват по-слаба мобилизация от костния мозък, намалена пролиферация и скъсен живот в периферната кръв. Освобождаването на EPC от костния мозък в отговор на мобилизиращи

стимули зависи от комплексни връзки в локалната му среда. Тъканната исхемия се счита за основен стимул за мобилизиране на ЕРС чрез активиране на HIF-1. HIF-1 е хетеродимерен транскрипционен фактор, който се състои от субединиците HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\beta$ . Докато HIF-1 $\beta$  е постоянно експресиран, експресията на HIF-1 $\alpha$  зависи от клетъчните кислородни концентрации. В условията на клетъчна хипоксия HIF-1 $\alpha$  формира димери с HIF-1 $\beta$ . В резултат така образуваният HIF-1 се свързва с определени участъци на ДНК и това води до транскрипцията на гени като тези на VEGF, еритропоетин и stromal-derived factor (SDF)-1 [252]. Установено е, че експресията на ангиогенните фактори VEGF и HIF-1 $\alpha$  е намалена в сърцето на хора със ЗД при остър коронарен синдром и че големината на МИ при плъхове е увеличена поради намалена експресия на HIF-1 $\alpha$  [253]. Поради тази причина по-слабото формиране на колатерали при ЗД може да води до по-слаба стимулация на костния мозък от исхемичната тъкан. Наскоро е установено, че мобилизирането на ЕРС от костния мозък след исхемия е нарушено при плъхове с диабет. Невъзможността за мобилизацията на ЕРС се свързва с down-регулация на HIF-1 $\alpha$  и по-слабо освобождаване на костно-мозъчни стимулиращи фактори като VEGF и SDF-1, което от своя страна води до недостатъчна компенсаторна ангиогенеза [254].

Механизмите на ендотелно увреждане при ЗД са добре известни, а също така е ясно, че промяната на ендотелна в хода на времето би могло да доведе до развитие на микро – и макроангиопатични усложнения. Някои автори се опитват да намерят връзка между увреждането на ендотела и ЕРС при пациенти със ЗД. Kusuyama et al., а по-късно и Egan et al. показват, че при хора със ЗД тип 2 броят на ЕРС намалява в сравнение със здрави контроли, но и е открита връзка с нивата на HbA1c. Освен това се съобщава, че броят на предполагаемите ЕРС е толкова по-малък, колкото по-многобройни са усложненията от заболяването [255, 256]. Намаляването на циркулиращите CD34+ прогениторни клетки в ранните стадии на ЗД тип 2 може да се наблюдава при индивиди с нарушен глюкозен толеранс. Това намаляване продължава с времето и се влошава при пациенти с напреднали усложнения [257]. От друга страна обаче има и автори, които представят данни с повишени нива на циркулиращи и култивирани ЕРС при пациенти с диабет и усложнения, главно напреднала и пролиферативна диабетна ретинопатия [258]. Asnaghi et al. например установяват, че броят на ЕРС е увеличен при пациенти с пролиферативна ретинопатия в сравнение с хора със ЗД без ретинопатия. В този случай клетъчната пролиферация или

мобилизация би могла да се обясни със стимулирането на ретиналната ангиогенеза [259]. За съжаление обаче функциите на тези ЕРС като мобилизация и миграция често е нарушена. И този модел на увеличен брой ЕРС, но с неправилна функция, се наблюдава и при ЗД тип 1, и при ЗД тип 2 [260].

Както е известно, ЗД тип 2 се характеризира и с инсулинова резистентност. Доказано е, че терапията с инсулинови сенсibiliзатори като метформин и PPAR  $\gamma$  агонисти възстановява броя на ЕРС при ЗД тип 2 независимо от гликемичния контрол [261]. Ефектът на инсулиновата резистентност върху ЕРС може да се дължи поне отчасти на системните действия на инсулина като например оксидативен стрес, възпаление, повишаване на СМК, или директно върху костно-мозъчните клетки и ЕРС [262]. Установено е също така, че и други антидиабетни медикаменти като DPP4-инхибитори и GLP-1 рецепторните агонисти могат да повишат броя и да подобрят функцията на ЕРС като увеличат бионаличността на азотен оксид [263]. Лечението с инсулин с оглед достигане на нормални нива на кръвната захар по време на исхемия и реперфузия отчасти възстановяват възможността за мобилизиране на ЕРС чрез повишена регулация на растежни фактори [264].

Често усложнение на ЗД, което засяга голяма част от пациентите, е диабетната полиневропатия (ДПНП). Загубата на сетивност в долните крайници може да доведе до наранявания, придружени от разязвявания (често в резултат и на влошеното кръвоснабдяване), които в краен случай да прогресират до ампутация. В експериментални условия бе установено, че ДПНП се характеризира с нарушена микроциркулация в периферните нерви, причинена от засягането на невралните съдове. ЕРС могат да бъдат кандидат за лечението на това усложнение, тъй като те притежават паракринни свойства, които имат както ангиогенни, така и невротрофични ефекти [265]. Установено е, че пациенти със ЗД и периферна артериална болест имат намалени нива на циркуиращи ЕРС особено при наличието и на исхемични лезии. ЕРС в този случай са с нарушена пролиферация и адхезия към зрелия ендотел [266].

Увреждането на ендотелните клетки настъпва рано в хода на ХБЗ, но възстановяването им е нарушено поради дефекта на ЕРС при ЗД. Пациентите с ХБЗ имат доказано количествени и качествени изменения в ЕРС [267]. Като цяло механизмите са неизвестни, но се предполага, че вероятно уремичните токсини вземат участие, понеже хемодиализата и

бъбречната трансплантация са в състояние да възстановят ендогенния пул на ЕРС [268]. Установено е, че връзката между бъбречната функция и ЕРС е доста по-комплексна, понеже еритропоетинът се явява преобладаващ регулатор за мобилизацията и диференциацията на ЕРС [269]. Връзката кислород – еритропоетин, която зависи от HIF-1 $\alpha$ , е с нарушена регулация при ЗД. Мобилизирането на ЕРС при диабет не е изправно поради down-регулация на HIF-1 $\alpha$  [254]. Makino et al. докладват за негативна корелация между броя на ЕРС и албуминурията при ЗД [270].

Yoon et al. демонстрират, че диабетната кардиомиопатия при плъхове се характеризира с ранно и прогресивно намаляване на експресията на VEGF в миокарда, което води до намаляване в гъстотата на капилярната мрежа, повишена фиброза и нарушен контрактилитет. Нивата на ЕРС са били намалени. Възстановяването на миокардната експресия на VEGF повишава циркулиращите ЕРС и води до подобряване в миокардната микроциркулация [271].

## **1.10. Влияние на витамин D и кетогенната диета върху показатели на метаболитния синдром**

Както е известно, панкреасните  $\beta$ -клетки в Лангерхансовите острови допринасят съществено за глюкозната хомеостаза, наред с други механизми, чрез детекция на промяната в плазмените концентрации на глюкоза, като по този начин регулират скоростта, с която се синтезира и освобождава инсулинът. За кратки периоди от време образуването на инсулин се контролира основно от транслацията на вече наличната иРНК. За по-дълги периоди обаче нивата на иРНК се модулират от скоростта на транскрипция на инсулиновия ген и от промените в темпа на разграждането ѝ. Тези дългосрочни промени са от съществено значение, които позволяват на  $\beta$ -клетките да се адаптират към разлики в диетата или периоди на гладуване [272].

### **1.10.1. Роля на витамин D**

Освен участие в регулацията на калциево-фосфорната хомеостаза в организма, витамин D притежава и много роли в клетъчната диференциация, инхибиране на клетъчния растеж и имуномодулацията. Адекватното ниво на витамин D намалява оксидативния стрес, подобрява митохондриалните и ендокринните функции като по този начин редуцира риска

от някои нарушения в организма като автоимунитет, метаболитни заболявания, нарушения в поправката на ДНК [273]. Наскоро е установено, че витамин D участва в регулацията на ДНК метилирането, а също и в други епигенетични механизми, което представлява допълнителен начин за модулиране на генната експресия. От друга страна, дефицитът на витамин D води до промяна в инсулиновите синтез и секреция при животински модели и при хора. Той може да предразположи към нарушение в глюкозния толеранс, нарушена инсулинова секреция и ЗД тип 2. Възстановяването на нивото на витамин D подобрява гликемията и инсулиновата секреция при пациенти със ЗД тип 2 с установена хиповитаминоза D, като това предполага ролята му в патогенезата на заболяването.

Дефицитът на витамин D е глобален здравен проблем. През 2008г е установено, че 1 милиард души страдат от витамин D дефицит ( $25\text{OHD} < 20 \text{ ng/ml}$ ) [274]. Широкото разпространение на хиповитаминоза D в световен мащаб от своя страна е свързано със значими клинични проблеми. Витамин D има отношение към сърдечно-съдовата система, автоимунните и раковите заболявания, захарния диабет [275-278]. Надежден индикатор за нивото на витамин D в организма е  $25\text{OHD}$  [279]. Серумно ниво на  $25(\text{OH})\text{D} < 50 \text{ nmol/l}$  показва дефицит на витамин D в широк смисъл. Дефицит на витамин D се приема при праг  $< 25 \text{ nmol/l}$ , недостатъчност - при серумно ниво в границите  $25 - 49,99 \text{ nmol/l}$ , а достатъчност – над  $50 \text{ nmol/l}$  [280]. В България през 2012г е проведено мултицентрово проучване, целящо да установи честотата на дефицит на витамин D. Резултатите сочат 21,3% дефицит, 54,5% недостатъчност и едва 24,2% достатъчност на витамин D. 75,8% имат ниво под оптималната стойност от  $50 \text{ nmol/l}$ , което означава, че повечето хора в страната имат недостатъчност или дефицит на витамин D [281].

Витамин D<sub>2</sub> е ергокалциферол, който се извлича от растителни продукти. Витамин D<sub>3</sub> е секостероид, който основно се синтезира в кожата от 7-дехидрохолестерол под влияние на слънчевите лъчи – UVB –  $290 - 310 \text{ nm}$  [282]. Само малко количество (30%) се набавя с храната, тъй като не много храни го съдържат естествено. Витамин D<sub>3</sub> трябва да се хидроксилира двукратно, за да стане биологично активен – в черния дроб и в бъбрека. 25-хидроксилазата в черния дроб го превръща в  $25\text{OHD}$  [283]. След това той се свързва с витамин D свързващ протеин и така се транспортира в кръвообращението. В проксималните бъбречни тубули настъпва втора хидроксилация под влиянието на  $1\alpha$  – хидроксилаза и така

25ОНD се превръща в 1,25 дихидроксивитамин D3 - 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, който е активната форма на витамина. Витамин D действа върху таргетните си органи чрез своя рецептор – VDR, който е нуклеарен транскрипционен фактор [284].

Витамин D е в състояние да взаимодейства с епигенома на различни нива. Важни гени в системата за сигнализация на витамин D като тези, които кодират рецептора за витамин D и ензимите 25-хидроксилаза (CYP2R1), 1α-хидроксилаза (CYP27B1) и 24-хидроксилаза (CYP24A1), имат големи CpG острови в своите промоторни региони, които могат да бъдат потиснати чрез метилиране на ДНК. От друга страна, VDR взаимодейства с коактиваторни и корепресорни протеини, които от своя страна са в контакт с хроматинови модификатори, като хистонови ацетилтрансферази (HATs), HDACs, хистонови метилтрансферази (HMTs) и с ремоделатори на хроматина. Съществуват също доказателства, че някои VDR лиганди имат ДНК деметилиращи ефекти [285]. Ефектът на лиганд-свързания VDR зависи от епигенетичния фон на таргетния ген. VDR се свързва основно с локуси с достъпен хроматин. След прилагане на неговия лиганд витамин D достъпността до хроматина в тези локуси се увеличава с над 30% [286]. Механизмът на действие на свързания с лиганд VDR зависи от активността на HATs и HMTs. Провеждането на лечение върху клетъчни линии с витамин D и инхибитори на DNMT или хистонови деацетилази има синергичен ефект [287]. Има доказателства, че витамин D може да индуцира ДНК деметилиране, но механизмите не са ясни. В повечето случаи вероятно се касае за пасивно деметилиране, което протича в рамките на няколко цикъла на ДНК репликацията [285]. В някои случаи обаче деметилирането протича за 1-4ч, което е индикатор за активен процес [288]. Установено е, че системата на витамин D има плейотропни функции и регулира около 3% от човешкия геном [289].

Инсулиновата резистентност е пример за епигенетична дисрегулация – тя е състояние, при което нормални или повишени нива на инсулина са недостатъчни за нормален гликемичен отговор от страна на таргетните органи – черен дроб, скелетна мускулатура и мастна тъкан, и се наблюдава при пациенти с предиабет и захарен диабет тип 2. Известно е, че витамин D повлиява панкреасната β-клетъчна функция по различни начини. Активирането му настъпва в β-клетките от вътреклетъчната 1α-хидроксилаза. Антиапоптотичното му действие се медира чрез down-регулация на Fas-свързани метаболитни пътища (Fas/Fas-L) [290].

Витамин D повлиява основно инсулиновия отговор към глюкозна стимулация, но не и базалната инсулинемия [291]. Неговият директен ефект може би се осъществява от свързването на циркулиращата му активна форма  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  към VDR върху  $\beta$ -клетката. Витамин D води до увеличаване на инсулиновата секреция чрез модулиране на гени, кодиращи някои проинфламаторни цитокини, които участват в развитието на инсулинова резистентност [292]. От друга страна, секрецията на инсулин от  $\beta$ -клетките на панкреаса е калций-зависим процес и се повлиява от навлизането на калций през клетъчната мембрана [290]. Витамин D регулира калбиндин – цитозолен калций-свързващ протеин, който се намира и в  $\beta$ -клетките. Той играе ролята на модулатор на стимулираното от деполяризацията освобождаване на инсулин чрез регулиране на вътреклетъчния калций. По този начин витамин D може индиректно да повлияе инсулиновата секреция допълнително чрез регулиране на калбиндин. В инсулин-чувствителните тъкани като скелетни мускули и мастна тъкан калций е от особено важно значение за медираните от инсулин вътреклетъчни процеси. Вътреклетъчен калций в тесни граници е необходим за оптимално функциониране [290]. Спекулира се, че неадекватният прием на калций или недостатъчността на витамин D могат да променят баланса между извън- и вътреклетъчните му нива в  $\beta$ -клетките, което да повлияе нормалното освобождаване на инсулин особено в отговор на глюкозно натоварване. Индиректният ефект на витамин D се осъществява чрез регулиране на калциевото навлизане през клетъчната мембрана и вътреклетъчния калций чрез бързи отговори. Промени във вътреклетъчния калций в чувствителните на инсулин тъкани може да доведе до периферна инсулинова резистентност чрез нарушаване в пътищата на инсулиновата сигнализация, което да доведе до намалена активност на глюкозните транспортери. В норма витамин D намалява експресията на калциевите канали, а при дефицит се повишава броят им [293]. Витамин D увеличава инсулиновата чувствителност като стимулира експресията на инсулинови рецептори и/или чрез активиране на PPAR- $\delta$  [294, 295]. Дефицит на витамин D ще доведе до намаляване на инсулиновите рецептори и развитие на инсулинова резистентност [296]. Витамин D увеличава преживяемостта на  $\beta$ -клетките чрез инактивиране на NF- $\kappa\text{B}$ , който от своя страна също има участие в развитието и задълбочаването на инсулиновата резистентност [295]. Той също така може индиректно да повлияе инсулиновата чувствителност чрез РААС. Ангиотензин II инхибира инсулиновото действие в съдовете и в скелетните мускули което

води до нарушено усвояване на глюкоза. Витамин D потиска образуването на ренин и локалната панкреасна РААС. По този начин той се явява негативен ендокринен регулатор на РААС [297].

Сезонните вариации в гликемичния контрол при пациенти със захарен диабет тип 2, който се влошава през зимата, отчасти може да се обясни с флукуациите в нивото на витамин D, дължащи се на промяна в UV лъчението през годината [298]. Няколко крос-секционни проучвания са изучавали връзката между нивото на 25ОНD и честотата на ЗД тип 2 като повечето от тях съобщават за обратна корелация между двете [299]. Големи популационни проучвания като The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) откриват положителна връзка между нивото на 25ОНD и инсулиновата чувствителност. Понататъшни проучвания, използвайки резултатите от NHANES III потвърждават обратната асоциация между нивото на 25ОНD от една страна, и хипергликемията на гладно и инсулиновата резистентност, от друга [300]. Има относително малко проспективни проучвания за връзката на витамин D статуса и ЗД тип 2. В Women's Health Study при пациенти, които са приемали 511 IU на ден или повече по-рядко е установяван ЗД тип 2 в сравнение с тези, получаващи 159 IU на ден или по-малко [301]. В едно от най-големите проспективни проучвания - The Nurses' Health Study – жените, които са приемали най-висока доза витамин D, над 800 IU дневно, са имали 33% по-ниска честота от ЗД тип 2 в сравнение с тези, приемащи 200 IU или по-малко [302]. Възстановяването на нивата на витамин D в ранните етапи на експериментален витамин D дефицит, а също и при хора с дефицит, води до частично подобрене в глюкозния толеранс и промяна в инсулиновата секреция в отговор на глюкоза [303]. Някои проучвания показват, че суплементацията с витамин D подобрява стимулираната инсулинова секреция при ОГТТ при пациенти с лек ЗД тип 2, при здрави, а също и при хора с дефицит на витамин D, но не и при по-декомпенсирани форми на ЗД тип 2 [304]. Други автори съобщават, че нормализирането на нивото на витамин D подобрява глюкозния толеранс при хора, които са били с дефицит, и подобрява инсулиновия отговор при жени, които са със ЗД тип 2 [305]. Борисова и сътр. оценяват ефекта на витамин D върху инсулиновата секреция и периферната инсулинова чувствителност при пациенти със ЗД тип 2 като ги суплементират с 1332 IU витамин D дневно за един месец. Наблюдава се сигнификантно увеличаване в първата фаза на инсулиновата секреция, оценена чрез венозен глюкозо-толерантен тест (ВГТТ), с 34,3%.

Установява се и подобряване на инсулиновата резистентност с 21,4%, но промяната не е статистически значима [276]. Известно е, че честотата на ЗД тип 2 е по-висока при затлъстяване, което често се свързва с хиповитаминоза D. Витамин D се отлага в мастната тъкан, където е биологично неактивен, което вероятно обяснява отчасти, че голяма част от хората със затлъстяване са и с дефицит на витамин D [306]. От друга страна обаче метаанализ, включващ 15 проучвания върху ефекта на суплементацията с витамин D върху гликемията и инсулиновата резистентност, показва слаб ефект на приема на витамин D върху намаляването на кръвната захар на гладно и подобряването на инсулиновата чувствителност при пациенти със ЗД тип 2 и предиабет, и липса на ефект при здрави [307]. Друг метаанализ, включващ 23 проучвания, не показва промяна в HbA1c при добавяне на витамин D при хора с диабет, но при 4 от проучванията, при които пациентите са с лош гликемичен контрол ( $\text{HbA1c} \geq 8\%$ ), има сигнификантен ефект върху КЗГ [308].

Биоактивната форма на витамин D е в състояние да индуцира секреция на инсулин чрез директно свързване на VDR-RXR комплекс с VDRE (витамин D респондерни елементи), идентифицирани преди това в промотора на инсулиновия ген в панкреатичните  $\beta$ -клетки [309]. В съответствие с това откритие, мишките с липса на функционални VDR показват нарушена секреция на инсулин след стимулация с глюкоза. Забележително е, че VDRE може да стимулират не само транскрипцията на инсулиновия ген, но и много други гени, участващи в организацията на цитоскелета, клетъчния растеж, диференциацията и оцеляването на  $\beta$ -клетките на панкреаса [310]. Установено е, че мишки с мутация на VDR имат нарушена инсулинова секреция в сравнение със здрави [291]. Jayanarayanan et al. доказват, че суплементацията с витамин D увеличава нивата на инсулина чрез регулиране на промената експресия на рецепторите IP3 и AMPA в панкреасни острови на плъхове с индуциран със стрептозотоцин диабет. Добавянето на витамин D възстановява промяната в експресията на VDR, плътността на AMPA рецептора и експресията на IP3 и AMPA – рецепторите в панкреасните острови и така се възстановява калций-медираната инсулинова секреция [311]. Bornstedt et al. доказват, че метаболити на витамин D повлияват панкреасните  $\beta$ -клетки и глюкозо-стимулираната инсулинова секреция чрез промяна в експресията на гени, които участват във функционирането и жизнеспособността на  $\beta$ -клетките [312]. От друга страна е доказано, че витамин D регулира експресията на гена за инсулиновия рецептор [313].

Като цяло данните сочат, че суплементацията с витамин D предизвиква редукция на тегло при дефицит. Неоднозначни обаче са резултатите по отношение на показателите за въглехидратния и липидния метаболизъм. Seldeen et al. откриват, че по-малкото добавяне на холекалциферол както при слаби, така и при затлъстели мишки, значително и устойчиво намалява серумните концентрации на 25OHD. Интересното е, че затлъстяването забавя темповете на спад. По време на проучването недостатъчността на витамин D впоследствие не корелира с по-висок индекс на телесна маса (ИТМ), въпреки че слабите мишки с по-висока добавка консумират повече калории без видимо увеличение на ИТМ [314]. Mason et al. проследяват за 12 месеца постменопаузални жени, които са включени в проглама за редуциране на теглото, като част от тях приемат и витамин D. В края на проследяването се открива, че жените, които са били суплементирани и са нивото на витамин D е било достатъчно, са постигнали по-голямо отслабване и загуба на мазнини в сравнение с онези, които са били на плацебо [315]. Khosravi et al. доказват, че суплементацията с витамин D води до сигнификантна редукция на телесното тегло, но от друга страна не се достига значимост по отношение на общия холестерол, ТГ, LDL и КЗГ [316]. Друго проучване обаче показва, че суплементацията с витамин D води до намаляване в нивата на НОМА индекса, а също и на LDL холестерола [317]. Yang et al. съобщават за по-високи нива на холестерол, триглицериди и глюкоза при лица с дефицит на витамин D в сравнение с тези без дефицит [318]. Branco et al. са установили по-високи нива на ТГ при пациенти с хиповитаминоза D [319]. Major et al. проследяват жени с наднормено тегло или затлъстяване за 15 седмици, като част от тях суплементират с 400 IU дневно витамин D и калций, а останалите получават плацебо. В края на този период тези, които са получавали калций с витамин D, показват по-изразено намаляване в нивата на LDL [320].

### **1.10.2. Роля на кетогенната диета**

Честотата на провокираните от диетата метаболитни състояния непрекъснато се увеличава и това дава възможност на изследователите да проучат точните механизми, които водят до тези промени. Кетогенната диета представлява нисковъглехидратен, високомазнинен начин на хранене, който намира приложение при различни състояния. Установено е, че тя е подходяща за потискане на гърчовата активност при деца с рефрактерна епилепсия [321]. Евентуални терапевтични ползи от кетогенната диета са изучавани и в други неврологични

състояния като болест на Алцхаймер, амиотрофична латерална склероза, главоболие, болест на Паркинсон, а също и при някои видове рак, гликогенози, синдром на поликистозни яйчници, някои дихателни заболявания, свързани с нарушено доставяне на кислород [322, 323]. Ограничаването на въглехидратите, приемани с храната, има позитивни ефекти върху сърдечно-съдовите параметри, намалява затлъстяването и подобрява метаболитния синдром [324]. Доказано е, че кетодietetата води до намаляване на нивата на IGF-I, на глюкозата и подобрява инсулиновата чувствителност [325].

Кетозата е метаболитно състояние, което се характеризира с повишени нива на кетотелата – ацетацетат,  $\beta$ -хидроксипутират и ацетон. Физиологичната кетоза е нормално състояние при ниски нива на глюкоза в резултат от гладуване или нисковъглехиратни диети. По този начин се осигурява източник на енергия за мозъка под формата на кетони. Чрез ограничаване на въглехидратите, инсулиновата секреция се установява на по-ниски нива. Така складираните в мастната тъкан мазнини се подлагат на липолиза от хормон-чувствителната липаза. При физиологичната кетоза кетотелата са увеличени, но киселинно-основната хомеостаза не е нарушена, за разлика от кетоацидозата. При ниски нива на глюкоза в организма се наблюдава превключване от метаболизъм на въглехидрати към този на мастни киселини в черния дроб. След като се освободят, свободните мастни киселини претърпяват  $\beta$ -окисление в митохондриите на черния дроб и се образува ацетил-КоА. При метаболизирането на мастни киселини в ацетил-КоА част от последния се превръща в кетотела [326]. Намаленото освобождаване на инсулин води до метаболитно превключване към липидно окисление и усвояване на мастните киселини и кетотелата за енергия [126]. Хормоналното активиране на липолизата и кетогенезата се медира от адреналин и глюкагон, и се предотвратява от инсулин. С ограничаване приема на въглехидрати нивата на инсулин намаляват, а се увеличава глюкагонът [327]. Кетотелата имат и своя естествена физиологична роля в човешкия организъм. Напоследък съществуват данни, че в началните стадии на сърдечно заболяване сърдечните клетки превключват от използване на мастни киселини към глюкоза като източници на енергия и така оксидативният метаболизъм се намалява. Намаленият капацитет на сърцето да използва мастни киселини допринася в голяма степен за развитието на СН. Интересно е, че в този случай сърцето репрограмира своя метаболизъм и започва да използва кетотелата като основен източник на енергия [328]. Важно е да се отбележи обаче, че повишените нива на кетоните могат да доведат до

усложнения чрез нарушаване в баланса на редокс системите при пациенти с диабет и по този начин има риск от увеличаване на смъртността [329]. С оглед на възможна ацидоза при кетогенна диета, рискът се счита за несъществен при хора с нормално инсулиново действие, понеже нивата на кетотелата никога не надхвърлят 8 mmol/l в този случай [330].

Експресията на инсулина и съответно неговата способност да регулира нивата на плазмената глюкоза може да се променя в зависимост от съдържанието на макронутриенти в храната. Въпреки че някои проучвания при хора са доказали, че кетодиетата е ефективна за краткосрочна редуция на тегло, ефектът ѝ върху глюкозната хомеостаза остава противоречив [331]. От друга страна обаче диета, която е и бедна на въглехидрати, каквато е кетодиетата, често се прилага за контрол на симптомите на ЗД тип 2 при хора [332]. Към момента не е известно дали ефектът на тази диета върху глюкозната хомеостаза е резултат от редуцията на тегло или от рестрикцията на въглехидратите с храната. Kinzig et al. провеждат проучване, което доказва, че консумирането на нисковъглехидратна кетодиета от гризачи води до потискане нивата на инсулина и глюкозата, което се наблюдава и при прием на диета с нисък гликемичен индекс от хора [333]. Скорошни проучвания при мишки установяват, че кетодиетата подобряват инсулиновата чувствителност в целия организъм, редуцират инсулиновите нива на гладно въпреки увеличаването на чернодробната стеатоза [334]. Съществуват проучвания, които показват, че приемът на кетодиета води до нарушен глюкозен толеранс. Освен това, консумацията на високо въглехидратно хранене при плъхове, които преди това са били на кетодиета, води до значително по-високи нива на инсулин и глюкоза за продължителен период от време, в сравнение с контролите. Отговорът към инсулин е увеличен при плъхове на кетодиета. Връщането към обикновена диета бързо възстановява ефектите на кетодиетата върху инсулиновата чувствителност и глюкозния толеранс. Тези данни предполагат, че поддържането на кетодиета влияе отрицателно върху хомеостазата на глюкозата, ефект, който бързо се възстановява след прекратяване на диетата [333]. Yuan et al. установяват, че кетодиетата води до намаляване в нивата на КЗГ, триглицеридите и общия холестерол, а също и на телесното тегло [335]. Kennedy et al. провеждат опит, в който разделят мишки на четири групи – хранени с кетогенна диета, високомазнинна и с високо съдържание на сукроза, такива, подложени на калорийна рестрикция, и контролна група. Теглото на мишките, които са били на кетогенна диета и са приемали същото количество калории като тези в контролната група и тези които са били

на високомазнинна диета, са постигнали редукция на теглото – 85% от изходното, също както и контролите. Животните, които са били на високомазнинната диета и впоследствие са преминали на кетодиета, са успели да редуцират наддаденото тегло, а също се е подобрил и глюкозният им толеранс [334]. Друго проучване категорично показва, че мишки, хранени с кетогенна диета, драстично са редуцирали тегло въпреки че са приемали повече калории [336]. Goday et al. сравняват пациенти със ЗД тип 2, като едната група са били подложени на кетогенна диета, а другата – на нискокалориен режим. Резултатите показват статистически значимо намаляване на телесното тегло в групата на кетодиета, а също така и на нивото на HbA1c [337]. Dashti et al. проследяват пациенти с диабет със затлъстяване, които са били подложени на кетогенна диета. В края на периода се открива значимо намаляване в телесното тегло, кръвната захар, общия холестерол, LDL, ТГ, а нивото на HDL се е увеличило [338]. Друго проучване показва сходни резултати – след кетодиета се наблюдава намаляване на телесното тегло, кръвната захар, подобряване на инсулиновата чувствителност, редукция на холестерола и ТГ [325]. От друга страна обаче, Gumbiner et al. не установяват промяна в телесното тегло и нивата на инсулина на гладно и в хода на ОГТТ след кетогенна диета [339].

По отношение на епигенетичното регулиране е доказано, че кетотелата, в частност  $\beta$ -хидроксibuтиратът, намаляват активността на HDAC. Счита се, че  $\beta$ -хидроксibuтиратът е и директен епигенетичен регулатор като се свързва към хистоните и по този начин регулира генната експресия [340, 341]. Проучване установява, че кетогенната диета предизвиква промяна в експресията на гени, свързани с глюкозния и липидния метаболизъм. Четири седмици на кетодиета води до намаляване експресията на гени, участващи в глюкозния метаболизъм в сърцето и скелетните мускули. 12 седмици на този начин на хранене е предизвикало up-регулация на гени, които вземат участие в усвояването на мастни киселини от клетките и окислението им. Интересно е, че тези ефекти са се увеличавали при физическо натоварване [342]. Едно проучване изследва панкреасната експресия на гени, свързани с глюкозната хомеостаза след третиране на панкреатични клетки с кетонни тела, и установява намаляване на експресията на GLUT1 и лактат дехидрогеназа А, без данни за инсулиновата експресия [343]. В друго проучване се съобщава за редуциране на  $\alpha$ - и  $\beta$ -клетъчната маса в панкреаса след дългосрочна кетодиета, което би могло да има отношение към наблюдаваната редукция в инсулиновата експресия [344].

В светлината на данните от различни проучвания става ясно, че пациентите със ЗД тип 2 са с повишен сърдечно-съдов риск, развиват различни тежки микро – и макроваскуларни усложнения, а също така имат и промени в някои метаболитни показатели в сравнение със здравите хора. В тази връзка са установени различни маркери, които в голяма степен допринасят за увеличаването на тези рискове, а именно генетични, епигенетични, съдово-ендотелни. От друга страна, все по-често се коментира участието на някои диетични режими като кетогенната диета и на витамин D, които пък биха имали позитивно влияние върху глюкозната хомеостаза. Необходимо е да се идентифицират някои от генетичните, епигенетичните и съдово-ендотелните маркери, обуславящи високия риск от ССЗ при пациентите със ЗД, и да се проучи ролята на кетогенната диета и на витамин D върху глюкозната хомеостаза и върху някои от показателите на метаболитния синдром.

## **ГЛАВА ВТОРА**

### **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

ЗД е хронично метаболитно заболяване, което се характеризира с хипергликемия, като това е резултат от нарушение на инсулиновата секреция, на инсулиновото действие или на двете заедно. Неговото разпространение в световен мащаб се увеличава непрекъснато. От друга страна то е и социално-значимо заболяване. Установена е силна връзка между ЗД и ССЗ. ССЗ са водеща причина за морбидност и смъртност сред диабетната популация. Те настъпват 10-15 години по-рано при пациенти със ЗД. Установено е, че около 2/3 от хората със ЗД тип 2 ще починат от някаква форма на ССЗ. Смъртността от ССЗ при хората с диабет е 2 до 4 пъти по-висока в сравнение с хората без ЗД. Относителният риск за съдов инцидент при пациенти със ЗД е по-висок в сравнение със здравата популация. Съществуват различни фактори, които допринасят за увеличаването на този риск, като част от тях са генетични, епигенетични, съдово-ендотелни и др. От друга страна има данни, че честотата на провокираните от диетата метаболитни състояния непрекъснато се увеличава и това дава възможност на изследователите да проучат точните механизми, които водят до тези промени. Кетогенната диета има доказани терапевтични ползи при редица заболявания, също така е установено, че играе важна роля в глюкозната хомеостаза. Витамин D притежава и много роли в клетъчната диференциация, инхибиране на клетъчния растеж и имуномодулацията. Той участва в някои епигенетични механизми, което представлява допълнителен начин за модулиране на генната експресия. Известно е, че дефицитът на витамин D води до промяна в инсулиновите синтез и секреция. Той може да предразположи към нарушение в глюкозния толеранс, нарушена инсулинова секреция и ЗД тип 2.

#### **2.1. Цел на проучването**

Целта на настоящото проучване е да се идентифицират някои от генетичните, епигенетичните и съдово-ендотелните маркери, обуславящи високия риск от ССЗ при пациенти със ЗД, и да се проучи ролята на кетогенната диета и на витамин D върху глюкозната хомеостаза, и върху някои от показателите на метаболитния синдром.

## **2.2. Задачи на проучването**

1. Да се проучи честотата на генетичните варианти, свързани със сърдечно-съдовия риск при пациенти със ЗД тип 2
2. Да се анализира нивото на някои miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2
3. Да се анализира експресията на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2
4. Да се проучи ефектът на кетодиетата върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром
5. Да се проучи ефектът на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром

## ГЛАВА ТРЕТА

### МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 3.1. Изследване на генетични варианти, свързани със сърдечно-съдов риск при пациенти със ЗД тип 2

Бяха събрани общо 36 проби от периферна венозна кръв – от 19 мъже и 17 жени, средна възраст  $49,4 \pm 9,8$  (от 30 до 77 години). Те бяха разделени в две групи в зависимост от наличието на ССЗ: 20 пациенти със ЗД тип 2 и ССЗ и 16 пациенти със ЗД тип 2 без ССЗ (контроли). Основните характеристики са представени в таблица 1.

Таблица 1. Основни характеристики на участниците в подгрупите

Параметри	ЗД тип 2 и ССЗ	ЗД тип 2 без ССЗ
брой	20	16
възраст (години)	$56,3 \pm 10,8$	$42,5 \pm 10,8$
ИТМ ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$34,8 \pm 8,4$	$38,1 \pm 13,7$
НbA1c (%)	$8,8 \pm 1,8$	$7,9 \pm 2,3$

Всички участници подписаха информирано съгласие и бяха запознати с целите, условията и рисковете от участието в проучването в съответствие с Декларацията от Хелзинки и правилата за Добра клинична практика, като проучването е одобрено от Комитета по етика на Медицинския университет - София. Всички участници бяха интервюирани за тяхната възраст, наличието на ЗД (диагнозата поставена съгласно определението на СЗО) и неговата продължителност, ССЗ (АХ, КАБ, инсулт). Бяха измерени антропометричните параметри – ръст (cm) и тегло (kg), и изчислен ИТМ по формулата  $\text{kg}/\text{m}^2$ . При всички участници беше изследвано на гладно: НbA1c (NGSP сертифициран) в цели кръвни проби чрез имунотурбидиметричен метод (Roche Diagnostics). Статистическият анализ на данните се извърши чрез SPSS v.20.0 (SPSS, Chicago, USA). Данните са изразени като средна стойност  $\pm$  стандартно отклонение (SD). Student's T-тест и еднопосочен дисперсионен анализ са

използвани за сравнение на непрекъснати променливи, и хи квадрат тест на Пиърсън за пропорционални сравнения. Р-стойност по-малка от 0.05 се счита за статистически значима.

Нашите данни не показват статистически значима разлика в разпределението на пола, средната възраст, ИТМ, HbA1c сред подгрупите, така че тези променливи не могат да повлияят резултатите от ДНК анализа.

Използван беше кит CVD StripAssay от Vienna Lab за идентифициране на мутации, свързани със ССЗ на базата на полимеразна верижна реакция (PCR) и обратна хибридизация. Анализът обхваща 12 мутации: *FV G1691A (Leiden)*, *FV H1299R (R2)*, *Prothrombin G20210A*, *Factor XIII V34L*,  *$\beta$ -Fibrinogen -455 G-A*, *PAI-1 4G/5G*, *GPIIIa L33P (HPA-1)*, *MTHFR C677T*, *MTHFR A1298C*, *ACE I/D*, *Apo B R3500Q*, *Apo E2/E3/E4*.

## CVD StripAssay<sup>®</sup>

REF 4-240



IVD

 20 Tests

 2-8°C

CE

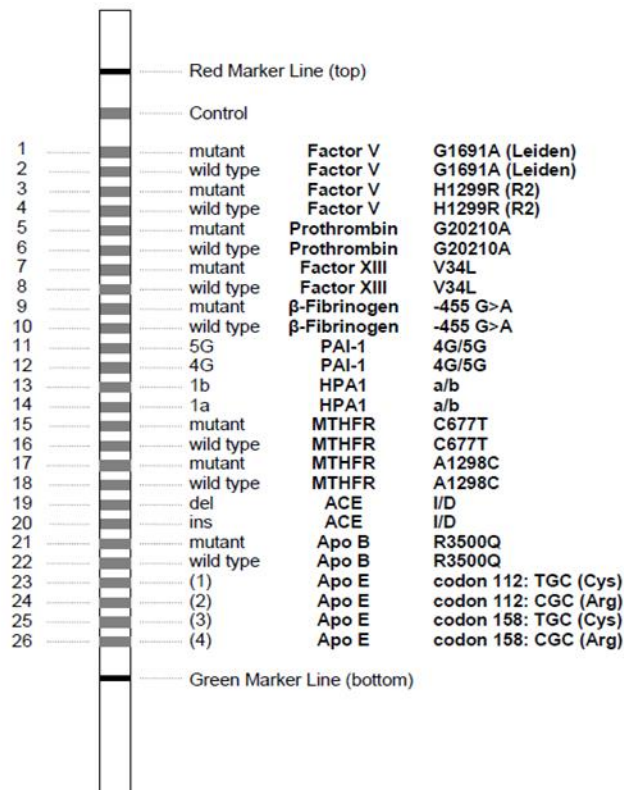
---

1.	Lysis Solution	50 ml	
2.	GEN <sup>X</sup> TRACT Resin	5 ml	
	<i>Resuspend each time <u>immediately</u> before removing an aliquot.</i>		
3a.	Amplification Mix A (yellow cap)	500 $\mu$ l	
3b.	Amplification Mix B (green cap)	500 $\mu$ l	
4.	Taq Dilution Buffer (transparent cap)	500 $\mu$ l	
5.	DNAT (blue cap)	1.5 ml	 R 36/38
6.	Typing Trays	3	
7.	Teststrips	20	
8.	Hybridization Buffer (white cap)	25 ml	
9.	Wash Solution A (white cap)	80 ml	
10.	Conjugate Solution	25 ml	
11.	Wash Solution B	80 ml	
12.	Color Developer	25 ml	

---

Фигура 1. Предоставени консумативи в CVD StripAssay кит от Vienna Lab

Процедурата включва три етапа: 1. Изолиране на ДНК; 2. PCR амплификация с помощта на биотинилирани праймери; 3. Хибридизация на амплификационни продукти върху тест лента, съдържаща специфични за алела олигонуклеотидни сонди, обездвижени като масив от паралелни линии (фигура 2). Свързани биотинилирани последователности се откриват с помощта на стрептавидин-алкална фосфатаза и цветни субстрати.



Фигура 2. Тест лента за отчитане на алел-специфичната хибридизация

*In vitro* амплификация (PCR; 2 отделни реакции на проба)

Всички стъпки до стартиране на програмата за термичните цикли се извършват върху лед (0-4 ° C).

1. Приготвя се прясно работно разреждане (0,2 U /  $\mu$ l) на Таq ДНК полимераза в буфер за разреждане на Таq (прозрачна капачка).
2. Подготвят се две реакционни епруветки за всяка проба, която ще бъде амплифицирана. Епруветките се поставят върху лед.

3. За всяка проба се приготвят 2 окончателни PCR реакционни смеси (А и В) върху лед (таблица 2).

Таблица 2. Съдържание на реакционни смеси А и В

15 µl Амплификационен микс А (жълта капачка)	15 µl Амплификационен микс В (зелена капачка)
5 µl разредена Taq ДНК полимераза (1U)	5 µl разредена Taq ДНК полимераза (1U)
5 µl ДНК темплейт	5 µl ДНК темплейт

4. Затварят се плътно епруветките. Загрива се термоциклерът до 94 °С.
5. Поставят се реакционните епруветки и изпълнява следната програма за термоциклиране (таблица 3):

Таблица 3. Програма за PCR

Стъпка	Времетраене	Температура	Коментар
Начална стъпка на активиране (Pre-PCR)	2 минути	94 °С	Активира Taq Polymerase
3-стъпков цикъл			
Денатурация	15 сек.	94 °С	
Анйилинг	30 сек.	58 °С	
Екстензия	30 сек.	72 °С	
Брой на циклите – 35			
Крайно удължаване	3 минути	72 °С	

Амплификационните продукти се съхраняват на лед или при 2-8 ° C за по-нататъшна употреба.

#### *Проверка с електрофореза*

Анализирант се продуктите на амплификация чрез гел електрофореза (2,8% агарозен гел).

Дължини на фрагментите:

134, 156, 173, 202, 223, 254, 297, 324 bp (амплификационен продукт А)

225, 248, 283, 346 bp (амплификационен продукт В)

1. Приготвя се агарозен гел с концентрация 2,8 % като в 100 ml 1x TAE Буфер се миксира приблизително 2,8 g агароза.
2. Постава се в микровълнова за 1-3 минути на максимална температура и когато започне да се забелязва кипене се изважда и разклаца. Проверява се дали агарозата е започнала да се разтапя.
3. Температурата се намалява на минимум за още 1-3 минути. Отново се вади и разклаца. Температурата се увеличава на максимум като се внимава да не изкипи.
4. Когато агарозата е напълно разтворена се изважда и се добавят 10 µl етидиев бромид. Разклаца се внимателно за пълно смесване и гелът се отлива във ваничката с гребен, за да стегне.
5. Към амплификационните продукти се добавя Loading буфер в съотношение 3 µl PCR продукт към 3 µl буфер, и се хомогенизира с пипета.
6. Стегнатият гел се поставя в електрофорезата и се изливат 350 – 400 ml 1xTAE буфер до пълно покриване на гела.
7. Подготвените проби се отпипетират в кладенчетата на гела.
8. Гелът се пуска на приблизително 135 V за 35-40 минути и се снима на UV лампа.

*Хибридизация (45 ° C; водна баня с клатачна система)*

Начало на хибридизацията

1. Загрява се водната баня до точно  $45^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). Предварително се затопля Хибридизационен буфер и Wash разтвор от А до  $45^{\circ}\text{C}$ , за да се разтворят всички утайки.
2. Загрява се и клатачната платформа до  $45^{\circ}\text{C}$ .
3. Тест лентите, DNAT, Conjugate Solution, Wash разтвор В и Color Developer да достигнат стайна температура. Подготвя се Typing Tray(s).
4. Взима се по една тест лента за всяка проба, като се използват чисти пинсети. Надписват се извън маркерните линии с молив.
5. 20  $\mu\text{l}$  DNAT (синя капачка) се поставя в долния ъгъл на улея на съответната проба в тавата за въвеждане (по една лента на проба).
6. Добавя се 8,5  $\mu\text{l}$  амплификационен продукт А в съответната капка DNAT. Добавя се 8,5  $\mu\text{l}$  амплификационен продукт В в същата капка. Миксира се старателно с пипета. (Разтворът ще остане син.)
7. Остава се да престои 5 минути при стайна температура.
8. Добавя се 1 ml Хибридизиращ буфер (предварително затоплен до  $45^{\circ}\text{C}$ ) във всяка лента. Внимателно се разклаща тавата. (Синият цвят ще изчезне.)
9. Поставят се тест лентите с маркираната страна нагоре (видими линии!) в съответните ленти. Потопят се напълно.
10. Инкубиране за 30 минути при  $45^{\circ}\text{C}$  на клатачната платформа. Задава се умерена честота на разклащане (приблизително 50 об / мин), за да се избегне разливане. Капака на платформата се държи затворен, за да се избегнат промени в температурата.
11. В края на инкубацията се отстраняват хибридизационните разтвори чрез пипета от 1ml.

Продължава се незабавно, за да не се позволи на тест лентите да изсъхнат по време на цялата процедура.

Пълно измиване ( $45^{\circ}\text{C}$  с клатачка)

1. Добавя се 1 ml Wash разтвор А (Wash Solution А) (предварително загрят до  $45^{\circ}\text{C}$ ). Промива се на клатачната платформа за кратко (10 сек.). Отстраняват се течностите чрез вакуум аспирация.

2. Добавя се 1 ml Wash разтвор А (45° С).
3. Инкубира се за 18 минути. при 45° С на клатачна платформа. Отстраняват се течностите чрез вакуум аспирация.
4. Добавя се 1 ml Wash разтвор А (45° С).
5. Инкубира се за 18 минути. при 45° С на клатачна платформа. Отстраняват се течностите чрез вакуум аспирация.
6. На 15. минута се отваря капакът и се сваля температурата на клатачната платформа.

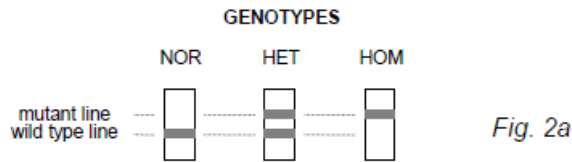
#### Проявяване на цвета (стайна температура)

1. Добавя се 1 ml Съединяващ разтвор (Conjugate solution).
2. Инкубира се за 15 минути при стайна температура на клатачната платформа. Течностите се отстраняват чрез вакуум аспирация.
3. Добавя се 1 ml Wash разтвор В. Промива се на клатачната платформа за кратко (10 сек). Течностите се отстраняват чрез вакуум аспирация.
4. Добавя се 1 ml Wash разтвор В. Инкубира се за 6 минути при стайна температура на клатачната платформа. Течностите се отстраняват чрез вакуум аспирация.
5. Добавя се 1 ml Color Developer. Инкубира се за 2-6 минути при стайна температура в тъмното на клатачната платформа. Лилаво оцветяване ще се появи при положителна реакция.
6. Тест лентите се измиват 1-2 пъти с дестилирана вода. Оставят се да изсъхнат на тъмно върху абсорбираща хартия. Не се излагат на интензивна светлина след проявяването на цветовете.

#### Тълкуване на резултатите

Генотипът на пробата се определя с помощта на приложения Collector™ лист. Поставя се обработеният Teststrip в едно от определените полета, подравнява се към схематичния чертеж с помощта на червената маркерна линия (отгоре) и зелената маркерна линия (отдолу) и се фиксира с лепило. Положителна реакция на най-горната контролна линия показва правилната функция на Conjugate Solution и Color Developer. Тази линия винаги трябва да се оцветява положително. За всяка полиморфна позиция трябва да се получи един от

следните модели на оцветяване, като интензитетът на оцветяване на положителните линии може да варира (фигура 3). Това няма никакво значение за резултата.

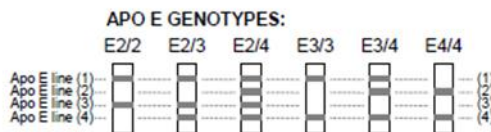


	wild type line	mutant line	genotype
NOR	positive	negative	normal
HET	positive	positive	heterozygous
HOM	negative	positive	homozygous mutant

Фигура 3. Модели на оцветяване на тест лента

За трите Apo E изоформи E2, E3 и E4 се получават следните модели на оцветяване (фигура 4):

E2 (112: Cys, 158: Cys)      lines (1) + (3)  
 E3 (112: Cys, 158: Arg)      lines (1) + (4)  
 E4 (112: Arg, 158: Arg)      lines (2) + (4)



Фигура 4. Модели на оцветяване на тест лента за Apo E

Шестте възможни хомозиготни и хетерозиготни apo E генотипа (E2/2, E3/3, E4/4, E2/3, E2/4, E3/4) ще доведат до комбинация от съответните отделни изоформи.

След определянето на алелните честоти за всеки от изследваните генетични варианти те бяха сравнени с популационните честоти, съобщени в общодостъпните геномни база данни - The Genome Aggregation Database (gnomAD), 1000 Genomes Project phase 3 database, Ensembl Genome Browser.

### 3.2. Анализ на нивото на някои miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2

Бяха събрани кръвни проби от 15 пациенти със ЗД тип 2 (диагнозата поставена спрямо критериите на СЗО), разделени в следните групи – 6 със ЗД без ССЗ и 9 със ЗД и ССЗ. Всички пациенти декларираха своето писмено информирано съгласие и бяха подробно запознати с целите, методите и рисковете от участието в проучването в съответствие с Хелзинкската декларация и правилата за Добра клинична практика. Изследването е одобрено от Комитета по етика на Медицински университет - София. Основните характеристики на пациентите са представени в таблица 4.

Таблица 4. Основни характеристики на участниците в подгрупите

Параметри	ЗД тип 2 без ССЗ	ЗД тип 2 и ССЗ
Брой	6	9
Пол (мъже/жени)	3/3	5/4
Възраст (години)	52.8±4.2	55.7±7.7
ИТМ (kg/m <sup>2</sup> )	34.6±3.4	34.0±2.7
НbA1c (%)	8.8±1.8	8.7±2.1

Пациентите са интервюирани за наличие и продължителност на ЗД тип 2, наличие на ССЗ (АХ, КАБ, инсулт). Бяха измерени антропометричните параметри – ръст (cm) и тегло (kg), и изчислен ИТМ по формулата kg/m<sup>2</sup>. При всички участници беше изследвано на гладно: НbA1c (NGSP сертифициран) в цели кръвни проби чрез имунотурбидиметричен метод (Roche Diagnostics).

Изолира се РНК от плазма като се използва кит за *екстракция на РНК* miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) и се следва протоколът:

1. Приготвя се плазмата
2. Прехвърля се 200 µl от плазмата в 2 ml тръбичка
3. Добавя се 60 µl Buffer RPL. Затваря се капачката и се вортексира за над 5 секунди.  
Оставя се на стайна температура (15–25°C) за 3 минути

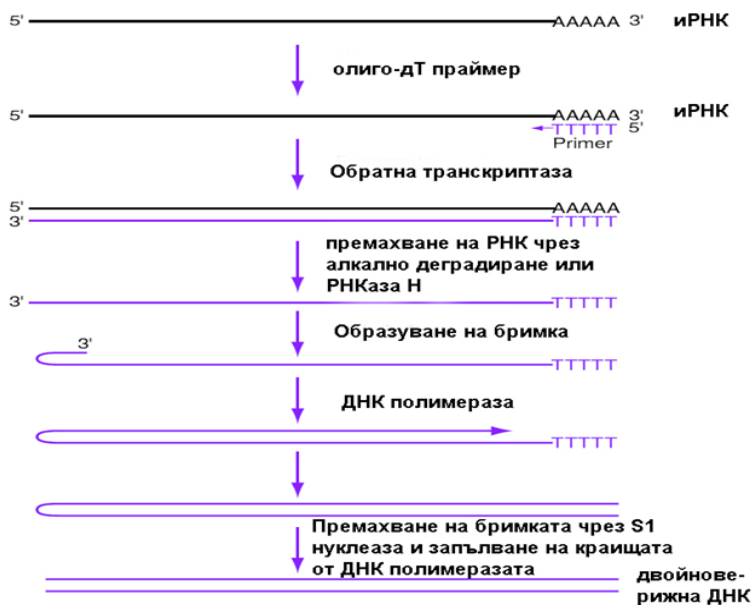
4. Добавя се 20  $\mu$ l Buffer RPP. Затваря се капачката и се смесва интензивно чрез вортексиране за над 20 секунди. Инкубира се на стайна температура за 3 минути
5. Центрофугира се на 12 000 оборота за за 3 минути на стайна температура
6. Трансферира се супернатантът (около 230  $\mu$ l за 200  $\mu$ l плазма) в нова тръбичка. Добавя се 1 обем изопропанол. Смесва се добре чрез вортексиране.
7. Прехвърля се цялата проба в колонка RNeasy UCP MinElute. Затваря се капакът и се центрофугира за 15 секунди на  $\geq 8\ 000$  оборота. Утайката се отстранява.
8. Пипетира се 700  $\mu$ l Buffer RWT в колонката RNeasy UCP MinElute. Затваря се капакът и се центрофугира за 15 секунди на  $\geq 8\ 000$  оборота. Утайката се отстранява.
9. Пипетира се 500  $\mu$ l Buffer RPE в колонката RNeasy UCP MinElute. Затваря се капакът и се центрофугира за 15 секунди на  $\geq 8\ 000$  оборота. Утайката се отстранява.
10. Добавя се 500  $\mu$ l 80% етанол към колонката RNeasy UCP MinElute. Внимателно се затваря капакът се центрофугира за 2 минути на  $\geq 8\ 000$  оборота за да се измие мембраната на колонката. Утайката се отстранява. След центрофугирането внимателно се отстранява колонката от събирателната тръбичка , за да няма колонката контакт с утайката. В противен случай ще има пренос на етанол.
11. Колонката се поставя в нова 2 ml събирателна тръбичка. Отваря се капачето на колонката и се центрофугира на максимална скорост за 5 секунди, за да се изсуши мембраната. Изхвърлят се утайката и събирателната тръбичка.
12. Поставя се колонката в нова 1.5 ml събирателна тръбичка. Добавя се 20  $\mu$ l RNase-free water директно в центъра на мембраната на колонката и се инкубира за 1 минута. Затваря се капакът и се центрофугира за 1 минута на максимална скорост, за да се елуира РНК.

За измерване концентрацията и качеството на изолираната тотална РНК беше използван NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Масачузетс, САЩ). Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната  $\lambda=260\text{nm}$  от пуриновите и пиримидиновите бази на ДНК и РНК. Абсорбцията при  $\lambda= 280\text{nm}$  дава концентрацията на белтъците. Отношението на абсорбциите, измерени съответно при  $\lambda 260$  и  $\lambda 280$ , показва чистотата на ДНК/РНК. Чистите ДНК проби дават A260/280 съотношение приблизително 1.8 като стойности под 1.6 показват наличието на примеси от белтъци, а над 2 - примеси от РНК. Чистите РНК проби дават A260/280 съотношение от около 2 като в този случай

стойности под 1.8 показват примеси от белтъци. Върху съотношението A260/280 влияние оказва и киселинността на пробите. Съотношението A260/A230 дава представа за съдържанието на други контаминиращи вещества, които абсорбират при  $\lambda 230$  или  $\lambda 260$ . 79 Чистите проби имат съотношение на A260/A230 в обхвата 2-2.2.

*Обратна транскрипция* – по същество представлява процес, при който се синтезира комплементарна ДНК от РНК като матрица. Осъществява се от ензима РНК-зависима ДНК-полимераза (обратна транскриптаза). Този ензим има две активности - ДНК полимеразна – добавя нуклеотиди, и - РНКазна Н активност – отговорна е за разграждането на РНК матрицата след обратната транскрипция в хетеродуплекса ДНК-РНК.

Механизъм на обратната транскрипция - Първо се използва oligo-dT праймер, закачащ се за polyA, и се синтезира комплементарен праймер от 5'-3' края. Синтезира се хетеродуплекс ДНК-РНК. Обратната транскриптаза разгражда РНК от дуплекса. Едноверижните нуклеинови киселини имат склонност да образуват третични структури поради хидрофобността на базите. 3' краят се огъва и може да послужи като праймер за синтеза на комплементарна верига. Получава се двуверижна ДНК, която в единия края е съединена. Тази структура се разпознава от S1 нуклеаза и се запълват краищата на веригата – фигура 5.



Фигура 5. Механизъм на обратната транскрипция.

50 ng от общата РНК от всяка проба се употреби, за да се получи комплементарна ДНК (кДНК), като се използва QuantiTect Reverse Transcription Kit, следвайки протокола:

1. РНК се поставя на лед. Съдържанието на кита - gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix, and RNase-free water, се размразяват на стайна температура. Центрофугира се за кратко, за да се събере останалата течност от стените на съда, и се оставя на лед.
2. Приготвяне за елиминационната реакция на геномната ДНК – на лед (таблица 5).

Таблица 5. Елиминационна реакция на геномната ДНК

Компонент	Обем/реакция	Финална концентрация
gDNA Wipeout buffer, 7x	2 µl	1x
Матрична РНК	Варира (до 1 µg)	
RNase-free water	Варира	
Тотален обем	14 µl	

3. Инкубиране за 2 минути на 42°C. След това веднага се поставя на лед.
4. Приготвяне на master mix за обратната транскрипция – таблица 6

Таблица 6. Компоненти на реакцията обратна транскрипция

Компонент	Обем/реакция	Финална концентрация
QuantiScript Reverse Transcriptase	1 µl	

QuantiScript RT buffer, 5x	4 $\mu$ l	1x
RT primer mix	1 $\mu$ l	
Общ обем	20 $\mu$ l	

5. Добавя се РНК от стъпка 3 (14  $\mu$ l) към master mix и се поставя на лед.
6. Инкубира се за 15 минути на 42°C.
7. Инкубиране за 3 минути на 95°C, за да се инактивира Quantiscript Reverse Transcriptase
8. Добавя секратно количество на всяка завършена реакция на обратна транскрипция към real-time PCR mix. Реакциите на обратна транскрипция се съхранява на –20°C до извършване на real-time PCR

*Real time PCR* – чрез този метод се наблюдава амплифицирането на таргетната ДНК молекула по време на PCR в реално време, а не в края на процеса, както при конвенционалната PCR. Багрилото SYBR Green позволява проследяване хода на PCR реакциите. Молекулите на багрилото интеркалират с ДНК – когато се закачат за малката бразда на двойно верижните спирали те започват да флуоресцират. Точното определяне на количеството на изследваната секвенция става с помощта на стандартна крива, за построяването на която се използват серийни разредки на проба, съдържаща предварително известни количества от същата последователност. В хода на PCR реакцията се отчита флуоресценцията на всяка от разреdkите и се построява графика на зависимостта на светенето от концентрацията им. Така построената графика се използва за да се определи на каква концентрация съответства измерената в неизвестната проба флуоресценция.

Експресията на miRNA се оцени като се използва miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen) с 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). Използваха се miRNA праймери за шест miRNA: miRNA-16, miRNA-155-3p, miRNA-155-5p, miRNA-210-3p, miRNA-221-3p и miRNA-424-5p. Реакциите бяха изпълнени спрямо протокола:

1. Размразяват се 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, кДНК, праймерите и RNase-free water
2. Приготвя се реакционната смес – таблица 7:

Таблица 7. Приготвяне на реакционната смес

<b>Компонент</b>	<b>Обем/реакция</b>	<b>Финална концентрация</b>
2xQuantiTect SYBR Green PCR Master mix	25 $\mu$ l (12,5 $\mu$ l)	1x
10xQuantiTect Primer Assay	5 $\mu$ l (2.5 $\mu$ l)	
RNase-free water	Варира	
кДНК (добавя се при стъпка 4)	Варира (4 $\mu$ l)	<100 ng/реакция
Тотален обем	50 $\mu$ l	

3. Смесване на реакционната смес и се разпределя в ямките на плаката
4. Добавят се кДНК в ямките на плаката
5. Програмира се real-time cycler – таблица 8:

Таблица 8. Условия за провеждане на Real Time PCR

<b>Стъпка</b>	<b>Времетраене</b>	<b>Температура</b>	<b>Коментар</b>
Начална стъпка на активиране	15 мин.	95 °C	Активира HotStar DNA Polymerase

3-стъпков цикъл			
Денатурация	15 сек.	94 °C	
Анйилинг	30 сек.	55 °C	
Екстензия	30 сек.	72 °C	Събира флуоресцентните данни
Брой на циклите – 35-40			

6. Плаката се поставя в real-time cycler и се стартира програмата

RQ (relative quantification) на плазмените нива на miRNA на таргетната група се анализира чрез  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  метода.  $RQ \geq 2$  се определи като свръхекспресия,  $RQ < 0,5$  като намалена експресия, а RQ между 1,99 и 0,5 – без промяна в експресията.

Методът  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (относителен анализ) дава информация за разликата в нивата на експресия между две проби и се изчислява чрез следните уравнения:

$$\Delta Ct \text{ проба} = Ct \text{ прицелен ген} - Ct \text{ ендогенна контрола}$$

$$\Delta Ct \text{ контрола} = Ct \text{ прицелен ген} - Ct \text{ ендогенна контрола}$$

$$\Delta Ct \text{ проба} - \Delta Ct \text{ контрола} = \Delta\Delta Ct$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Референтна проба – пасивен или активен сигнал се използва за нормализиране на експерименталните резултати. Пример за активни референтни проби са ендогенните и екзогенните контроли. При активните ендогенни проби сигналът се генерира като резултат от PCR амплификацията. Тя има свой собствен набор от праймери и сонда. Ендогенна контрола – РНК или ДНК, която се съдържа във всяка експериментална проба. Чрез използване на ендогенни контроли като активни референтни проби може да се нормализира количествената оценка на иРНК за разлики в тоталната РНК, добавена към реакцията.

За статистически анализ се използва SPSS software, версия 168 23.0 за Windows (IBMSPSS, NY, USA). Стойност на  $p < 0.05$  се прие за статистически значима.

### 3.3. Анализ на експресията на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2

Бяха събрани кръвни проби от здрави контроли (с нормален глюкозен толеранс,  $n = 12$ ) и пациенти със ЗД тип 2 ( $n = 27$ ). Диагнозата ЗД е поставена съгласно критериите на СЗО. Пациентите бяха подразделени според продължителността на диабета: с новодиагностициран ЗД тип 2 ( $n = 9$ ); ЗД тип 2 с продължителност  $\leq 5$  години, но не и новодиагностициран ( $n = 9$ ); и ЗД тип 2 с продължителност над 5 години ( $n = 9$ ). Всички пациенти са декларирали своето писмено информирано съгласие и са били запознати с целите, методите и рисковете от участието в проучването в съответствие с Хелзинкската декларация и правилата за Добра клинична практика, като изследването е одобрено от Комитета по етика на Медицински университет - София. Основните характеристики на пациентите са представени в таблица 9.

Таблица 9. Основни характеристики на участниците в подгрупите

Параметри	Новодиагностициран ЗД тип 2	ЗД тип 2 с давност $\leq 5$ години	ЗД тип 2 с давност над 5 години
Брой	9	9	9
Пол (мъже/жени)	6/3	5/4	5/4
Възраст (години)	62.0 $\pm$ 7.5	51.3 $\pm$ 14.0	55.7 $\pm$ 7.7
ИТМ (kg/m <sup>2</sup> )	34.8 $\pm$ 8.4	38.1 $\pm$ 13.7	34.0 $\pm$ 2.7
НbA1c (%)	7.9 $\pm$ 2.3	8.8 $\pm$ 1.8	8.7 $\pm$ 2.1
Давност (години)	0	2.2 $\pm$ 0.8	6.8 $\pm$ 1.9
АХ (%)	6/9 (66.9)	8/9 (88.9)	8/9 (88.9)

Пациентите са интервюирани за наличие и продължителност на ЗД тип 2, наличие на АХ и други хронични заболявания и усложнения на заболяването, включително и ДПНП. От всички пациенти със ЗД тип 2 17 са с ДПНП, а 10 нямат това усложнение. Изчислен е ИТМ

по формулата  $\text{kg/m}^2$ . Артериалното кръвно налягане е измервано в стандартни условия. При всички участници беше измерен на гладно HbA1c (NGSP сертифициран метод) в цели кръвни проби чрез имунотурбидиметричен метод (Roche Diagnostics).

Кръвните проби от пациентите ( $n = 27$ ) и контролите ( $n = 12$ ) бяха използвани за пречистване на обща РНК за експресионен анализ на гените *VEGFR1* и *VEGFR 2* в клетки от периферна кръв. РНК е изолирана чрез QIAamp RNA Blood Kit (Qiagen), следвайки протокола:

1. Смесват се 1 обем цяла кръв с 5 обема Buffer EL.
2. Сместа се инкубира за 10-15 мин на лед. Двукратно по време на инкубацията се размесва чрез вортексиране.
3. Центрофугира се на 400 оборота за 10 минути на  $4^{\circ}\text{C}$  и супернатантът се отделя.
4. Добавят се 2 обема Buffer EL към 1 обем цяла кръв и се вортексират.
5. Центрофугира се на 400 оборота за 10 минути на  $4^{\circ}\text{C}$  и супернатантът се отделя.
6. Добавя се Buffer RLT в количество 350  $\mu\text{l}$  при до 0,5 ml кръв или 600  $\mu\text{l}$  при кръв 0,5-1,5 ml и се размесва.
7. Лизатът се пипетира директно в колонка в 2 ml събирателна тръбичка и се центрофугира за 2 минути на максимална скорост, за да се хомогенизира. Маха се колонката и се запазва хомогенизираният лизат.
8. Добавя се 1 обем 70% етанол към хомогенизирания лизат и се размесва чрез пипетиране. Не се центрофугира.
9. Внимателно се пипетира пробата, включително и преципитатите, ако има такива, в нова колонка в 2 ml събирателна тръбичка. Центрофугира се за 15 секунди на  $\geq 8000$  оборота.
10. Колонката се прехвърля в нова 2 ml събирателна тръбичка. Добавя се 700  $\mu\text{l}$  Buffer RW1 към колонката и се центрофугира за 15 секунди на  $\geq 8000$  оборота.
11. Колонката се прехвърля в нова 2 ml събирателна тръбичка. Пипетира се 500  $\mu\text{l}$  Buffer RPE в колонката и се центрофугира за 15 секунди на  $\geq 8000$  оборота.
12. Внимателно се отваря колонката и се добавя 500  $\mu\text{l}$  Buffer RPE. Центрофугира се на максимална скорост за 3 минути.
13. Колонката се прехвърля в нова 2 ml събирателна тръбичка като старата се изхвърля заедно с филтратата. Центрофугира се на максимална скорост за 1 минута.

14. Колонката се прехвърля в 1,5 ml тръбичка и се пипетира 30–50  $\mu$ l of RNase-free water директно върху мембраната. Центрофугира се за 1 минута на  $\geq 8000$  оборота.

За измерване концентрацията и качеството на изолираната тотална РНК беше използван NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Масачузетс, САЩ). Количество от 500 ng от всяка РНК проба е подложено на обратна транскрипция до кДНК като се използва QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). Използваха се праймери RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Human *VEGFR1* и *VEGFR2* (Qiagen). Real time PCR се извърши като се използва miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen). Общият обем на всяка реакция е 50  $\mu$ l с по-малко от 100 ng кДНК за една реакция. Условието на амплификация на всеки real time PCR цикъл бяха както следва: реакция на денатуриране при 94°C за 15 секунди, етап на отгряване на праймер при 55°C за 30 секунди, последвано от удължаване на праймера - 72°C за 30 sec. Протоколите са представени по-горе. Нивата на експресия на *VEGFR1* и *VEGFR2* бяха нормализирани към GAPDH, използвайки  $\Delta$ Ст калкулациите. Беше изчислена относителната експресия на *VEGFR1* и *VEGFR2* във всяка пациентска група спрямо експресията на този фактор при контролите.  $RQ \geq 2$  се определи като свърхекспресия,  $RQ < 0,5$  като намалена експресия, а  $RQ$  между 1,99 и 0,5 – без промяна в експресията.

### **3.4. Анализ на ефектите на кетогенната диета и на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром**

Четири групи мъжки мишки (n=10 във всяка група) бяха разделени на следните групи – на стандартна диета (контролна група), на кетогенна диета, суплементирани с витамин D и приемащи кетодиета с витамин D. След 1 месец на третиране мишките бяха сакрифицирани според приетите етични стандарти и бяха събрани проби от панкреасна тъкан, които се замразиха на -70°C. Контролната група и суплементираната с витамин D бяха хранени със стандартна лабораторна храна за животни ad libitum. В групата на кетодиета и тази на кетодиета+витамин D стандартната храна за животни беше изцяло заменена с ketoCal 4:1 ad libitum. Суплементирането с витамин D се извършваше ежедневно с 1 капка 500 UI Vigantol per os. Стандартната лабораторна храна за животни съдържа 2.4 UI/g витамин D3, а средното

количество храна на ден за една мишка беше 3.5 g или приблизително 30 UI дневен прием на витамин D на мишка. Съставът на диетите е представен в таблица 10.

Таблица 10. Състав на диетите

	<b>Nutricia KetoCAL 4:1</b>	<b>Стандартна храна за гризачи</b>
Нутриенти	на 100 g	на 100 g
енергия, kcal (kJ)	705(2950)	335 (1400)
белтък, g	14.4	20
въглехидрат.g	8.2	59.4
влакнини, g	5.3	4.8
• разтворими, g	3.2	2.4
• неразтворими, g	2.1	2.4
мазнини.g	69.2	4.8
• наситени, g	26.7	0.74
• мононенаситени,g	22.8	2
• полиненаситени, g	19.7	1.77
• витамин D UI	100	100

Животните бяха отглеждани при стандартни лабораторни условия. Експериментът се проведе през м. юни 2020г. За провеждане на опита беше получено разрешение от Българската агенция по безопасност на храните № 244/25.9.2019.

Панкреасните проби от всички групи бяха използвани за пречистване на обща РНК за експресионен анализ на гените: *Ins 1* (кодиращ инсулин), *GSK* (кодиращ глюкокиназа), *ABCC8* и *KCNJ11* (кодиращи двете субединици SUR1 и Kir6.2 на АТФ-чувствителния калиев канал) в панкреасните клетки. РНК беше изолирана чрез кит RNeasy Kit (Qiagen) като се спазва протоколът:

Преди започване на изолирането  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) се добавя към Buffer RLT. Прибавя се 10  $\mu$ l  $\beta$ -ME на 1 ml Buffer RL. Buffer RPE се използва като консервант. Преди да се използва за пръв път се добавят 4 обема етанол.

1. Изрязва се тъканната проба. Използва се не повече от 30g.
2. Тъканта се поставя в подходящ съд за хомогенизиране.
3. Тъканта се раздробява и се хомогенизира лизатът с Buffer RLT. При количество на тъканта 20 - 30 g се използва 600  $\mu$ l буфер. Използва се ротор до пълно хомогенизиране.
4. Лизатът се центрофугира за 3 минути на максимална скорост. Чрез пипетиране внимателно се отстранява супернатантът и се прехвърля в нова центрофужна колонка. В следващите стъпки се използва само този супернатант (лизат).
5. Добавя се 1 обем 70% етанол към пречистения лизат и веднага се смесва чрез пипетиране. Не се центрофугира.
6. Прехвърля се до 700  $\mu$ l от пробата включително и преципитатите, ако има такива, в колонка, поставена в 2 ml събирателна тръбичка. Центрофугира се за 15 секунди на  $\geq 8000$  оборота. Утайката се изхвърля.
7. Добавя се 700  $\mu$ l Buffer RW1 към колонката и се центрофугира за 15 секунди на  $\geq 8000$  оборота. Утайката се изхвърля.
8. Добавя се 500  $\mu$ l Buffer RPE към колонката и се центрофугира за 15 секунди на  $\geq 8000$  оборота. Утайката се изхвърля.
9. Добавя се 500  $\mu$ l Buffer RPE към колонката и се центрофугира за 2 минути на  $\geq 8000$  оборота.
10. Колонката се поставя в нова 2 ml събирателна тръбичка и старата се изхвърля заедно с утайката. Центрофугира се за 1 минута на максимална скорост.

11. Колонката се поставя в нова 1.5 ml събирателна тръбичка. Добавя се 30–50  $\mu$ l RNase-free water директно върху мембраната на колонката. Центрофугира се за 1 минута на  $\geq 8000$  оборота, за да елуира РНК.

За измерване концентрацията и качеството на изолираната тотална РНК беше използван NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Масачузетс, САЩ). Количество от 500 ng от всяка РНК проба беше подложено на обратна транскрипция до кДНК (QuantiTect Reverse Transcription kit, Qiagen). Използвани са праймери RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assay for Mouse (Qiagen). Амплификацията чрез PCR в реално време (real time PCR) беше извършена с Rotor-Gene инструмент. Общият обем на всяка реакция беше 50  $\mu$ l с по-малко от 100 ng кДНК за една реакция. Условието на амплификация на всеки real time PCR цикъл бяха както следва: реакция на денатуриране при 94°C за 15 секунди, етап на праймер анилинг при 55°C за 30 секунди, последвано от удължаване на праймера - 72°C за 30 sec. Протоколите са представени по-горе. Нивата на експресия на *Ins 1*, *GSK*, *ABCC8* и *KCNJ11* бяха нормализирани към GAPDH, използвайки  $\Delta$ Ст калкулациите. Беше изчислена относителната им експресия във всяка група спрямо експресията на този фактор при контролите.  $RQ \geq 2$  се определи като свръхекспресия,  $RQ < 0,5$  като намалена експресия, а  $RQ$  между 1,99 и 0,5 – без промяна в експресията.

Измерването на нивата на КЗ, кетотела и ТГ в кръвта се осъществи с апарат с тест ленти Wellion GALILEO®.

Нивата на инсулин в кръвта се измериха чрез Mouse Insulin Ultra Sensitive ELISA kit. Това е двустранен ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA). Микроплаката е предварително покрита с моноклонално антителио срещу инсулин. Стандарти и проби се добавят в ямки и се инкубират с моноклонално антителио, конюгирано с ензим horseradish peroxidase (HRP). След стъпка на измиване за отстраняване на несвързаните вещества се добавя субстрат ТМВ и интензитетът на цвета е пропорционален на количеството първоначално свързан инсулин. Анализът се спира и оптичната плътност на ямките се определя с помощта на четец за микроплаки. Тъй като повишенията на абсорбцията са право пропорционални на количеството уловен инсулин, неизвестната концентрация на пробата може да бъде интерполирана от референтната крива, включена във всеки анализ.

Преди започване на изследването всички реагенти и материали се оставят на стайна температура; смесват се 30 ml Wash buffer с 270 ml дестилирана вода; приготвя се разтвор за улавяне на антитела чрез разреждането му с Assay buffer и се размесва добре, за всяка ямка са необходими 100  $\mu$ l от разтвора за улавяне на антитела.

Протоколът е следният:

1. Добавят се 25  $\mu$ l от пробата във всяка ямка.
2. Слагат се 100  $\mu$ l от разтвора за улавяне на антитела.
3. Плаката се запечатва и се инкубира на стайна температура за два часа като се разклаща с 600 rpm (оборотата в минута) на хоризонтален micro-plate shaker.
4. Съдържанието се премахва и плаката се поставя на чиста хартия, за да се премахне остатъчният разтвор от всяка ямка. Добавят се 300  $\mu$ l Wash buffer във всяка ямка. Инкубира се на стайна температура за 20 секунди. Отстранява се Wash buffer и плаката се поставя на чиста хартия, за да се премахне остатъкът от всяка ямка. Стъпката с промиването се повтаря общо 4 пъти.
5. Прибавят се 100  $\mu$ l Substrate solution във всяка ямка, инкубира се на стайна температура за 15 минути като се предпазва от светлината.
6. Добавят се 100  $\mu$ l Stop solution във всяка ямка и се размесва.
7. Веднага се измерва абсорбирането на всяка ямка на 450 nm.

Изважда се абсорбцията на празната ямка от тази на стандартите и пробите. Генерира се стандартна крива, като се нанася получената абсорбция (оста y) спрямо концентрациите на инсулина (ос x). Най-подходящата линия може да бъде генерирана с всеки софтуер за монтиране на криви чрез регресионен анализ. Определя се концентрацията на инсулин в пробите от стандартната крива.

Измерването на HDAC се извърши чрез Mouse Histone deacetylase 7 (Hdac7) ELISA Kit. Преди започване китът се оставя на стайна температура за 30 минути. Използва се следният протокол:

1. Добавят се 100  $\mu$ l от пробата или стандарта във всяка ямка. В празните ямки се слага разредител за проби. Прибавят се разтворите на дъното на микро ELISA плака като

се избягват докосване или разпенване. Разбърква се. Плаката се покрива. Инкубира се за 120 минути на 37°C.

2. Премахва се течността от всяка ямка, не се изплаква. Прибавят се 100 µl Detection Reagent A във всяка ямка. Покрива се плаката. Инкубира се за 1 час на 37°C.
3. Аспирира се всяка ямка и се промива като процесът се повтаря три пъти. Измива се като всяка ямка се пълни с Wash Buffer (около 400µl). На всяка стъпка е необходимо пълно отстраняване на течността. След последното промиване напълно се отстранява останалият Wash Buffer чрез аспириране. Плаката се обръща и се поставя върху чиста хартия.
4. Добавят се 100 µl Detection Reagent B във всяка ямка. Покрива се и се инкубира за 60 минути на 37°C.
5. Промиването се повтаря пет пъти както е описано в стъпка 3.
6. Прибавят се 90 µl Substrate Solution във всяка ямка. Покрива се и се инкубира за 10-20 минути на 37°C. Трябва да се пази от светлината. Времето на реакцията не трябва да е повече от 30 минути.
7. Добавят се 50 µl Stop Solution във всяка ямка.
8. Определя се оптичната плътност (OD value) на всяка ямка като се използва четец за микроплаки, настроен на 450 nm.

Нивата на 25OHD бяха измерени с помощта на Mouse 25-OH Vitamin D (25OHVD) ELISA Kit. Използва се протоколът:

1. Слагат се 50 µl от проба или стандарт във всяка ямка. В празните ямки се слага разредител за проби. Разтворите се поставят на дъното на микро ELISA плака като се избягват докосване или разпенване.
2. Веднага се прибавят 50 µl Detection Reagent A във всяка ямка. Покрива се и се инкубира за 1 час на 37°C.
3. Всяка ямка се аспирира и се промива като процедурата се повтаря три пъти. Промива се като се пълни всяка ямка с 400 µl Wash Buffer и се оставя за 1-2 минути. Важно е напълното отстраняване на течността на всяка стъпка. След последната промивка напълно се премахва останалият Wash Buffer чрез аспирация. Объща се плаката върху абсорбираща хартия.

4. Добавят се 100  $\mu$ l Detection Reagent B във всяка ямка. Покрива се и се инкубира за 45 минути на 37°C.
5. Промиването се повтаря пет пъти както е описано в стъпка 3.
6. Прибавят се 90  $\mu$ l Substrate Solution във всяка ямка . Покрива се и се инкубира за 10-20 минути на 37°C. Трябва да се предпазва от светлина. Реакционното време не трябва да е по-дълго от 30 минути.
7. Добавят се 50  $\mu$ l Stop Solution във всяка ямка.
8. Определя се оптичната плътност (OD value) на всяка ямка като се използва четец за микроплаки, настроен на 450 nm.

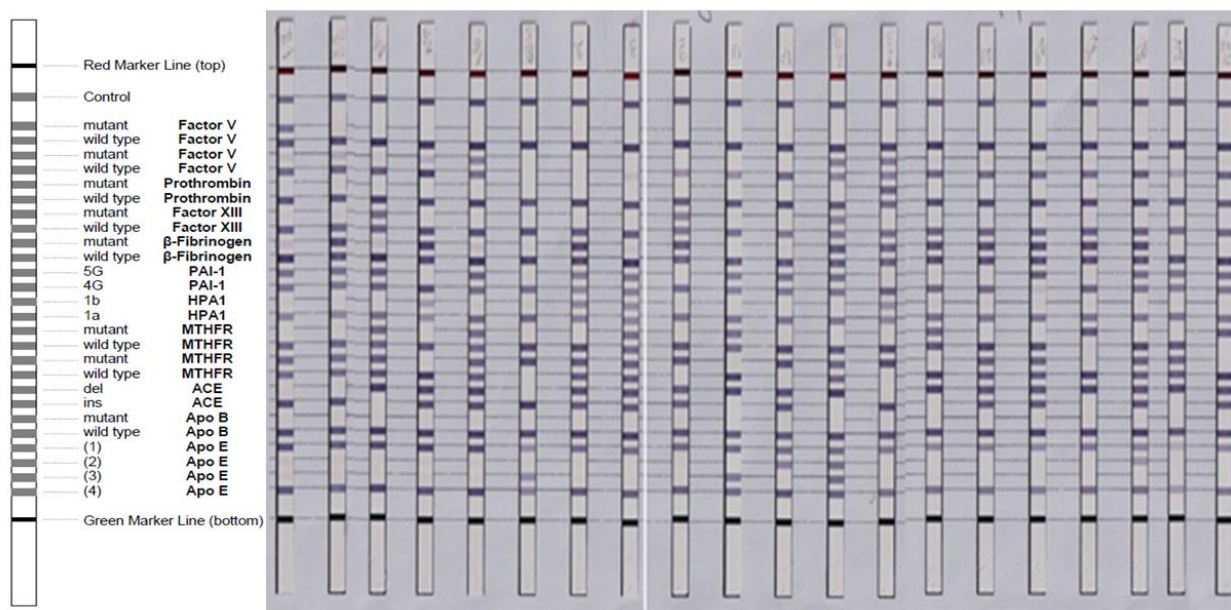
## ГЛАВА ЧЕТВЪРТА

### РЕЗУЛТАТИ

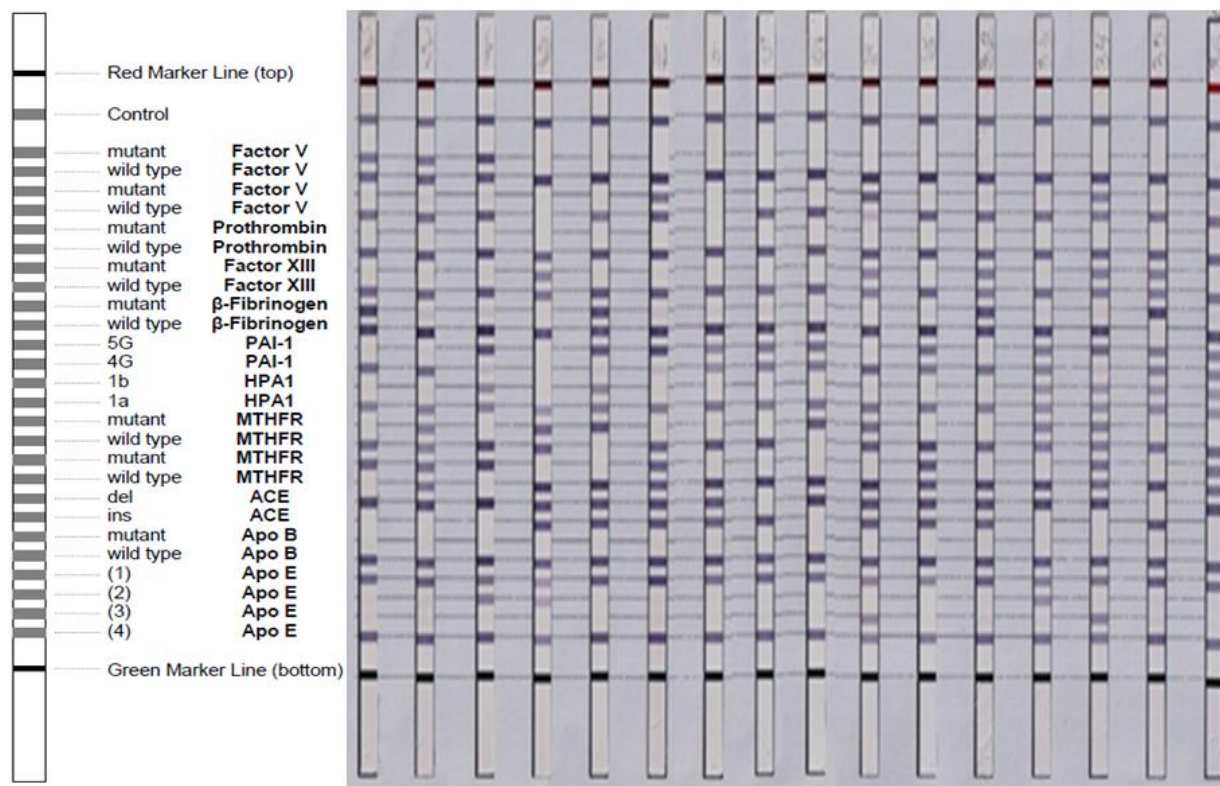
#### 4.1. Резултати от изследването на генетични варианти, свързани със сърдечно-съдов риск при пациенти със ЗД тип 2

В нашето проучване общият брой изследвани пациенти е 36, т.е. 72 алели – 20 пациенти от първата група (40 алели) и 16 пациенти от втората (32 алели). За някои генетични варианти броят е по-малък поради неуспешен анализ.

На фигура 6 са представени резултатите от генотипирането на изследваните генни варианти при пациенти със ЗД тип 2 и сърдечно-съдови усложнения, а на фигура 7 - резултатите от генотипирането им при пациенти със ЗД тип 2 без сърдечно-съдови усложнения. Таблица 11 обобщава алелните честоти на анализиранияте генни варианти при пациентите със ЗД тип 2.



Фигура 6. Резултати от генотипирането на генните варианти при пациенти със ЗД тип 2 и сърдечно-съдови усложнения



Фигура 7. Резултати от генотипирането на генните варианти при пациенти със ЗД тип 2 без сърдечно-съдови усложнения

Таблица 11. Алелни честоти на анализиранияте генни варианти при пациентите със ЗД тип 2

Генетичен вариант	Брой (процент)
<i>FV (Leiden)</i>	4/72 (5.5%)
<i>FV (R2)</i>	6/62 (9.7%)
<i>Prothrombin 20210A</i>	1/72 (1.4%)
<i>Factor XIII V34L</i>	8/72 (11.1%)
<i>β-Fibrinogen -455 G-A</i>	16/72 (22.2%)
<i>PAI-1 4G</i>	41/70 (58.6%)
<i>HPA-1b</i>	9/72 (12.5%)

<i>MTHFR 677T</i>	18/72 (25%)
<i>MTHFR 1298C</i>	28/72 (38.9%)
<i>ACE Del</i>	43/72 (59.7%)
<i>Apo B R3500Q</i>	0
<i>Apo E4</i>	6/72 (8.3%)

#### 4.1.1. Резултати от генотипирането на фактори за вродена тромбофилия

На таблица 12 са представени обобщените данни на алелните и генотипните честоти на факторите за вродена тромбофилия при пациенти със ЗД тип 2 със и без сърдечно-съдови усложнения.

Таблица 12. Алелни и генотипни честоти на факторите за вродена тромбофилия при пациенти със ЗД тип 2

Алел/генотип	ЗД със ССЗ	ЗД без ССЗ	Всички
<i>FV (Leiden)</i> алел	1/40 (2.5%)	3/32 (9.4%)	4/72 (5.5%)
<i>FV G/A</i> генотип	1/20 (5%)	3/16 (18.8%)	4/36 (11%)
<i>FV A/A</i> генотип	0	0	0
<i>FV (R2)</i> алел	3/34 (8.8%)	3/28 (10.7%)	6/62 (9.7%)
<i>FV H/R</i> генотип	3/17 (17.6%)	3/14 (21.4%)	6/31 (19.4%)
<i>FV R/R</i> генотип	0	0	0
<i>Prothrombin 20210A</i>	1/40 (2.5%)	0	1/72 (1.4%)
алел	1/20 (5%)	0	1/36 (2.8%)

<i>Prothrombin G/A</i> генотип	0	0	0
<i>Prothrombin A/A</i> генотип			
<i>PAI-1 4G</i> алел	26/40 (65%)	15/30 (50%)	41/70 (58.6%)
<i>PAI-1 4G/5G</i> генотип	12/20 (60%)	7/15 (46.7%)	19/35 (54.3%)
<i>PAI-1 4G/4G</i> генотип	7/20 (35%)	4/15 (26.7%)	11/35 (31.4%)
<i>Factor XIII 34L</i> алел	3/40 (7.5%)	5/32 (15.6%)	8/72 (11.1%)
<i>Factor XIII V/L</i> генотип	3/20 (15%)	5/16 (31.2%)	8/36 (22.2%)
<i>Factor XIII L/L</i> генотип	0	0	0
<i>β-Fibrinogen - 455 A</i> алел	11/40 (27.5%)	5/32 (15.6%)	16/72 (22.2%)
<i>β-Fibrinogen - 455 G/A</i> генотип	11/20 (55%), p<0.03	3/16 (18.7%)	14/36 (38.9%)
<i>β-Fibrinogen - 455 A/A</i> генотип	0	1/16 (6.2%)	1/36 (2.7%)
<i>HPA-1b</i> алел	3/40 (7.5%)	6/32 (18.7%)	9/72 (12.5%)
<i>HPA 1a/1b</i> генотип	3/20 (15%)	6/16 (37.4%)	9/36 (25%)
<i>HPA 1b/1b</i> генотип	0	0	0

#### **4.1.1.1. Резултати от генотипирането на Фактор V Leiden и HR2**

Общо при всички пациенти е намерена честота от 5.5% за *FV Leiden* алела - повече от 2 пъти повишена в сравнение с популационната честота от 1.9% в света (2.9% за Европа). Съгласно 1000 Genomes базата данни, честотата на хетерозиготите е 2%, а в нашата група пациенти установихме честота от 11%. Не се установява връзка на мутацията *FV Leiden* с наличието на сърдечно-съдови усложнения, като дори в групата на пациентите без ССЗ се намира още по-висок процент на мутацията – 9.4%. По-висока от популационната е установената от нас честота за *FV R2* алела – 9.7% спрямо 5.7% в света и 6% в Европа. Не е намерена асоциация със ССЗ.

#### **4.1.1.2. Резултати от генотипирането на Протромбин**

Установената от нас честота 1.4% за мутантния алел при всички пациенти с диабет е съизмерима с общата популационна честота от 0.8% в света и 1.1% в Европа. Този алел е намерен само в групата със ССЗ, без да се достига статистическа значимост.

#### **4.1.1.3. Резултати от генотипирането на PAI-1**

Установява се по-висока честота на патогенния алел от 58.6% спрямо 26.9% популационна честота в света според геномната база Ensembl (38.9% в Европа). Честотата на хомозиготите *4G/4G* е 31.4% спрямо 20.9% в света и 29.4% в Европа, а на хетерозиготите *4G/5G* при всички пациенти със ЗД – 54.3%. Не е намерена асоциация със ССЗ.

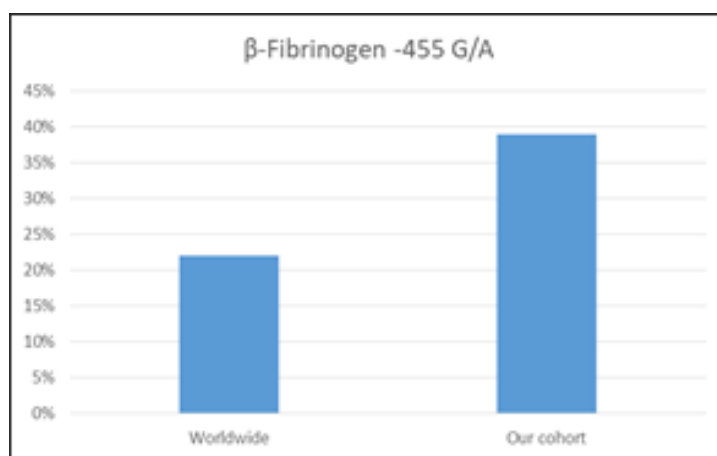
#### **4.1.1.4. Резултати от генотипирането на Фактор XIII**

В нашата кохорта пациенти се установява по-ниска честота за минорния алел от 11.1% спрямо 21.9% популационна честота в света и 25.2% в Европа. Прави впечатление, че в групата със ССЗ е дори по-ниска (7.5%), което предполага евентуалната протективна роля на този генетичен вариант.

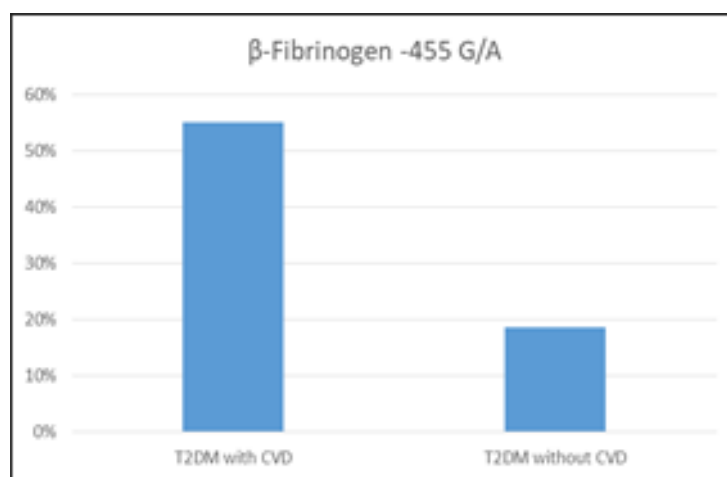
#### **4.1.1.5. Резултати от генотипирането на $\beta$ -fibrinogen**

Установената от нас алелна честота от 22.2% за патогенния алел е по-висока спрямо популационната честота от 16.9% и близка до тази 20.3% в Европа – фигура 8. Според 1000 Genomes Project Phase 3 популационната честота на хетерозиготите е 22%, а установената

от нас при пациенти със ЗД е 38.9%. Тя се повишава статистически значимо,  $p < 0.03$ , в групата със ССЗ в сравнение с тези без ССЗ – 55% срещу 18.7% - фигура 9.



Фигура 8. Честота на хетерозиготите по мутацията за  $\beta$ -фибриноген – 455 G/A – вляво в световен мащаб, вдясно – установена в нашата кохорта

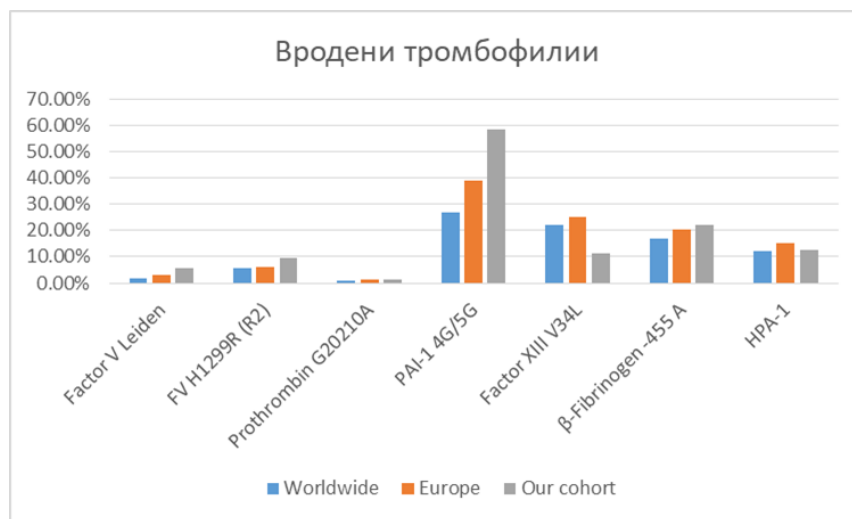


Фигура 9. Честота на хетерозиготите по мутацията за  $\beta$ -фибриноген – 455 G/A в нашето проучване – вляво при пациенти със ЗД тип 2 и ССЗ, вдясно – при хора със ЗД тип 2 без ССЗ

#### 4.1.1.6. Резултати от генотипирането на *HPA1* (гликопротеин *GP IIb/IIIa*)

Установената от нас алелна честота от 12.5% за мутантния алел е аналогична на популационната честота от 12.1% в света (15.2% в Европа).

В обобщение за факторите, свързани с вродени тромбофилии, установихме за повечето от тях по-висока честота от популационната, без да се достига статистическа значимост – фигура 10 и 11. Най-висока е честотата на носителство на PAI-1 варианта 4G при пациентите със ЗД тип 2 (58.6%). Честотата на FXIII полиморфизма е по-ниска от популационната му честота, което е в съответствие с данните за протективната роля на този полиморфизъм (11.1% срещу 21.9%). При сравняване на честотите в групите със и без ССЗ, само вариантите в PAI-1 и фибриноген показват по-висока честота в групата със ССЗ, като статистическа значимост се достига за  $\beta$ -фибриноген – 455 G/A генотипа.



Фигура 10. Графично представяне на честотите на изследваните варианти за вродени тромбофилии в световен мащаб, в Европа и в нашата кохорта



Фигура 11. Честоти на изследваните варианти за вродени тромбофилии при ЗД тип 2 със и без ССЗ

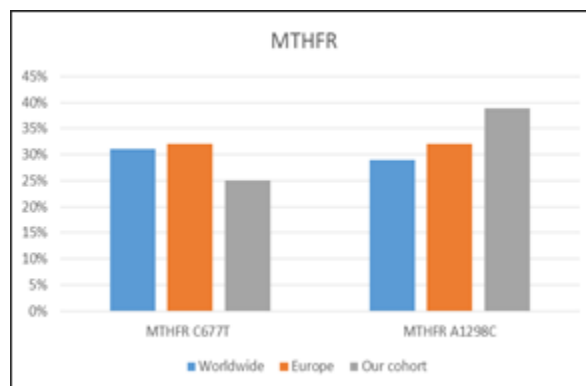
#### 4.1.2. Резултати от генотипирането на MTHFR

На таблица 13 са представени резултатите на алелните и генотипните честоти на *MTHFR C677T* и *MTHFR A1298C*. Установената от нас алелна честота за *MTHFR 677T* от 25% при пациентите е малко по-ниска от популационната – 31% в света и 32% в Европа; алелната честота за *MTHFR 1298C* в нашето проучване от 38.9% е по-висока от популационната – 29% в света и 32% в Европа – фигура 12 и 13.

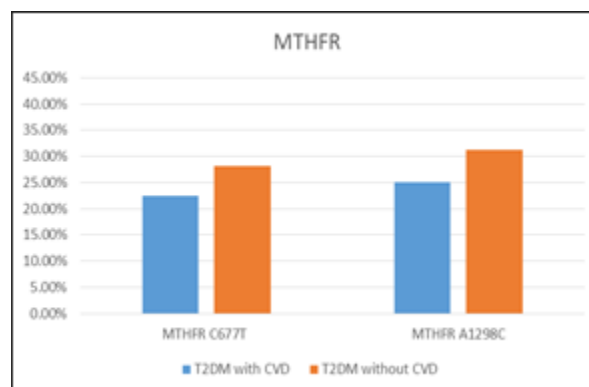
Таблица 13. Алелни и генотипни честоти на *MTHFR C677T* и *MTHFR A1298C*

Алел/Генотип	ЗД и ССЗ	ЗД без ССЗ	Общо
<i>MTHFR 677T</i>	9/40 (22.5%)	9/32 (28.1%)	18/72 (25%)
<i>MTHFR C/T</i>	5/20 (25%)	5/16 (31.2%)	10/36 (27.8%)
<i>MTHFR T/T</i>	2/20 (10%)	2/16 (12.5%)	4/36 (11.1%)
<i>MTHFR 1298C</i>	19/40 (47.5%)	9/32 (28.1%)	28/72 (38.9%)
<i>MTHFR A/C</i>	11/20 (55%)	5/16 (31.2%)	16/36 (44.4%)

<i>MTHFR C/C</i>	4/20 (20%)	2/16 (12.5%)	6/36 (16.7%)
------------------	------------	--------------	--------------



Фигура 12. Честота на *MTHFR C677T* и *MTHFR A1298C* в световен мащаб (в синьо), в Европа (в оранжево) и при пациенти със ЗД тип 2 от нашето проучване (в сиво)



Фигура 13. Честота на *MTHFR C677T* и *MTHFR A1298C* при пациенти със ЗД със (в синьо) и без ССЗ (в оранжево)

#### 4.1.3. Резултати от генотипирането на ACE

Таблица 14 представя алелните и генотипните честоти на ACE. Установената от нас честота на хомозиготи по патологичния алел *ACE D/D* от 36.1% при хората с диабет е по-висока от популационната честота от 25% в Европа.

Таблица 14. Алелни и генотипни честоти на ACE

Алел/Генотип	ЗД и ССЗ	ЗД без ССЗ	Общо
<i>ACE Del</i>	22/40 (55%)	21/32 (65.6%)	43/72 (59.7%)
<i>ACE I/D</i>	10/20 (50%)	7/16 (43.7%)	17/36 (47.2%)
<i>ACE D/D</i>	6/20 (30%)	7/16 (43.7%)	13/36 (36.1%)

#### 4.1.4. Резултати от генотипирането на ApoB

Мутацията не беше установена в нито един от изследваните пациенти, а популационната му честота е 1 на 5000.

#### 4.1.5. Резултати от генотипирането на ApoE

На таблица 15 са показани честотите на ApoE генотиповете при изследваните пациенти. Честотата на носителство на рисковия алел *E4* от 13.9% е напълно съпоставима с популационната – 13.8% в света и 16.1% в Европа.

Таблица 15. Честота на ApoE генотиповете

Алел/Генотип	ЗД и ССЗ	ЗД без ССЗ	Общо
<i>Apo E3/E4</i>	2/20 (10%)	3/16 (18.7%)	5/36 (13.9%)
<i>Apo E2/E4</i>	1/20 (5%)	0	1/36 (2.8%)
<i>Apo E3/E3</i>	17/20 (85%)	13/16 (81.3%)	30/36 (83.3%)

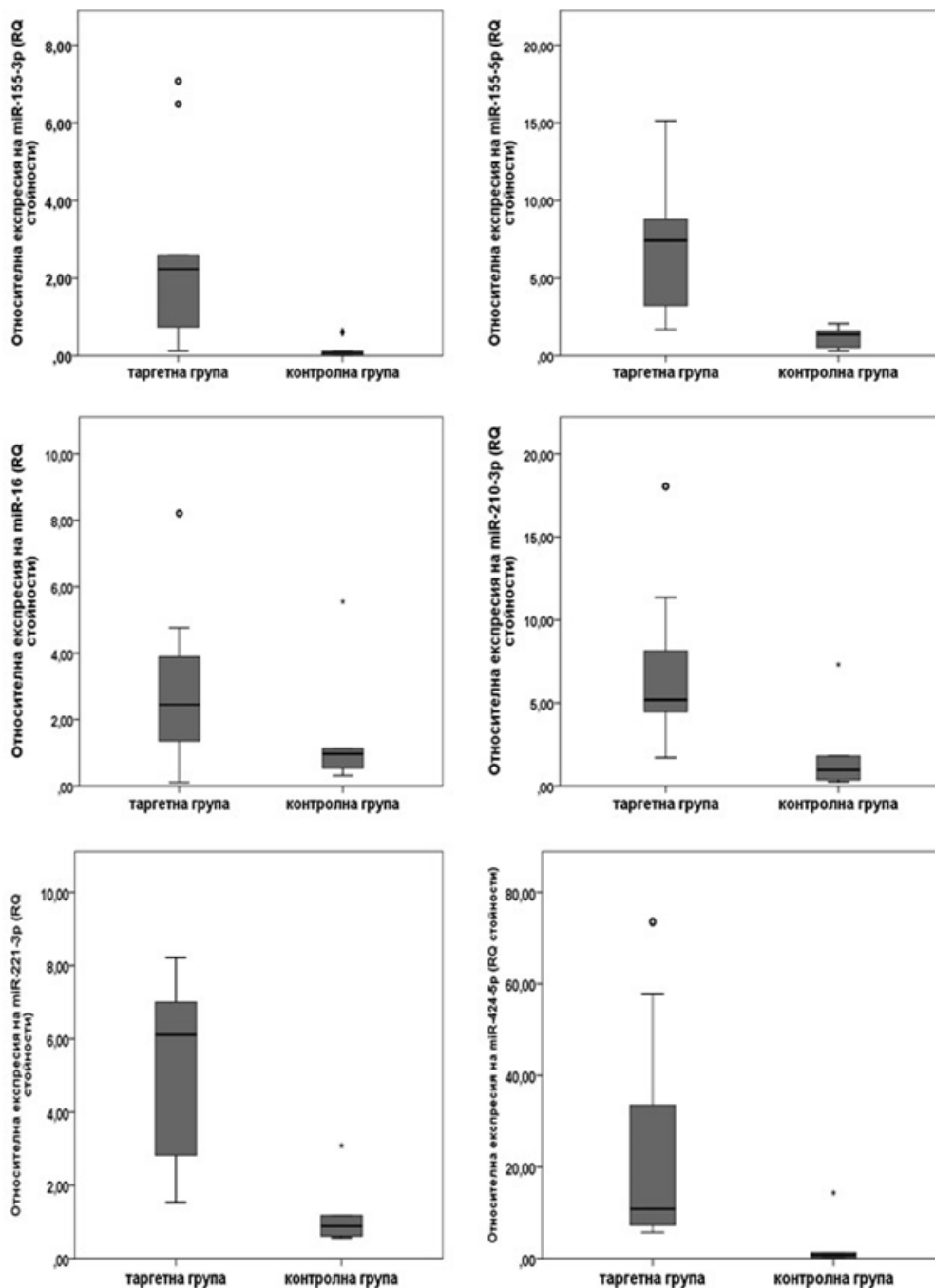
Не се установява статистически значима разлика в алелните и генотипните честоти на представените по-горе изследвани генетични варианти между изследваните групи пациенти със ЗД със и без ССЗ.

#### **4.2. Резултати от анализа на експресионните нива на някои miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2**

В нашето проучване бяха анализирани следните miRNA: miRNA-16, miRNA-155-3p, miRNA-155-5p, miRNA-210, miRNA-221 и miRNA-424 при пациенти със ЗД със (таргетна група) и без ССЗ (контролна група). Сравнителният анализ на експресията показва статистически значимо повишаване на експресията на всички тези miRNA в таргетната група в сравнение с контролната – таблица 16, фигура 14.

Таблица 16. Относителна експресия на анализираниите miRNA

<b>miRNA</b>	<b>Относителна експресия (RQ)</b>
miRNA-16	2.2
miRNA-155-3p	2.5
miRNA-155-5p	5.1
miRNA-210	6.2
miRNA-221	7.5
miRNA-424	10.5



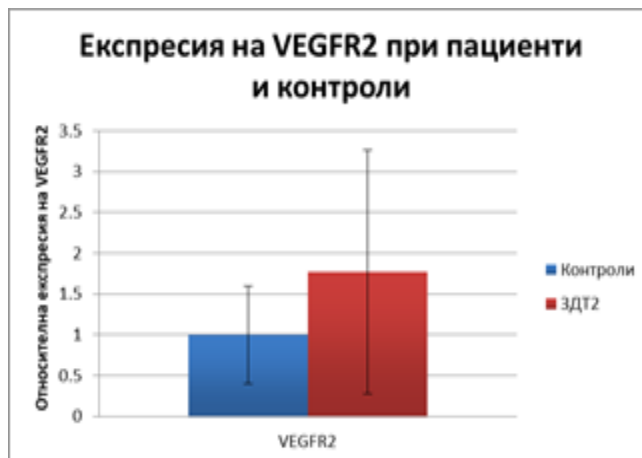
Фигура 14. Средни относителни нива на експресия на изследваните miRNA в таргетната група в сравнение с контролната

Най-голямо увеличаване в експресията в групата на пациенти със ЗД и установено ССЗ се наблюдава за miRNA-424 със средно RQ 10,5, следвано от miRNA-221 с RQ 7,5, miRNA-210

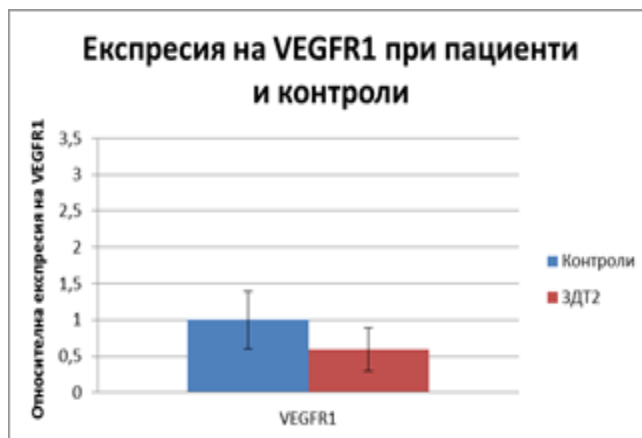
с RQ 6,2 и miRNA-155-5p с RQ 5,1. Най-малко увеличаване в експресията имаше за miRNA-16 и miRNA-155-3p – съответно 2,2 и 2,5 пъти.

### 4.3. Резултати от анализа на експресията на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2

Генно-експресионният анализ на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв, извършен при пациенти със ЗД тип 2 и контроли, показва средни относителни нива от 1.77 за този маркер при пациентите в сравнение с контролите, без да има статистически значима разлика – фигура 15. Средните относителни нива на експресия на маркера за хемопоеични стволови клетки *VEGFR1* бяха 0.59 и показаха статистически значимо намаление спрямо контролите -  $p < 0.01$  – фигура 16.



Фигура 15. Средна експресия на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2 и контроли



Фигура 16. Средна експресия на *VEGFR1* в клетки от периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2 и контроли,  $p < 0.01$

При разглеждане на подгрупите с различна давност на ЗД се установиха средни относителни нива на експресия за *VEGFR2* в клетки от периферна кръв съответно 1.09 при новодиагностициран диабет, 2.36 при пациенти под 5 годишна давност и 2.80 при пациенти с над 5-годишна давност на ЗД – фигура 17. По отношение на експресията на *VEGFR1* установените нива бяха 0.69, 0.49 и 0.59, съответно – фигура 18.



Фигура 17. Средна експресия на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв при пациенти с различна давност на ЗД тип 2

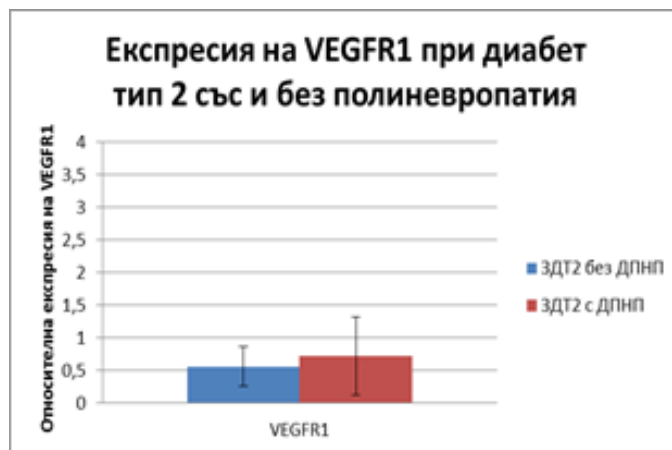


Фигура 18. Средна експресия на *VEGFR1* в клетки от периферна кръв при пациенти с различна давност на ЗД тип 2

Сравнението на експресията на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв на пациенти без ДПНП и такива с наличие на това усложнение показва статистически значимо намаление на експресията ( $p < 0.05$ ) при пациенти с полиневропатия в сравнение с пациенти без – 0.33 срещу 2.18 - фигура 19. Експресията на *VEGFR1* не показва статистически значима разлика в двете групи – 0.72 срещу 0.56 – фигура 20.



Фигура 19. Средна експресия на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2 и наличие или липса на ДПНП,  $p < 0.05$



Фигура 20. Средна експресия на *VEGFR1* в клетки от периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2 и наличие или липса на ДПНП

В обобщение нашето проучване установи статистически значимо намаление на експресията на *VEGFR1* (0.59 пъти) при пациенти със ЗД тип 2 в сравнение с контроли ( $p < 0.01$ ); анализът на експресията на *VEGFR2* показва статистически значимо намаление ( $p < 0.05$ ) при пациенти с полиневропатия в сравнение с пациенти без това усложнение – 0.33 срещу 2.18.

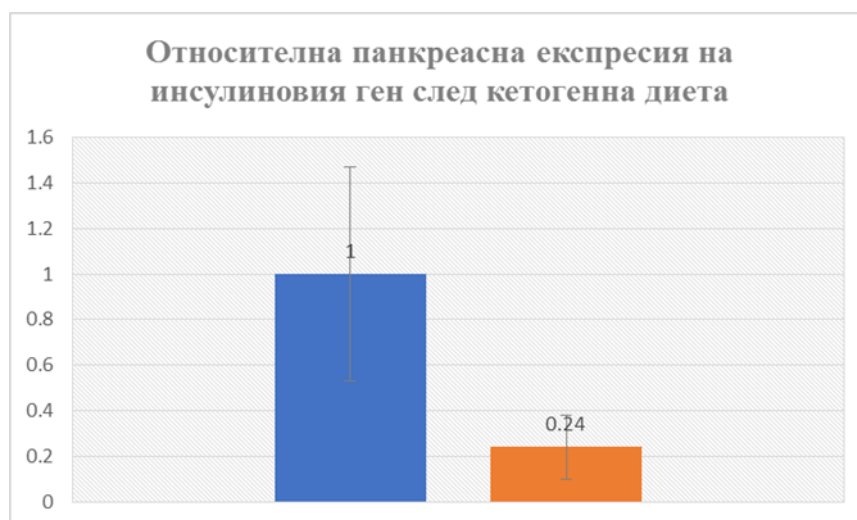
#### **4.4. Резултати от анализа на ефектите на кетогенната диета и на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром**

Кетогенната диета намалява експресията на гените *Ins 1*, *GCK*, *ABCC8* и *KCNJ11* – таблица 17; прилагането на витамин D заедно с кетодиета повишава транскрипционните нива на инсулиновия ген около 3 пъти, без да се достига стойността на контролите; самостоятелното витамин D суплементиране сигнификантно увеличава транскрипционните нива на инсулиновия ген в панкреас на мишки.

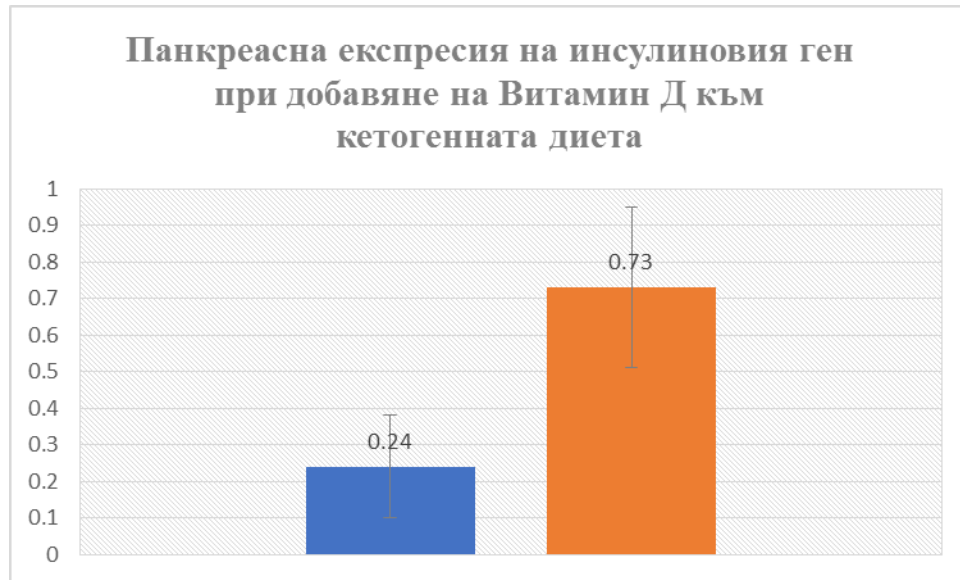
Таблица 17. Относителна панкреасна експресия на изследваните гени след кетодиета

Ген	Относителна експресия (RQ)
<i>Ins1</i>	0.24
<i>ABCC8</i>	0.21
<i>KCNJ11</i>	0.32
<i>GSK</i>	0.54

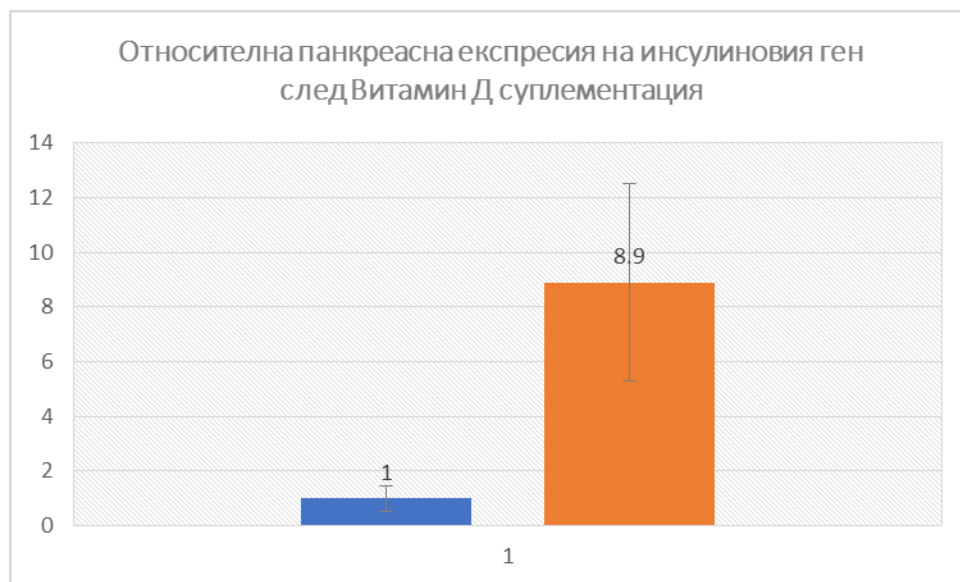
Генно-експресионният анализ на инсулиновия ген установи намаляване в експресията му в групата на кетогенна диета –  $RQ = 0,24$ , в сравнение с контролната група – фигура 21. В групата, суплементирана едновременно с витамин D и приемаща кетодиета, се наблюдава по-висока експресия на гена ( $RQ = 0,73$ ) спрямо групата само на кетогенна диета, но не достигаща тази при контролите – фигура 22. Резултатите от групата само с витамин D показват статистически значимо увеличаване на експресията на инсулиновия ген спрямо контролната ( $RQ = 8,9$ ,  $p = 0,02$ ) – фигура 23. На фигура 24 са представени обобщените данни от експресионния анализ.



Фигура 21. Относителна панкреасна експресия на инсулиновия ген след кетогенна диета (синьо – контроли, оранжево - третирани)



Фигура 22. Панкреасна експресия на инсулиновия ген при едновременна суплементация с витамин D и кетодиета (синьо – контроли, оранжево - третирани)



Фигура 23. Панкреасна експресия на гена за инсулин при прием само на витамин D спрямо контролната група (синьо – контроли, оранжево - третирани),  $p = 0,02$



Фигура 24. Относителна панкреасна експресия на инсулиновия ген след различно третиране – обобщени данни

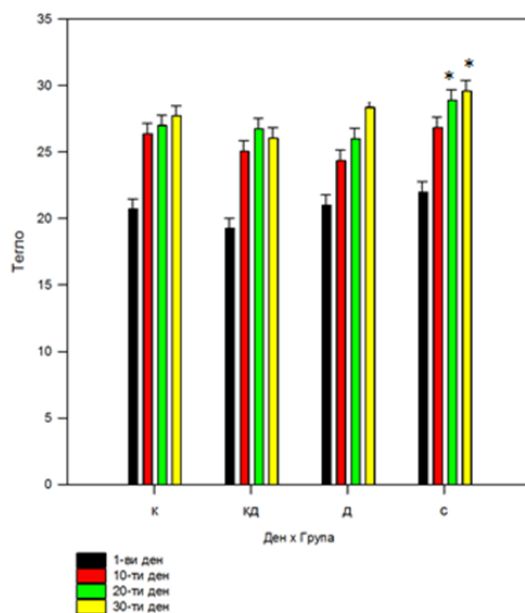
Приемът само на витамин D доведе до значително повишаване на експресията на гените *Ins1* (RQ = 8,9), *GCK* (RQ = 11,5) и *KCNJ11* (RQ = 5,9) в панкреаса на третираните мишки спрямо контролите – фигура 25.



Фигура 25. Повишаване на панкреасната експресия на гените *Ins1*, *GCK* и *KCNJ11* след третиране с витамин D

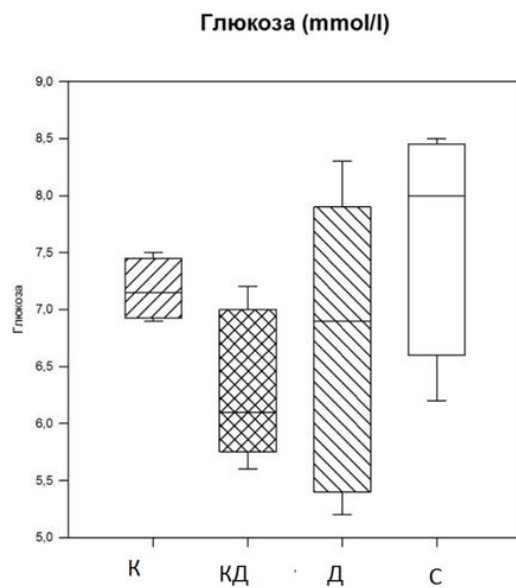
Теглото на опитните животни беше измервано всяка седмица. Резултатите бяха анализирани чрез двуфакторен ANOVA за факторите „експериментална група“ – К (кетодиета), КД

(кетодиета + витамин D суплементиране), Д (витамин D суплементиране) – и С (контрола) и факторът „време на измерване“. И двата фактора оказват статистически значим ефект по отношение на теглото – с времето животните във всяка от групите статистически значимо повишаваше теглото си ( $p < 0.001$ ). В сравнение с контролната група и трите третирани експериментални групи показаха значително по-ниско тегло след първия месец ( $p < 0.001$ ) – фигура 26.



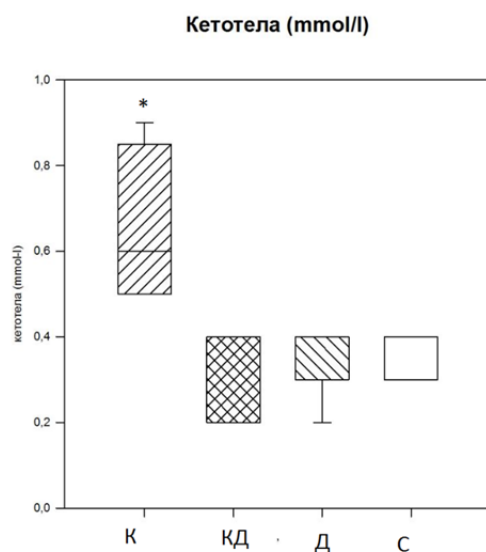
Фигура 26. Промени в теглото на опитните животни по време на третирането, g

Глюкозата в серума не се различаваше статистически значимо между групите ( $p = 0.143$ , непараметричен ANOVA) – фигура 27.



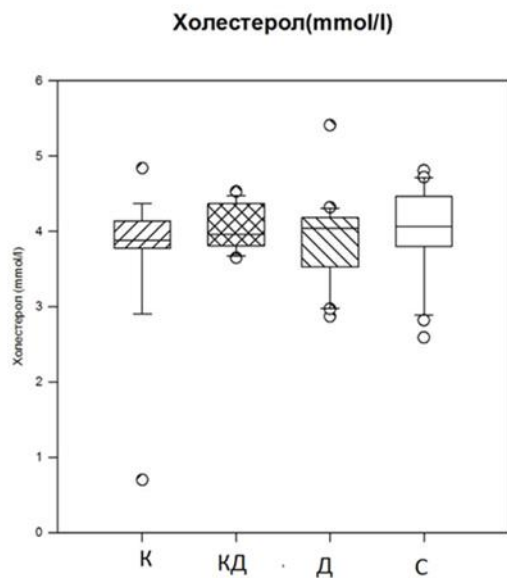
Фигура 27 . Нива на глюкоза в серума в края на експеримента, mmol/l

Кетотелата, както се очакваше, бяха статистически значимо повишени в групата на кетодиета ( $p < 0.05$ , непараметричен ANOVA). Едновременното суплементиране с витамин D обаче статистически значимо понижава кетонемията – фигура 28.



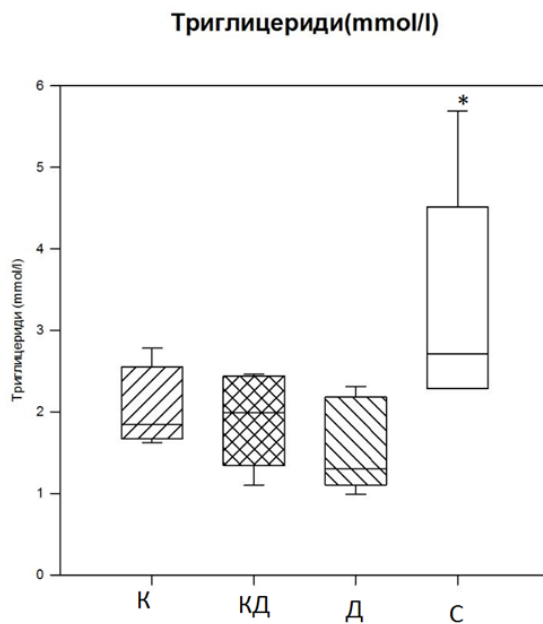
Фигура 28. Нива на кетотела в кръвта, mmol/l

Нивата на общия холестерол в кръвта не се различава статистически значимо между групите ( $p > 0.05$ , непараметричен ANOVA) – фигура 29.



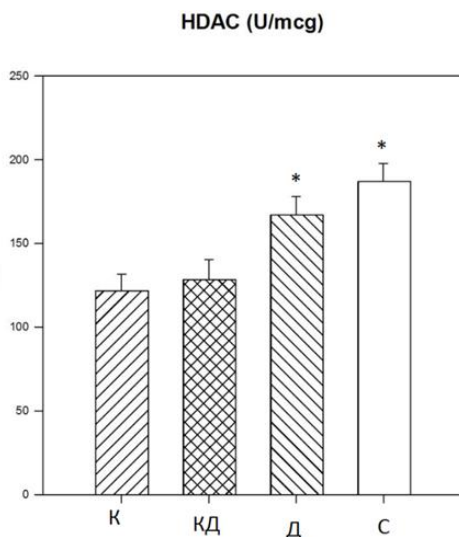
Фигура 29. Нива на общия холестерол в кръвта, mmol/l

Триглицеридемията в трите третирани групи показва тенденция към по-ниски стойности в сравнение с контролната група ( $p = 0.08$ , еднофакторен ANOVA) – фигура 30.



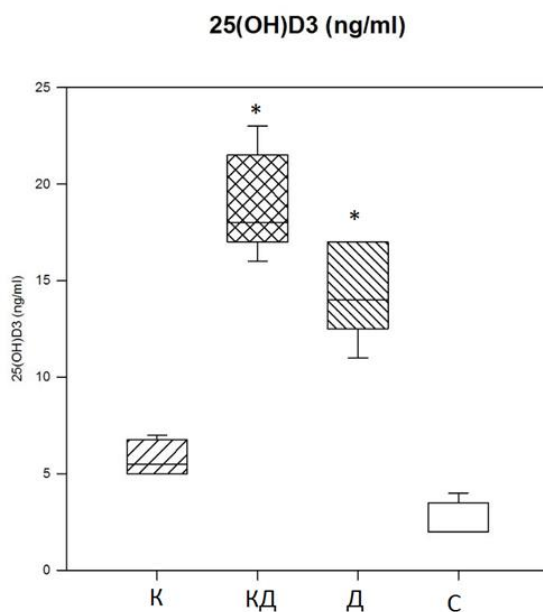
Фигура 30. Ниво на триглицериди в кръвта, mmol/l

HDAC показва по-ниски стойности в групите, третирани с кетодиета, със или без суплементиране с витамин D ( $p < 0.01$ , еднофакторен ANOVA) – фигура 31.



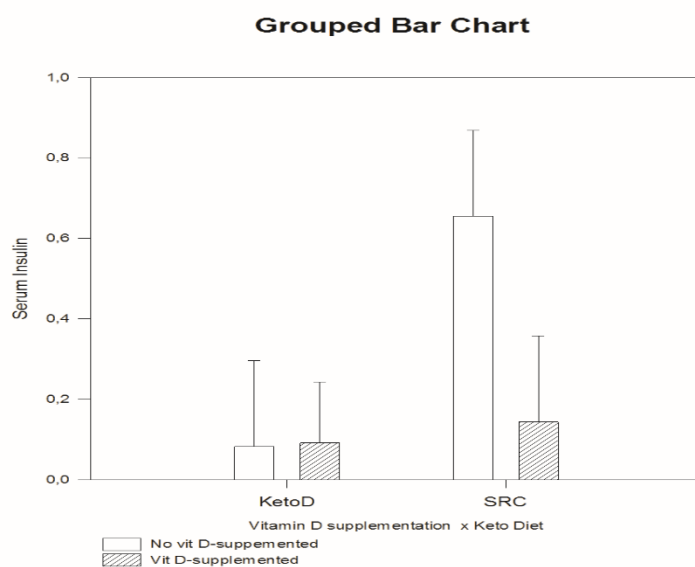
Фигура 31. Хистондеацетилазна активност в серума, U/μg

Очаквано, нивата на 25ОНD в серума на животните, допълнително суплементирани с витамин D, бяха статистически значимо по-високи от тези на несуплементираните ( $p < 0.05$ , непараметричен ANOVA) – фигура 32.



Фигура 32. Ниво на 25ОНD в серума, ng/ml

Във връзка с резултатите от инсулина в серума е приложен факторен анализ по отношение на супрементиране или не с витамин D (фактор суплементиране с витамин D) и фактор диета (Keto diet или Standard Rodent Show - SRC). Тези резултати изглежда че корелират с генетичните - фигура 33.



Фигура 33. Нива на инсулин, ng/ml

## ГЛАВА ПЕТА

### ОБСЪЖДАНЕ

#### **5.1. Роля на генетичните варианти, свързани със сърдечно-съдов риск при пациенти със ЗД тип 2**

Резултатите от нашето проучане върху генотипирането на  $\beta$ -фибриноген - 455 G/A установи, че честотата на патогенния алел е 22.2% и е по-висока спрямо популационната честота от 16.9% в световен мащаб и 20.3% в Европа. Според 1000 Genomes Project Phase 3 популационната честота на хетерозиготите е 22%, а установената от нас при хората с диабет е 38.9%. Тя се повишава статистически значимо в групата от пациенти със ЗД и ССЗ в сравнение с пациентите със ЗД без ССЗ – 55% срещу 18.7% ( $p < 0.03$ ). Известно е, че мутацията 455G/A в промоторния регион на  $\beta$ -фибриновия ген е свързана с повишени нива на фибриногена в плазмата. Carter et al. са проучили връзката между 455G/A генния полиморфизъм и фибриногеновите нива за развитието на КАБ при пациенти със ЗД тип 2. Резултатите показват сигнификантно увеличени нива на фибриногена при пациенти с КАБ в сравнение с тези, които нямат КАБ. Тези данни показват асоциация между 455 G/A генния полиморфизъм и развитието на КАБ при ЗД [55]. Lam et al. са изучавали връзката между същия полиморфизъм и плазмените фибринови концентрации в опит да изяснят ролята му при КАБ при пациенти със ЗД тип 2 и контроли, които нямат ЗД. Установява се, че 455 G/A генният полиморфизъм в  $\beta$ -фибриногеновия ген е генетична детерминанта за нивата на фибриногена в кръвта и за ролята му като рисков фактор за КАБ [56].

По отношение на резултатите от генотипирането на Фактор V Leiden се установи, че общо при всички пациенти честотата е 5.5% - повече от 2 пъти повишена в сравнение с популационната честота от 1.9% в света (2.9% за Европа). Съгласно 1000 Genomes базата данни честотата на хетерозиготите е 2%, а в нашата група пациенти установихме честота от 11%. Не се установява връзка на мутацията FV Leiden с наличието на сърдечно-съдови усложнения, като дори в групата на пациентите без ССЗ се намира още по-висок процент на мутацията – 9.4%. По-висока от популационната е установената от нас честота за FV H1299R (R2) – 9.7% спрямо 5.7% в света и 6% в Европа. Връзката между FVL и атеросклерозата е обект на дебати от известно време поради разнопосочни данни. Изказана

е хипотеза за връзка между мутацията и ЗД тип 1 и 2, но резултатите са противоречиви [59, 60]. Braun et al. откриват асоциация между *FV G1691A (Leiden)* и венозния тромбемболизъм [61]. Проучване установява увеличение в честотата на ЗД сред пациенти с венозен тромбемболизъм, които са носители на мутацията, сравнени с неносители, но връзката не е статистически значима [62].

Установената от нас честота за генотипирането на протромбин *G20210A* е 1.4% патогенния алел при за всички пациенти с диабет и е съизмерима с общата популационна честота от 0.8% в света и 1.1% в Европа. Известно е обаче, че мутацията протромбин *G20210A* причинява повишени нива на протромбин и увеличава риска от формиране на съсиреци, включително и от дълбока венозна тромбоза, а също и белодробен тромбемболизъм. След фактор V Leiden, тя е един от най-честите генетични варианти, асоцииращи се с венозен тромбемболизъм [76]. Метаанализ на Ye et al. установява 1,3 пъти повишен риск от КАБ [77].

Нашите резултатите от генотипирането на PAI-1 установяват по-висока честота на патогенния алел от 58.6% спрямо 26.9% популационна честота в света според геномната база Ensembl (38.9% в Европа). Честотата на хомозиготите *4G/4G* е 31.4% спрямо 20.9% в света и 29.4% в Европа, а на хетерозиготите *4G/5G* при всички пациенти със ЗД – 54.3%. От различни проучвания е известно, че повишените му нива са важен рисков фактор за тромбоза и атеросклероза [63]. Той е увеличен при пациенти с КАБ. Има данни, че инсулиновата резистентност може да бъде регулатор на експресията на PAI-1. Образуването му от мастната тъкан би могло да допринесе за повишените му нива, които се откриват при пациенти с инсулинова резистентност и с метаболитен синдром. Проспективни проучвания на хора с МИ или КАБ откриват връзка между увеличените му нива и риска от коронарна болест [64, 65]. Метаанализ доказва, че *4G/5G* полиморфизмът се свързва с МИ [66]. Генотипът *4G/4G* води до повишени нива на PAI-1 и като резултат – хипофибринолитично състояние и повишен тромботичен риск [67]. Съществува асоциация между повишените нива на PAI-1 и коремното затлъстяване, тъй като мастната тъкан го експресира и е негов важен източник при тези пациенти [68]. Комбинацията от ЗД тип 2 и затлъстяване допринася за по-съществено увеличаване на PAI-1 в сравнение с обезитета и ЗД поотделно [69]. PAI-1

има отношение и към РААС, който има голям принос в иницирането на съдовото заболяване и за прогресията му [70].

В нашата кохорта пациенти се установява по-ниска честота за минорния алел на фактор XIII *34L* от 11.1% спрямо 21.9% популационна честота в света и 25.2% в Европа. Прави впечатление, че в групата със ССЗ неговата честота е дори по-ниска (7.5%), което предполага евентуалната протективна роля на този генетичен вариант. Метаанализ на Wells et al. разкрива, че мутацията *V34L* играе протективна роля срещу венозен тромбемболизъм, умерено намалява риска от МИ и КАБ [79]. От друга страна се счита, че полиморфизмът *4G/4G* на PAI-1 също се счита, че намалява протективния ефект на *V34L* [80].

Резултатите от генотипирането на *HPA1* на гликопротеин GP IIb/IIIa разкриват, че установената от нас алелна честота от 12.5% е аналогична на популационната честота от 12.1% в света (15.2% в Европа). Известно е, че инхибиторите на GP IIb/IIIa се използват за намаляване риска от формиране на кръвни съсиреци при пациенти с риск от КАБ или инсулт. При дефекти в гликопротеин GP IIb/IIIa има риск от развитие на коагулопатията тромбастения на Glanzmann, която се характеризира с нарушена тромбоцитна агрегация и повишен риск от кървене [74]. Установено е, че полиморфизмът *HPA-1* на GPIIb/IIIa се асоциира с развитието на АХ при пациенти с терминална бъбречна недостатъчност [75].

Установената от нас алелна честота за *MTHFR 677T* от 25% е малко по-ниска от популационната – 31% в света и 32% в Европа; алелната честота за *MTHFR 1298C* в нашето проучване от 38.9% е по-висока от популационната – 29% в света и 32% в Европа. Известно е, че *C677T* полиморфизмът е свързан с повишен риск от развитие на ССЗ. Мутацията води до хиперхомоцистеинемия, което е рисков фактор за атеросклероза [57]. От друга страна има данни, че мутации в гени, кодиращи FVL и MTHFR може да имат принос за развитието на дълбока венозна тромбоза – състояние, което се дължи на повишена съсирваемост и може да бъде вродено или придобито. Проучване изследва честотата на FVL, *MTHFR C677T* и *MTHFR A1298C* генни полиморфизми при пациенти с това заболяване. Резултатите установяват *MTHFR A1298C* полиморфизма в 77% от случаите, *MTHFR C677T* при 67% и FVL при 17% от пациентите [58].

Честотата на хомозиготи по патологичния алел *ACE D/D* от 36.1% в нашето проучване е по-висока от популационната честота от 25% в Европа. Генетичният полиморфизъм на гена за *ACE* взема участие в патогенезата на атеросклерозата [26]. Различни проучвания съобщават, че *DD* генотипът на *ACE* е свързан с по-високата му активност и увеличен риск от левокамерна хипертрофия, АХ и КАБ [82].

Мутацията за *apoB* не беше установена в нито един от изследваните пациенти, а популационната му честота е 1 на 5000. По отношение на *apoE* честотата на носителство на рисковия алел *E4* от 13.9% в нашето проучване е напълно съпоставима с популационната – 13.8% в света и 16.1% в Европа. *ApoB 100* е отговорен за усвояването на *LDL* в черния дроб [83]. При генетичен дефект в *apoB 100* повишено количество *LDL* се натрупва в плазмата, което води до хиперхолестеролемия и преждевременна атеросклероза [84]. От друга страна пациенти, които нямат *apoE*, акумулират липопротеинови останки. В атеросклеротичните лезии липопротеините съдържат *apoE* и *apoB 100*. Липопротеиновите останки с *apoE* стимулират натрупването на холестеролови естери в макрофагите [85]. В лезиите повечето от *apoE* молекулите се синтезират локално от макрофагите [86].

## **5.2. Роля на експресионните нива на miRNA като серумни биомаркери за сърдечно-съдови усложнения при ЗД тип 2**

В нашето проучване бяха анализирани следните *miRNA*: *miRNA-16*, *miRNA-155-3p*, *miRNA-155-5p*, *miRNA-210*, *miRNA-221* и *miRNA-424* при пациенти със ЗД със *CC3* (таргетна група) и без *CC3* (контролна група). Сравнителният анализ на експресията показва статистически значимо повишаване на експресията на всички тези *miRNA* в таргетната група в сравнение с контролната. Най-голямо увеличаване в експресията в групата на пациентите със *CC3* се наблюдава за *miRNA-424* със средно *RQ* 10,5, следвано от *miRNA-221* с *RQ* 7,5, *miRNA-210* с *RQ* 6,2 и *miRNA-155-5p* с *RQ* 5,1. Най-малко увеличаване в експресията имаше за *miRNA-16* и *miRNA-155-3p* – съответно 2,2 и 2,5 пъти.

В големи кохортни проучвания е доказано, че *miRNA* биха могли да се използват като потенциални прогностични маркери за развитие на КАБ, включително и при хора с диабет. Полиморфизъм на *miRNA-451* например се асоциира с по-висока честота на увеличена кръвна захар на гладно, с развитие на ЗД тип 2, а също с по-лоша преживяемост при КАБ

[184]. Motawae et al. доказват, че miRNA-9 и miRNA-370 са много по-силно експресирани при пациенти с КАБ и ЗД тип 2 в сравнение с такива, които имат само ЗД или само КАБ [185]. Zampetaki et al. установяват, че miRNA-126 е силен прогностичен фактор за развитие на МИ. При пациенти със ЗД тип 2 и КАБ са налице по-ниски нива на експресия на miRNA-126 в циркулиращи ендотелни клетки [186]. Други проучвания също установяват, че различни miRNA са променени при ЗД и при ССЗ. Добрият гликемичен контрол намалява някои от симптомите при диабета, но е известно, че дори и след оптимизирането на нивата на кръвната захар диабетната кардиомиопатия прогресира. Дори след подобряване на контрола на ЗД при мишки с диабет дисрегулацията на miRNA, които участват в метаболитни пътища от миокардната увреда (дисрегулирани miRNA-221, miRNA-146a, miRNA-34a, miRNA-210, miRNA-19b, miRNA-27a, miRNA-155), персистират [187]. Nielsen et al. установяват, че веднага след физическо натоварване няколко miRNA, включително miRNA-16 и miRNA-221, сигнификантно се понижават в циркулацията [188]. Данните предполагат, че това е от особено важно значение за отговора на сърцето към физиологичния стрес по време на натоварване. Ikitimur et al. откриват връзката между експресията на miRNA и параметри от електрокардиограмата, свързани с LVMI при пациенти с хронична СН. Резултатите сочат, че 29 miRNA са променени при хронична СН. Измежду тях miRNA-155 показва директна корелация с LVMI [187]. Доказано е, че при подобряване на СН се понижават нивата на miRNA-210, miRNA-126 и miRNA-423.

MiRNA-16 играе важна роля в контрола на ангиогенезата и съдовия интегритет, а също така е и свързана с оцеляването, запазването и формирането на нови капилляри [192]. Установено е, че VEGF е таргет на miRNA-16 в ендотелните клетки. Chamorro et al. са демонстрирали, че miRNA-16 инхибира ендотелната функция и ангиогенезата чрез модулиране на експресията на VEGF [193]. Fernandes et al. наблюдават промени в експресията на miRNA-16 при мишки със затлъстяване и нарушение в глюкозния толеранс – има увеличение в експресията ѝ в сърцето и същевременно намаляване в експресията на VEGF [194]. Установено е, че нивата на miRNA-16 са повишени в серума и в проангиогенни клетки на пациенти със ЗД с критична исхемия на крайниците [195].

Съществуват данни, че miRNA-155 играе важна роля в процесите на хематопоеичната диференциация, имунитетът, възпалението, съдовото ремоделиране, като по този начин се

свързва с различни ССЗ [196]. Проучване демонстрира, че miRNA-155 е специфично експресирана в атеросклеротични плаки и проинфламаторни макрофаги, и стимулира развитието на атеросклероза [197]. От друга страна обаче Yao et al. установяват, че експресията ѝ е намалена при пациенти с остър коронарен синдром [198]. При хора с ранна коронарна атеросклероза miRNA-155 е с потисната експресия в плаките [199]. Като цяло може да се заключи, че тези разнопосочни резултати за miRNA-155 в патофизиологията на атеросклерозата показват комплексността на тази мултифункционална молекула в регулацията на сърдечно-съдовото моделиране. Евентуалните причини за това биха могли да са свързани с различните патологични стадии на това състояние. Установено е, че експресията на miRNA-155 е повишена при СН. В голямо проучване на miRNA от проби от лява камера при мишки със стрептозотоцин-индуциран диабет се открива, че miRNA-155 остава сигнификантно променена в сърдечните тъкани дори след възстановяване на нормалните нива на гликемията [200]. Дефицитът на miRNA-155 би могъл да предотврати развитието на сърдечна фиброза вследствие на ЗД при мишки и да намали синтеза на колаген, провокиран от високите нива на глюкоза във фибробластите на кардиомиоцитите [201].

Проучвания, които използват човешки ендотелни клетки от умбиликалната вена (HUVEC), посочват, че miRNA-221 регулира ангиогенезата в отговор на стволово-клетъчни фактори (SCF) вероятно чрез потискане на клетъчното оцеляване, миграцията и съдовото формиране, а също така взема участие и при диабет-индуцираната ендотелна дисфункция [202]. Въпреки че все още не е ясно дали експресията на miRNA-221e променена по време на физиологичния процес на формиране на капилярите в отговор на SCF, е установено, че модулирането ѝ е потенциален път за терапевтично повлияване на ангиогенезата. Пациенти с хронично артериално заболяване имат увеличени нива на miRNA-221в ендотелните прогениторни клетки и това води до тяхната мобилизация [203]. Връзката между miRNA-221 и сърдечно-съдовата система е известна. Експресионните ѝ нива са измерени в серумни проби от пациенти с инсулт и така тя става нов биомаркер за това заболяване [204]. Циркулиращите ѝ нива са завишени при хора след остър МИ [205]. От друга страна обаче те са понижени при пациенти със СН и тежка сърдечна фиброза. Това предполага, че miRNA-221 играе важна роля в регулирането на клетъчното оцеляване при пациенти със ССЗ [206].

Експресията на miRNA-210 се повишава в условията на хипоксия, а е установено, че притежава проангиогенни свойства *in vitro* [207]. Свърхекспресията ѝ в ендотелните клетки води до ускорено съдово формиране при нормални условия. Проучванията потвърждават, че miRNA-210 участва в регулацията на хипоксия-индуцирания клетъчен отговор. Експресията ѝ се повишава в условия на исхемия като МИ и СН при пациенти със ЗД [208, 209]. Съществуват данни, че нивата на miRNA-210 са позитивно свързани със степента на СН по класификацията на NYHA [189]. Промени в експресията на miRNA-210 често са наблюдавани в периферна кръв или увредени тъкани на пациенти със ССЗ, включително атеросклероза, остър коронарен синдром, сърдечно клапно заболяване, белодробна артериална хипертония и СН [210]. В някои клинични проучвания са установени повишени нива на miRNA-210 в плазма и урина на младежи със ЗД тип 1 [211]. Amir et al. изследват експресията на miRNA-210 и miRNA-126 при хора със ЗД тип 2 с или без КАБ и откриват, че и в двете групи експресията на miRNA-210 е повишена. От двете групи обаче пациентите с КАБ имат по-изразена промяна в нивото на miRNA-210 в сравнение с тези само със ЗД. От друга страна обаче нивото на miRNA-126 при ЗД е намалено в сравнение със здрави контроли, а пациентите с КАБ имат по-ниска експресия в сравнение с онези без. В резултат може да е заключено, че miRNA-210 и miRNA-126 са епигенетични биомаркери за ЗД тип 2 със съдови усложнения, особено КАБ [212].

Проведено е проспективно проучване с 10-годишно проследяване, при което са идентифицирани множество циркулиращи miRNA (включително и miRNA-424-5p), които предсказват развитие на бъдещ фатален МИ при здрави участници. Sayed et al. предполагат, че miRNA-149, miRNA-424 и miRNA-765 биха могли да се използват като нови индикатори за диагнозата на КАБ [208]. Известно е, че miRNA-424 стимулира ангиогенезата при хипоксия [213]. Експресията ѝ е увеличена при компенсаторно уголемяване на сърцето в резултат от прогресията на СН в хроничната ѝ фаза. По този начин miRNA-424 би могло да бъде полезен индикатор за мониториране на напредването на СН, но е неподходяща за предсказване на риска от настъпване на внезапна сърдечна смърт [214].

### 5.3. Експресия на съдово-ендотелни маркери в периферна кръв при пациенти със ЗД тип 2

Генно-експресионният анализ на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв, извършен при пациенти със ЗД тип 2 и контроли, показва средни относителни нива от 1.77 за този маркер при пациентите в сравнение с контролите, без да има статистически значима разлика. Средните относителни нива на експресия на маркера за хемопоеични стволови клетки *VEGFR1* бяха 0.59 и показаха статистически значимо намаление спрямо контролите -  $p < 0.01$ . При разглеждане на подгрупите с различна давност на ЗД се установиха средни относителни нива на експресия за *VEGFR2* в клетки от периферна кръв съответно 1.09 при новодиагностициран диабет, 2.36 при пациенти под 5 годишна давност и 2.80 при пациенти с над 5-годишна давност на ЗД. По отношение на експресията на *VEGFR1* установените нива бяха 0.69, 0.49 и 0.59, съответно. Сравнението на експресията на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв на пациенти без ДПП и такива с наличие на това усложнение показва статистически значимо намаление на експресията ( $p < 0.05$ ) при пациенти с полиневропатия в сравнение с пациенти без – 0.33 срещу 2.18. Експресията на *VEGFR1* не показва статистически значима разлика в двете групи – 0.72 срещу 0.56.

Установено е, че VEGF се свързва към няколко рецептора. Както е известно, VEGFR1 е необходим за набирането на хематопоетични стволови клетки и за мигрирането на моноцитите и макрофагите; VEGFR2 регулира съдовата ендотелна функция; VEGFR3 участва в активността на ендотела на лимфните съдове [248]. VEGFR2 медира почти всички известни клетъчни отговори към VEGF. Функцията на VEGFR1 е по-малко известна, въпреки че се счита, че модулира сигнализирането на VEGFR2 [249]. Установено е, че физиологични нива на VEGF стимулират пролиферацията на ендотелни клетки чрез VEGFR2, а също така и активацията на eNOS за образуването на азотен оксид чрез VEGFR1 [215]. Образуването на VEGF-A може да се стимулира в клетки, при които има недостиг на кислород. В този случай клетките образуват HIF, който стимулира освобождаването на VEGF-A. Циркулиращият VEGF-A след това се свързва към рецепторите си върху ендотелните клетки, което стартира процеса на ангиогенеза [248]. При диабетните микросъдови усложнения се наблюдава аберантна ангиогенеза, която се характеризира с локална експресия на индуцирания от хипоксията VEGF, намаляване на нивата на азотен

оксид, оксидативен стрес, повишен съдов пермеабилитет и възпаление. VEGF провокира абнормна пролиферация на ендотелните клетки чрез VEGFR-2 [215]. Различни проучвания установяват, че EPC експресират VEGFR-2 и неговото активиране регулира клетъчната пролиферация [250].

Съществуват данни, че експресията на ангиогенните фактори VEGF и HIF-1 $\alpha$  е намалена в сърцето на пациенти с диабет при остър коронарен синдром и че големината на МИ при плъхове е увеличена поради намалена експресия на HIF-1 $\alpha$  [253]. Поради тази причина по-слабото формиране на колатерали при ЗД може да води до по-слаба стимулация на костния мозък от исхемичната тъкан. Наскоро е установено, че мобилизирането на EPC от костния мозък след исхемия е нарушено при плъхове с диабет. Невъзможността за мобилизацията на EPC се свързва с down-регулация на HIF-1 $\alpha$  и по-слабо освобождаване на костно-мозъчни стимулиращи фактори като VEGF и SDF-1, което от своя страна води до недостатъчна компенсаторна ангиогенеза [254].

Както е известно, често усложнение на ЗД, което засяга голяма част от пациентите, е ДПНП. Загубата на сетивност в долните крайници може да доведе до наранявания, придружени от разязавявания (често в резултат и на влошеното кръвоснабдяване), които в краен случай да прогресират до ампутация. В експериментални условия бе установено, че ДПНП се характеризира с нарушена микроциркулация в периферните нерви, причинена от засягането на невралните съдове. EPC могат да бъдат кандидат за лечението на това усложнение, тъй като те притежават паракринни свойства, които имат както ангиогенни, така и невротрофични ефекти [265]. Установено е, че пациенти със ЗД и периферна артериална болест имат намалени нива на циркуиращи EPC особено при наличието и на исхемични лезии. EPC в този случай са с нарушена пролиферация и адхезия към зрелия ендотел [266].

Увреждането на ендотелните клетки настъпва рано в хода на ХБЗ, но възстановяването им е нарушено поради дефекта на EPC при ЗД. Пациентите с ХБЗ имат доказано количествени и качествени изменения в EPC [267]. Като цяло механизмите са неизвестни, но се предполага, че вероятно уремичните токсини вземат участие, понеже хемодиализата и бъбречната трансплантация са в състояние да възстановят ендегенния пул на EPC [268]. Установено е, че връзката между бъбречната функция и EPC е доста по-комплексна, понеже еритропоетинът се явява преобладаващ регулатор за мобилизацията и диференциацията на

ЕРС [269]. Връзката кислород – еритропоетин, която зависи от HIF-1 $\alpha$ , е с нарушена регулация при ЗД. Мобилизирането на ЕРС при диабет не е изправно поради down-регулация на HIF-1 $\alpha$  [254]. Makino et al. докладват за негативна корелация между броя на ЕРС и албинурията при ЗД [270].

Yoon et al. демонстрират, че диабетната кардиомиопатия при плъхове се характеризира с ранно и прогресивно намаляване на експресията на VEGF в миокарда, което води до намаляване в гъстотата на капилярната мрежа, повишена фиброза и нарушен контрактилитет. Нивата на ЕРС са били намалени. Възстановяването на миокардната експресия на VEGF повишава циркулиращите ЕРС и води до подобряване в миокардната микроциркулация [271].

#### **5.4. Ефекти на кетогенната диета и на витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром**

Нашето проучване установи, че кетогенната диета намалява експресията на гените *Ins 1*, *GCK*, *ABCC8* и *KCNJ11*; прилагането на витамин D заедно с кетодиета повишава транскрипционните нива на инсулиновия ген около 3 пъти, без да се достига стойността на контролите; витамин D сигнификантно увеличава транскрипционните нива на инсулиновия ген в панкреас на мишки. Генно-експресионният анализ на инсулиновия ген установи намаляване в експресията му в групата на кетогенна диета – RQ = 0,24, в сравнение с контролната група. В групата, суплементирана едновременно с витамин D и приемаща кетодиета, се наблюдава по-висока експресия на гена (RQ = 0,73) спрямо групата само на кетогенна диета, но не достигаща тази при контролите. Резултатите от групата само с витамин D показват статистически значимо увеличаване на експресията на инсулиновия ген спрямо контролната (RQ = 8,9, p = 0,02). Резултатите ни от нивата на инсулина в серума изглежда корелират с генетичните. Установи се също така в нашето проучване, че приемът само на витамин D води до значително повишаване на експресията на гените *Ins1*, *GCK* и *KCNJ11* в панкреаса на третираните мишки спрямо контролите. Проучвания доказват, че биоактивната форма на витамин D може да индуцира секреция на инсулин чрез директно свързване на VDR-RXR комплекс с VDRE (витамин D респондери елементи),

идентифицирани преди това в промотора на инсулиновия ген в панкреатичните  $\beta$ -клетки [309]. В съответствие с това откритие, съществуват данни, че мишките с липса на функционални VDR показват нарушена секреция на инсулин след стимулация с глюкоза. Забележително е, че VDRE може да стимулират не само транскрипцията на инсулиновия ген, но и много други гени, които участват в организацията на цитоскелета, клетъчния растеж, диференциацията и оцеляването на  $\beta$ -клетките на панкреаса [310]. Установено е, че мишки с мутация на VDR имат нарушена инсулинова секреция в сравнение със здрави [291]. Jayanarayanan et al. доказват, че суплементацията с витамин D увеличава нивата на инсулина чрез регулиране на променната експресия на рецепторите IP3 и АМРА в панкреасни острови на плъхове с индуциран със стрептозотоцин диабет. Добавянето на витамин D възстановява промяната в експресията на VDR, плътността на АМРА рецептора и експресията на IP3 и АМРА – рецепторите в панкреасните острови и така се възстановява калций-медираната инсулинова секреция [311]. Bornstedt et al. доказват, че метаболити на витамин D повлияват панкреасните  $\beta$ -клетки и глюкозо-стимулираната инсулинова секреция чрез промяна в експресията на гени, които участват във функционирането и жизнеспособността на  $\beta$ -клетките [312]. От друга страна е доказано, че витамин D регулира експресията на гена за инсулиновия рецептор [313]. Има данни, че диета, която е и бедна на въглехидрати, каквато е кетодиетата, често се прилага за контрол на симптомите на ЗД тип 2 при хора [332]. Към момента не е известно дали ефектът на тази диета върху глюкозната хомеостаза е резултат от редуцията на телло или от рестрикцията на въглехидратите с храната. Kinzig et al. провеждат проучване, което доказва, че консумирането на нисковъглехидратна кетодиета от гризачи води до потискане нивата на инсулина и глюкозата, което се наблюдава и при прием на диета с нисък гликемичен индекс от хора [333]. Скорошни проучвания при мишки установяват, че кетодиетата подобряват инсулиновата чувствителност в целия организъм, редуцират инсулиновите нива на гладно въпреки увеличаването на чернодробната стеатоза [334]. Съществуват проучвания обаче, които показват, че приемът на кетодиета води до нарушен глюкозен толеранс. Освен това, консумацията на високо въглехидратно хранене при плъхове, които преди това са били на кетодиета, води до значително по-високи нива на инсулин и глюкоза за продължителен период от време, в сравнение с контролите. Отговорът към инсулин е увеличен при плъхове на кетодиета. Връщането към обикновена диета бързо възстановява ефектите на кетодиетата

върху инсулиновата чувствителност и глюкозния толеранс. Тези данни предполагат, че поддържането на кетодиета влияе отрицателно върху хомеостазата на глюкозата, ефект, който бързо се възстановява след прекратяване на диетата [333].

По отношение на телесното тегло с времето животните във всяка от групите статистически значимо повишаваше теглото си ( $p < 0.001$ ). В сравнение с контролната група и трите третирани експериментални групи обаче показаха значително по-ниско тегло след първия месец ( $p < 0.001$ ). Глюкозата в серума не се различаваше статистически значимо между групите ( $p = 0.143$ ). Кетотелата, както се очакваше, бяха статистически значимо повишени в групата на кетодиета ( $p < 0.5$ ). Едновременното суплементиране с витамин D обаче статистически значимо понижава кетонемията. Нивата на общия холестерол в кръвта не се различава статистически значимо между групите ( $p > 0.05$ ). Триглицеридемията в трите третирани групи показва тенденция към по-ниски стойности в сравнение с контролната група ( $p = 0.08$ ). HDAC показва по-ниски стойности в групите, третирани с кетодиета, със или без суплементиране с витамин D ( $p < 0.01$ ). Очаквано, нивата на 25OHD в серума на животните, допълнително суплементирани с витамин D, бяха статистически значимо по-високи от тези на несуплементираните ( $p < 0.05$ ). Като цяло данните сочат, че суплементацията с витамин D предизвиква редукция на тегло при дефицит. Нееднозначни обаче са резултатите по отношение на показателите за въглехидратния и липидния метаболизъм. Seldeen et al. откриват, че по-малкото добавяне на холекалциферол както при слаби, така и при затлъстели мишки, значително и устойчиво намалява серумните концентрации на 25OHD. Интересното е, че затлъстяването забавя темповете на спад. По време на проучването недостатъчността на витамин D впоследствие не корелира с по-висок ИТМ, въпреки че слабите мишки с по-висока добавка консумират повече калории без видимо увеличение на ИТМ [314]. Mason et al. проследяват за 12 месеца постменопаузални жени, които са включени в програма за редуциране на теглото, като част от тях приемат и витамин D. В края на проследяването се открива, че жените, които са били суплементирани и нивото на витамин D е било достатъчно, са постигнали по-голямо отслабване и загуба на мазнини в сравнение с онези, които са били на плацебо [315]. Khosravi et al. доказват, че суплементацията с витамин D води до сигнификантна редукция на телесното тегло, но от друга страна не се достига значимост по отношение на общия холестерол, ТГ, LDL и КЗГ [316]. Друго проучване обаче показва, че суплементацията с витамин D води до намаляване в нивата на НОМА индекса,

а също и на LDL холестерола [317]. Yang et al. съобщават за по-високи нива на холестерол, триглицериди и глюкоза при лица с дефицит на витамин D в сравнение с тези без дефицит [318]. Branco et al. са установили по-високи нива на ТГ при пациенти с хиповитаминоза D [319]. Major et al. проследяват жени с наднормено тегло или затлъстяване за 15 седмици, като част от тях суплементират с 400 IU дневно витамин D и калций, а останалите получават плацебо. В края на този период тези, които са получавали калций с витамин D, показват по-изразено намаляване в нивата на LDL [320]. От друга страна, Yuan et al. установяват, че кетодиетата води до намаляване в нивата на КЗГ, триглицеридите и общия холестерол, а също и на телесното тегло [335]. Kennedy et al. провеждат опит, в който разделят мишки на четири групи – хранени с кетогенна диета, високомазнинна и с високо съдържание на сукроза, такива, подложени на калорийна рестрикция, и контролна група. Теглото на мишките, които са били на кетогенна диета и са приемали същото количество калории като тези в контролната група и тези които са били на високомазнинна диета, са постигнали редукция на теглото – 85% от изходното, също както и контролите. Животните, които са били на високомазнинната диета и впоследствие са преминали на кетодиета, са успели да редуцират наддаденото тегло, а също се е подобрил и глюкозният им толеранс [334]. Друго проучване категорично показва, че мишки, хранени с кетогенна диета, драстично са редуцирали тегло въпреки че са приемали повече калории [336]. Goday et al. сравняват пациенти със ЗД тип 2, като едната група са били подложени на кетогенна диета, а другата – на нискокалориен режим. Резултатите показват статистически значимо намаляване на телесното тегло в групата на кетодиета, а също така и на нивото на HbA1c [337]. Dashti et al. проследяват пациенти с диабет и затлъстяване, които са били подложени на кетогенна диета. В края на периода се открива значимо намаляване в телесното тегло, кръвната захар, общия холестерол, LDL, ТГ, а нивото на HDL се е увеличило [338]. Друго проучване показва сходни резултати – след кетодиета се наблюдава намаляване на телесното тегло, кръвната захар, подобряване на инсулиновата чувствителност, редукция на холестерола и ТГ [325]. От друга страна обаче, Gumbiner et al. не установяват промяна в телесното тегло и нивата на инсулина на гладно и в хода на ОГТТ след кетогенна диета [339]. По отношение на епигенетичното регулиране е доказано, че кетотелата, в частност  $\beta$ -хидроксibuтиратът, намаляват активността на HDAC. Счита се, че  $\beta$ -хидроксibuтиратът е и директен епигенетичен регулатор като се свързва към хистоните и по този начин регулира генната

експресия [340, 341]. Проучване установява, че кетогенната диета предизвиква промяна в експресията на гени, свързани с глюкозния и липидния метаболизъм. Четири седмици на кетодиета води до намаляване експресията на гени, участващи в глюкозния метаболизъм в сърцето и скелетните мускули. 12 седмици на този начин на хранене е предизвикало повишена експресия на гени, които вземат участие в усвояването на мастни киселини от клетките и окислението им. Интересно е, че тези ефекти са се увеличавали при физическо натоварване [342]. Едно проучване изследва панкреасната експресия на гени, свързани с глюкозната хомеостаза след третиране на панкреатични клетки с кетонни тела, и установява намаляване на експресията на GLUT1 и лактат дехидрогеназа А, без данни за инсулиновата експресия [343]. В друго проучване се съобщава за редуциране на  $\alpha$ - и  $\beta$ -клетъчната маса в панкреаса след дългосрочна кетодиета, което би могло да има отношение към наблюдаваната редукция в инсулиновата експресия [344].

## ГЛАВА ШЕСТА

### ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати биха могли да се направят следните изводи:

1. По отношение на факторите, свързани с вродени тромбофилии, се установи за повечето от тях по-висока честота от популационната, без да се достига статистическа значимост. Най-висока е честотата на носителство на PAI-1 варианта 4G при пациентите със ЗД тип 2. Честотата на FXIII полиморфизма е по-ниска от популационната му честота, което е в съответствие с данните за протективната роля на този полиморфизъм. При сравняване на честотите в групите със и без ССЗ, само вариантите в PAI-1 и фибриноген показват по-висока честота в групата със ССЗ, като статистическа значимост се достига за  $\beta$ -фибриноген – 455 G/A генотипа. По отношение резултатите от генотипирането на MTHFR, ACE, ApoB, ApoE - не се установява статистически значима разлика в алелните и генотипните честоти на представените по-горе изследвани генетични варианти между изследваните групи пациенти с диабет със и без ССЗ.
2. При анализирането на следните miRNA: miRNA-16, miRNA-155-3p, miRNA-155-5p, miRNA-210, miRNA-221 и miRNA-424 при пациенти със ЗД със ССЗ (таргетна група) и без ССЗ (контролна група) сравнителният анализ на експресията показва статистически значимо повишаване на експресията на всички тези miRNA в таргетната група в сравнение с контролната като най-голямо увеличаване в експресията в тази група се наблюдава за miRNA-424 със средно RQ 10,5, следвано от miRNA-221 с RQ 7,5, miRNA-210 с RQ 6,2 и miRNA-155-5p с RQ 5,1. Най-малко увеличаване в експресията имаше за miRNA-16 и miRNA-155-3p – съответно 2,2 и 2,5 пъти.
3. Сравнението на експресията на *VEGFR2* в клетки от периферна кръв на пациенти със ЗД без ДПП и такива с наличие на това усложнение показва статистически значимо намаление на експресията ( $p < 0.05$ ) при пациенти с полиневропатия в сравнение с пациенти без това усложнение. Установи се статистически значимо намаление на експресията на *VEGFR1* при пациенти със ЗД тип 2 в сравнение с контроли ( $p < 0.01$ ).

4. Генно-експресионният анализ на инсулиновия ген установи намаляване в експресията му в групата на кетогенна диета около 4 пъти –  $RQ = 0,24$ , в сравнение с контролната група. В групата, суплементирана едновременно с витамин D и приемаща кетодиета, се наблюдава по-висока експресия на гена ( $RQ = 0,73$ ) спрямо групата само на кетогенна диета, но не достигаща тази при контролите. Кетогенната диета намалява също така експресията на гените *GCK*, *ABCC8* и *KCNJ11*. HDAC показва по-ниски стойности в групите, третирани с кетодиета, със или без суплементиране с витамин D.
5. Резултатите от групата само с витамин D суплементиране показват статистически значимо увеличаване на експресията на инсулиновия ген спрямо контролната. Приемът само на витамин D доведе до значително повишаване на експресията на гените *GCK* и *KCNJ11* в панкреаса на третираните мишки спрямо контролите. По отношение на теглото, с времето животните във всяка от групите (на кетодиета, суплементирани с витамин D, едновременно подложени на кетодиета и приемачи витамин D, и контроли) статистически значимо повишаваше теглото си ( $p < 0.001$ ). В сравнение с контролната група и трите третирани експериментални групи показаха значително по-ниско тегло след първия месец ( $p < 0.001$ ). Глюкозата в серума не се различава статистически значимо между групите. Кетотелата бяха статистически значимо повишени в групата на кетодиета. Едновременното суплементиране с витамин D обаче показва статистически значимо понижаване на кетонемията. Нивата на общия холестерол в кръвта не се различава статистически значимо между групите. Триглицеридемията в трите третирани групи показва тенденция към по-ниски стойности в сравнение с контролната група. Очаквано, нивата на 25ОНD в серума на животните, допълнително суплементирани с витамин D, бяха статистически значимо по-високи от тези на несуплементираните. Във връзка с резултатите от инсулина в серума се установи, че те корелират с генетичните.

## ГЛАВА СЕДМА

### ПРИНОСИ

1. Проведе се проучване за асоциация на някои генетични варианти, свързани с повишен сърдечно-съдов риск, при пациенти със захарен диабет тип 2 като се дискутира ролята на  $\beta$ -фибриногена като проинфламаторен белтък в развитието на ЗД тип 2 и неговите усложнения.
2. За първи път в България се изследва експресията на miRNA в плазма от пациенти със ЗД тип 2 и се оценява тяхното експресионно ниво спрямо сърдечно-съдовия статус на дпацентите със ЗД.
3. За първи път в България се изследва експресията на *VEGFR2* и *VEGFR1* в клетки от периферна кръв чрез PCR в реално време с използването на относителния метод за сравнение между пациенти със ЗД тип 2 и контроли, а също така и се оценява тяхното експресионно ниво в зависимост от наличието на усложнения от заболяването при пациентите – в случая - ДПНП.
4. За първи път в България се изследват ефектите на кетогенната диета и на суплементацията с витамин D върху панкреасната експресия на гени, свързани с инсулиновата секреция, и върху някои показатели на метаболитния синдром.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Танкова Ц. Захарен диабет: Парадигма; 2013.
2. Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ, Stumvoll M. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes care*. 2001;24(2):382-91.
3. Keller MA, Turchyn AV, Ralser M. Non-enzymatic glycolysis and pentose phosphate pathway-like reactions in a plausible Archean ocean. *Molecular systems biology*. 2014;10:725.
4. Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes care*. 1990;13(3):198-208.
5. Gardner DG, Shoback, D. Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology. 2011(9th edition).
6. Melmed S, Koenig, R., Rosen, C., Auchus, R., Goldfine, A. Williams Textbook of Endocrinology. 2019(14th edition).
7. Hornblad A, Cheddad A, Ahlgren U. An improved protocol for optical projection tomography imaging reveals lobular heterogeneities in pancreatic islet and beta-cell mass distribution. *Islets*. 2011;3(4):204-8.
8. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2005;53(9):1087-97.
9. Liggitt D, Dintzis, S. M. . Comparative anatomy and histology. 2018:241-50.
10. In't Veld P, Marichal M. Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010;654:1-19.
11. de Hoyos-Guevara E. The pancreatic islet system of the mouse (*Mus musculus*). Ultrastructural report of six new cell types. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 1969;101(1):28-62.
12. Soares MB, Schon E, Henderson A, Karathanasis SK, Cate R, Zeitlin S, et al. RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Molecular and cellular biology*. 1985;5(8):2090-103.
13. Wentworth BM, Schaefer IM, Villa-Komaroff L, Chirgwin JM. Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *Journal of molecular evolution*. 1986;23(4):305-12.
14. Babaya N, Nakayama M, Moriyama H, Gianani R, Still T, Miao D, et al. A new model of insulin-deficient diabetes: male NOD mice with a single copy of *Ins1* and no *Ins2*. *Diabetologia*. 2006;49(6):1222-8.
15. Shiao MS, Liao BY, Long M, Yu HT. Adaptive evolution of the insulin two-gene system in mouse. *Genetics*. 2008;178(3):1683-91.
16. Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, et al. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(1):27-37.
17. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1998;15(7):539-53.
18. Воденичаров Ц, Попова, С., Мутафова, М., Шипковенска, Е. Социална медицина: ГорексПрес; 2013.

19. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes research and clinical practice*. 2019;157:107843.
20. IDF. *Diabetes atlas*. 2021(10th edition).
21. Борисова А-М, Шинков, А., Влахов, Й., Даковска Л., Блажева Е., Тодоров, Т. Разпространение на захарния диабет и предиабет в България днес. *Ендокринология*. 2012;4:182-92.
22. Препоръки за добра клинична практика при захарен диабет. Българско дружество по ендокринология. 2019.
23. WHO/IDF. *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia*. 2006.
24. Милева Ж, Нешев, Г., Шинков, А. ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ - ДИАГНОЗА И ТЕРАПИЯ. Арсо. 2020.
25. Гатева А. *Предиабет*. 2020.
26. Durante A, Peretto G, Laricchia A, Ancona F, Spartera M, Mangieri A, et al. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(7):981-1004.
27. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34(1):39-58.
28. Sanz Y, Olivares M, Moya-Perez A, Agostoni C. Understanding the role of gut microbiome in metabolic disease risk. *Pediatric research*. 2015;77(1-2):236-44.
29. Lambeth SM, Carson T, Lowe J, Ramaraj T, Leff JW, Luo L, et al. Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *Journal of diabetes and obesity*. 2015;2(3):1-7.
30. Chambers ES, Preston T, Frost G, Morrison DJ. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Current nutrition reports*. 2018;7(4):198-206.
31. Matheus AS, Tannus LR, Cobas RA, Palma CC, Negrato CA, Gomes MB. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *International journal of hypertension*. 2013;2013:653789.
32. Bulughapitiya U, Siyambalapitiya S, Sithole J, Idris I. Is diabetes a coronary risk equivalent? Systematic review and meta-analysis. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2009;26(2):142-8.
33. Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, Bailey CJ, Ceriello A, Delgado V, et al. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *European heart journal*. 2020;41(2):255-323.
34. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj*. 2000;321(7258):405-12.
35. Khan SS, Butler J, Gheorghide M. Management of comorbid diabetes mellitus and worsening heart failure. *Jama*. 2014;311(23):2379-80.
36. Boonman-de Winter LJ, Rutten FH, Cramer MJ, Landman MJ, Liem AH, Rutten GE, et al. High prevalence of previously unknown heart failure and left ventricular dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2012;55(8):2154-62.

37. Borissova AM, Shinkov A, Kovatcheva R, Vlahov J, Dakovska L, Todorov T. Changes in the prevalence of diabetes mellitus in Bulgaria (2006-2012). *Clinical medicine insights Endocrinology and diabetes*. 2015;8:41-5.
38. Борисова А-М, Шинков, А., Влахов, Й., Даковска, Л., Тодоров, Т. Честота и роля на рисковите фактори за изява на предиабет и диабет в българска популация. *Ендокринология*. 2013;XVIII(4):188-95.
39. European Cardiovascular Disease Statistics. European Heart Network. 2017.
40. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(7):1793-801.
41. Vicenova B, Vopalensky V, Burysek L, Pospisek M. Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases. *Physiological research*. 2009;58(4):481-98.
42. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(5):969-79.
43. Pechlivani N, Ajjan RA. Thrombosis and Vascular Inflammation in Diabetes: Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2018;5:1.
44. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *The New England journal of medicine*. 2010;363(2):166-76.
45. de Moerloose P, Casini A, Neerman-Arbez M. Congenital fibrinogen disorders: an update. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2013;39(6):585-95.
46. Baser H, Can U, Baser S, Hidayetoglu BT, Aslan U, Buyuktorun I, et al. Serum total oxidant/anti-oxidant status, ischemia-modified albumin and oxidized-low density lipoprotein levels in patients with vitamin D deficiency. *Archives of endocrinology and metabolism*. 2015;59(4):318-24.
47. Levenson J, Giral P, Razavian M, Gariepy J, Simon A. Fibrinogen and silent atherosclerosis in subjects with cardiovascular risk factors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995;15(9):1263-8.
48. van Holten TC, Waanders LF, de Groot PG, Vissers J, Hoefler IE, Pasterkamp G, et al. Circulating biomarkers for predicting cardiovascular disease risk; a systematic review and comprehensive overview of meta-analyses. *PloS one*. 2013;8(4):e62080.
49. Weisel JW. Structure of fibrin: impact on clot stability. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5 Suppl 1:116-24.
50. Barazzoni R, Kiwanuka E, Zanetti M, Cristini M, Vettore M, Tessari P. Insulin acutely increases fibrinogen production in individuals with type 2 diabetes but not in individuals without diabetes. *Diabetes*. 2003;52(7):1851-6.
51. Steinbrecher KA, Horowitz NA, Blevins EA, Barney KA, Shaw MA, Harmel-Laws E, et al. Colitis-associated cancer is dependent on the interplay between the hemostatic and inflammatory systems and supported by integrin alpha(M)beta(2) engagement of fibrinogen. *Cancer research*. 2010;70(7):2634-43.
52. Flick MJ, LaJeunesse CM, Talmage KE, Witte DP, Palumbo JS, Pinkerton MD, et al. Fibrin(ogen) exacerbates inflammatory joint disease through a mechanism linked to the integrin alphaMbeta2 binding motif. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(11):3224-35.
53. Ugarova TP, Yakubenko VP. Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;936:368-85.
54. Stegnar M. Disturbances of Haemostasis in Diabetes Mellitus Contributing to the Development of Atherosclerosis. *Ejifcc*. 2002;13(5):205-9.

55. Carter AM, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Beta-fibrinogen gene-455 G/A polymorphism and fibrinogen levels. Risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM. *Diabetes care*. 1996;19(11):1265-8.
56. Lam KS, Ma OC, Wat NM, Chan LC, Janus ED. Beta-fibrinogen gene G/A-455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischaemic heart disease in Chinese patients with type II diabetes. *Diabetologia*. 1999;42(10):1250-3.
57. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European journal of medical genetics*. 2015;58(1):1-10.
58. Ehsani M, Imani A, Moravveji A. Prevalence of factor V leiden, MTHFR C677T and MTHFR A1298C polymorphisms in patients with deep vein thrombosis in Central Iran. *Molecular biology reports*. 2018;45(4):621-4.
59. Demirer AN, Alikasifoglu M, Tuncbilek E, Karakus S, Erbas T. Factor V Leiden mutation and type 1 diabetes mellitus. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2008;19(1):70-4.
60. Krekora K, De Lucia D, Capani F, Donati MB, Iacoviello L. Association of coagulation factor V Arg506Gln mutation with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 1996;348(9042):1666-7.
61. Braun A, Muller B, Rosche AA. Population study of the G1691A mutation (R506Q, FV Leiden) in the human factor V gene that is associated with resistance to activated protein C. *Human genetics*. 1996;97(2):263-4.
62. Lodigiani C, Ferrazzi P, Di Micco P, Libre L, Genovese S, Quaglia I, et al. Is there a relationship between factor V Leiden and type 2 diabetes? *Journal of translational medicine*. 2009;7:52.
63. Vaughan DE. PAI-1 and atherothrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005;3(8):1879-83.
64. Juhan-Vague I, Alessi MC. PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events. *Thrombosis and haemostasis*. 1997;78(1):656-60.
65. Ito S, Iwaki S, Koike K, Yuda Y, Nagasaki A, Ohkawa R, et al. Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese individuals and its capacity to increase the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. *Coronary artery disease*. 2013;24(8):642-50.
66. Gong LL, Peng JH, Han FF, Zhu J, Fang LH, Wang YH, et al. Association of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor polymorphism with myocardial infarction: a meta-analysis. *Thrombosis research*. 2012;130(3):e43-51.
67. Prabhudesai A, Shetty S, Ghosh K, Kulkarni B. Investigation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism in Indian venous thrombosis patients: A case-control study. *European journal of haematology*. 2017;99(3):249-54.
68. Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, et al. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nature medicine*. 1996;2(7):800-3.
69. Belalcazar LM, Ballantyne CM, Lang W, Haffner SM, Rushing J, Schwenke DC, et al. Metabolic factors, adipose tissue, and plasminogen activator inhibitor-1 levels in type 2 diabetes: findings from the look AHEAD study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(7):1689-95.
70. Senchenkova EY, Russell J, Almeida-Paula LD, Harding JW, Granger DN. Angiotensin II-mediated microvascular thrombosis. *Hypertension*. 2010;56(6):1089-95.

71. Pandya V, Jain M, Chakrabarti G, Soni H, Parmar B, Chaugule B, et al. Discovery of inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1: structure-activity study of 5-nitro-2-phenoxybenzoic acid derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2011;21(19):5701-6.
72. Izuhara Y, Yamaoka N, Kodama H, Dan T, Takizawa S, Hirayama N, et al. A novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 provides antithrombotic benefits devoid of bleeding effect in nonhuman primates. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(5):904-12.
73. Vickers JD. Binding of polymerizing fibrin to integrin alpha(IIb)beta(3) on chymotrypsin-treated rabbit platelets decreases phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and increases cytoskeletal actin. *Platelets*. 1999;10(4):228-37.
74. Bellucci S, Caen J. Molecular basis of Glanzmann's Thrombasthenia and current strategies in treatment. *Blood reviews*. 2002;16(3):193-202.
75. Chiras T, Papadakis ED, Katopodi A, Chatzianesti E, Fourtounas K, Papakonstantinou S, et al. Platelet GP IIIA polymorphism HPA-1 (PLA1/2) is associated with hypertension as the primary cause for end-stage renal disease in hemodialysis patients from Greece. *In vivo*. 2009;23(1):177-81.
76. Martinelli I, Bucciarelli P, Mannucci PM. Thrombotic risk factors: basic pathophysiology. *Critical care medicine*. 2010;38(2 Suppl):S3-9.
77. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet*. 2006;367(9511):651-8.
78. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiological reviews*. 2011;91(3):931-72.
79. Wells PS, Anderson JL, Scarvelis DK, Doucette SP, Gagnon F. Factor XIII Val34Leu variant is protective against venous thromboembolism: a HuGE review and meta-analysis. *American journal of epidemiology*. 2006;164(2):101-9.
80. Joksic I, Mikovic Z, Filimonovic D, Munjas J, Karadzov ON, Egic A, et al. Combined presence of coagulation factor XIII V34L and plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G gene polymorphisms significantly contribute to recurrent pregnancy loss in Serbian population. *Journal of medical biochemistry*. 2020;39(2):199-207.
81. Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *International journal of inflammation*. 2014;2014:689360.
82. Hernandez D, de la Rosa A, Barragan A, Barrios Y, Salido E, Torres A, et al. The ACE/DD genotype is associated with the extent of exercise-induced left ventricular growth in endurance athletes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42(3):527-32.
83. Morita SY. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2016;39(1):1-24.
84. Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *Journal of lipid research*. 1990;31(8):1337-49.
85. Perrey S, Ishibashi S, Kitamine T, Osuga J, Yagyu H, Chen Z, et al. The LDL receptor is the major pathway for beta-VLDL uptake by mouse peritoneal macrophages. *Atherosclerosis*. 2001;154(1):51-60.

86. Fazio S, Babaev VR, Murray AB, Hasty AH, Carter KJ, Gleaves LA, et al. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(9):4647-52.
87. Crick FH. On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1958;12:138-63.
88. Zhang X, Ho SM. Epigenetics meets endocrinology. *Journal of molecular endocrinology*. 2011;46(1):R11-32.
89. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007;447(7143):396-8.
90. Jablonka E. Epigenetic epidemiology. *International journal of epidemiology*. 2004;33(5):929-35.
91. Mobbs CV. Glucose-Induced Transcriptional Hysteresis: Role in Obesity, Metabolic Memory, Diabetes, and Aging. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:232.
92. Ngondo RP, Carbon P. Transcription factor abundance controlled by an auto-regulatory mechanism involving a transcription start site switch. *Nucleic acids research*. 2014;42(4):2171-84.
93. Re RN. A proposed mechanism for the Berecek phenomenon with implications for cardiovascular reprogramming. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*. 2018;12(9):644-51.
94. Hsu C, Jaquet V, Gencoglu M, Becskei A. Protein Dimerization Generates Bistability in Positive Feedback Loops. *Cell reports*. 2016;16(5):1204-10.
95. Rosen ED, Kaestner KH, Natarajan R, Patti ME, Sallari R, Sander M, et al. Epigenetics and Epigenomics: Implications for Diabetes and Obesity. *Diabetes*. 2018;67(10):1923-31.
96. Hanly DJ, Esteller M, Berdasco M. Interplay between long non-coding RNAs and epigenetic machinery: emerging targets in cancer? *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2018;373(1748).
97. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*. 2001;294(5543):797-9.
98. Cannell IG, Kong YW, Bushell M. How do microRNAs regulate gene expression? *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 6):1224-31.
99. Wei JW, Huang K, Yang C, Kang CS. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology reports*. 2017;37(1):3-9.
100. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-30.
101. Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2011;157(4):253-64.
102. Arnes L, Sussel L. Epigenetic modifications and long noncoding RNAs influence pancreas development and function. *Trends in genetics : TIG*. 2015;31(6):290-9.
103. Bettin N, Oss Pegorar C, Cusanelli E. The Emerging Roles of TERRA in Telomere Maintenance and Genome Stability. *Cells*. 2019;8(3).
104. Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. 2004;305(5688):1289-92.
105. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *The Journal of pathology*. 2010;220(2):126-39.
106. Yu CY, Kuo HC. The emerging roles and functions of circular RNAs and their generation. *Journal of biomedical science*. 2019;26(1):29.
107. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*. 2011;123(19):2145-56.

108. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS letters*. 2009;583(11):1713-20.
109. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57.
110. Ito S, Kuraoka I. Epigenetic modifications in DNA could mimic oxidative DNA damage: A double-edged sword. *DNA repair*. 2015;32:52-7.
111. Sommese L, Zullo A, Mancini FP, Fabbicini R, Soricelli A, Napoli C. Clinical relevance of epigenetics in the onset and management of type 2 diabetes mellitus. *Epigenetics*. 2017;12(6):401-15.
112. Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei medical journal*. 2009;50(4):455-63.
113. Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC, et al. brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*. 1992;68(3):561-72.
114. Denis GV. Bromodomain coactivators in cancer, obesity, type 2 diabetes, and inflammation. *Discovery medicine*. 2010;10(55):489-99.
115. Escalante-Covarrubias Q, Aguilar-Arnal, L. . Environmental regulation of metabolism through the circadian clock. *Curr Opin Toxicol*. 2018;8:93-101.
116. Berezin A. Epigenetics in heart failure phenotypes. *BBA clinical*. 2016;6:31-7.
117. Pacheco-Bernal I, Becerril-Perez F, Aguilar-Arnal L. Circadian rhythms in the three-dimensional genome: implications of chromatin interactions for cyclic transcription. *Clinical epigenetics*. 2019;11(1):79.
118. Trott AJ, Menet JS. Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1. *PLoS genetics*. 2018;14(1):e1007156.
119. Azzi A, Evans JA, Leise T, Myung J, Takumi T, Davidson AJ, et al. Network Dynamics Mediate Circadian Clock Plasticity. *Neuron*. 2017;93(2):441-50.
120. Oh G, Ebrahimi S, Carlucci M, Zhang A, Nair A, Groot DE, et al. Cytosine modifications exhibit circadian oscillations that are involved in epigenetic diversity and aging. *Nature communications*. 2018;9(1):644.
121. West AC, Bechtold DA. The cost of circadian desynchrony: Evidence, insights and open questions. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2015;37(7):777-88.
122. Holt RI, Barnett AH, Bailey CJ. Bromocriptine: old drug, new formulation and new indication. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2010;12(12):1048-57.
123. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public health nutrition*. 2001;4(2B):611-24.
124. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *The New England journal of medicine*. 1976;295(7):349-53.
125. Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T, Low FM, Beedle AS. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nature reviews Endocrinology*. 2009;5(7):401-8.
126. Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, Ku HT, Al-Abdullah IH, Kandeel F, et al. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PloS one*. 2009;4(9):e6953.
127. Yang BT, Dayeh TA, Kirkpatrick CL, Taneera J, Kumar R, Groop L, et al. Insulin promoter DNA methylation correlates negatively with insulin gene expression and positively with HbA(1c) levels in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2011;54(2):360-7.

128. Nilsson E, Jansson PA, Perfilyev A, Volkov P, Pedersen M, Svensson MK, et al. Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(9):2962-76.
129. Andreeva-Gateva PA, Mihaleva ID, Dimova, II. Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular risk; what the pharmacotherapy can change through the epigenetics. *Postgraduate medicine*. 2019:1-17.
130. Beekman M, Heijmans BT, Martin NG, Pedersen NL, Whitfield JB, DeFaire U, et al. Heritabilities of apolipoprotein and lipid levels in three countries. *Twin research : the official journal of the International Society for Twin Studies*. 2002;5(2):87-97.
131. Sayols-Baixeras S, Irvin MR, Arnett DK, Elosua R, Aslibekyan SW. Epigenetics of Lipid Phenotypes. *Current cardiovascular risk reports*. 2016;10(10).
132. Lim M, Park L, Shin G, Hong H, Kang I, Park Y. Induction of apoptosis of Beta cells of the pancreas by advanced glycation end-products, important mediators of chronic complications of diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1150:311-5.
133. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, et al. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends in immunology*. 2011;32(4):157-64.
134. Berezin AE. Endothelial progenitor cells dysfunction and impaired tissue reparation: The missed link in diabetes mellitus development. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2017;11(3):215-20.
135. Paneni F, Mocharla P, Akhmedov A, Costantino S, Osto E, Volpe M, et al. Gene silencing of the mitochondrial adaptor p66(Shc) suppresses vascular hyperglycemic memory in diabetes. *Circulation research*. 2012;111(3):278-89.
136. Simmons RA. Role of metabolic programming in the pathogenesis of beta-cell failure in postnatal life. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2007;8(2):95-104.
137. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8466-71.
138. Ortega FJ, Moreno M, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Fuentes-Batllevell N, Sabater M, et al. Inflammation triggers specific microRNA profiles in human adipocytes and macrophages and in their supernatants. *Clinical epigenetics*. 2015;7:49.
139. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. *Molecular medicine*. 2008;14(7-8):476-84.
140. Lu B, Antoine DJ, Kwan K, Lundback P, Wahamaa H, Schierbeck H, et al. JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(8):3068-73.
141. Huebener P, Pradere JP, Hernandez C, Gwak GY, Caviglia JM, Mu X, et al. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(2):539-50.
142. Ribel-Madsen R, Fraga MF, Jacobsen S, Bork-Jensen J, Lara E, Calvanese V, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation differences in muscle and fat from monozygotic twins discordant for type 2 diabetes. *PloS one*. 2012;7(12):e51302.
143. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
144. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014;123(18):2768-76.

145. Carubbi F, Alunno A, Gerli R, Giacomelli R. Post-Translational Modifications of Proteins: Novel Insights in the Autoimmune Response in Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2019;8(7).
146. Slack JL, Causey CP, Thompson PR. Protein arginine deiminase 4: a target for an epigenetic cancer therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(4):709-20.
147. Ma YH, Ma TT, Wang C, Wang H, Chang DY, Chen M, et al. High-mobility group box 1 potentiates antineutrophil cytoplasmic antibody-inducing neutrophil extracellular traps formation. *Arthritis research & therapy*. 2016;18:2.
148. Wang L, Zhou X, Yin Y, Mai Y, Wang D, Zhang X. Hyperglycemia Induces Neutrophil Extracellular Traps Formation Through an NADPH Oxidase-Dependent Pathway in Diabetic Retinopathy. *Frontiers in immunology*. 2018;9:3076.
149. Joshi MB, Baipadithaya G, Balakrishnan A, Hegde M, Vohra M, Ahamed R, et al. Elevated homocysteine levels in type 2 diabetes induce constitutive neutrophil extracellular traps. *Scientific reports*. 2016;6:36362.
150. Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, Balcerzyk A, George P, Baker EK, et al. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. *Diabetes*. 2009;58(5):1229-36.
151. Berezin A. Neutrophil extracellular traps: The core player in vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2018.
152. Dos Santos Nunes MK, Silva AS, de Queiroga Evangelista IW, Filho JM, Gomes C, do Nascimento RAF, et al. Hypermethylation in the promoter of the MTHFR gene is associated with diabetic complications and biochemical indicators. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2017;9:84.
153. Huang T, Ren J, Huang J, Li D. Association of homocysteine with type 2 diabetes: a meta-analysis implementing Mendelian randomization approach. *BMC genomics*. 2013;14:867.
154. Patterson S, Flatt PR, Brennan L, Newsholme P, McClenaghan NH. Detrimental actions of metabolic syndrome risk factor, homocysteine, on pancreatic beta-cell glucose metabolism and insulin secretion. *The Journal of endocrinology*. 2006;189(2):301-10.
155. Mishra PK, Tyagi N, Sen U, Joshua IG, Tyagi SC. Synergism in hyperhomocysteinemia and diabetes: role of PPAR gamma and tempol. *Cardiovascular diabetology*. 2010;9:49.
156. Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EE, Ravasco P, Camilo ME, et al. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clinical chemistry*. 2003;49(8):1292-6.
157. Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, Bornfeldt KE. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes*. 2001;50(4):851-60.
158. Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, Condom E, et al. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2014;7(5):692-700.
159. Valencia-Morales Mdel P, Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, et al. The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression. *BMC medical genomics*. 2015;8:7.
160. Pirola L, Balcerzyk A, Tothill RW, Haviv I, Kaspi A, Lunke S, et al. Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. *Genome research*. 2011;21(10):1601-15.
161. Breton CV, Park C, Siegmund K, Gauderman WJ, Whitfield-Maxwell L, Hodis HN, et al. NOS1 methylation and carotid artery intima-media thickness in children. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2014;7(2):116-22.

162. Valente AJ, Yoshida T, Murthy SN, Sakamuri SS, Katsuyama M, Clark RA, et al. Angiotensin II enhances AT1-Nox1 binding and stimulates arterial smooth muscle cell migration and proliferation through AT1, Nox1, and interleukin-18. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;303(3):H282-96.
163. Pons D, de Vries FR, van den Elsen PJ, Heijmans BT, Quax PH, Jukema JW. Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. *European heart journal*. 2009;30(3):266-77.
164. Fang YC, Yeh CH. Role of microRNAs in Vascular Remodeling. *Current molecular medicine*. 2015;15(8):684-96.
165. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation research*. 2010;107(6):810-7.
166. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(30):10513-8.
167. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*. 2010;56(11):1733-41.
168. Jones Buie JN, Goodwin AJ, Cook JA, Halushka PV, Fan H. The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors. *Atherosclerosis*. 2016;254:271-81.
169. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):5003-8.
170. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654-9.
171. Radom-Aizik S, Zaldivar F, Haddad F, Cooper DM. Impact of brief exercise on peripheral blood NK cell gene and microRNA expression in young adults. *Journal of applied physiology*. 2013;114(5):628-36.
172. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2008;54(3):482-90.
173. Mihaleva I, Kyurkchyan, S., Dodova, R., Nikolov, R., Markova, T., Gateva, P., Dimova, I. MiRNA expression analysis emphasized the role of miR-424 in diabetic cardiovascular complications. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 2021.
174. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature reviews Endocrinology*. 2013;9(9):513-21.
175. He Y, Ding Y, Liang B, Lin J, Kim TK, Yu H, et al. A Systematic Study of Dysregulated MicroRNA in Type 2 Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(3).
176. Belgardt BF, Ahmed K, Spranger M, Latreille M, Denzler R, Kondratiuk N, et al. The microRNA-200 family regulates pancreatic beta cell survival in type 2 diabetes. *Nature medicine*. 2015;21(6):619-27.
177. Zhang W, Xie HY, Ding SM, Xing CY, Chen A, Lai MC, et al. CADM1 regulates the G1/S transition and represses tumorigenicity through the Rb-E2F pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2016;15(3):289-96.
178. Yang WM, Jeong HJ, Park SY, Lee W. Saturated fatty acid-induced miR-195 impairs insulin signaling and glycogen metabolism in HepG2 cells. *FEBS letters*. 2014;588(21):3939-46.

179. Nathan G, Kredo-Russo S, Geiger T, Lenz A, Kaspi H, Hornstein E, et al. MiR-375 promotes redifferentiation of adult human beta cells expanded in vitro. *PloS one*. 2015;10(4):e0122108.
180. Plaisance V, Waeber G, Regazzi R, Abderrahmani A. Role of microRNAs in islet beta-cell compensation and failure during diabetes. *Journal of diabetes research*. 2014;2014:618652.
181. Williams MD, Mitchell GM. MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:484696.
182. Mao Y, Mohan R, Zhang S, Tang X. MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes. *Pharmacological research*. 2013;75:37-47.
183. Gallagher IJ, Scheele C, Keller P, Nielsen AR, Remenyi J, Fischer CP, et al. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Genome medicine*. 2010;2(2):9.
184. Li Q, Chen L, Chen D, Wu X, Chen M. Influence of microRNA-related polymorphisms on clinical outcomes in coronary artery disease. *American journal of translational research*. 2015;7(2):393-400.
185. Motawae TM, Ismail MF, Shabayek MI, Seleem MM. MicroRNAs 9 and 370 Association with Biochemical Markers in T2D and CAD Complication of T2D. *PloS one*. 2015;10(5):e0126957.
186. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, Drozdov I, Prokopi M, Renard JM, et al. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(4):290-9.
187. Ikitimur B, Cakmak HA, Coskunpinar E, Barman HA, Vural VA. The relationship between circulating microRNAs and left ventricular mass in symptomatic heart failure patients with systolic dysfunction. *Kardiologia polska*. 2015;73(9):740-6.
188. Nielsen S, Akerstrom T, Rinnov A, Yfanti C, Scheele C, Pedersen BK, et al. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PloS one*. 2014;9(2):e87308.
189. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, Zhang ZG, Freedman JH, Zheng Y, et al. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta pharmacologica Sinica*. 2018;39(7):1073-84.
190. Cheng Y, Tan N, Yang J, Liu X, Cao X, He P, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clinical science*. 2010;119(2):87-95.
191. Liu X, Dong Y, Chen S, Zhang G, Zhang M, Gong Y, et al. Circulating MicroRNA-146a and MicroRNA-21 Predict Left Ventricular Remodeling after ST-Elevation Myocardial Infarction. *Cardiology*. 2015;132(4):233-41.
192. Suarez Y, Sessa WC. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circulation research*. 2009;104(4):442-54.
193. Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LO, Sandhu D, Fernandez-Hernando C, Suarez Y. MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(11):2595-606.
194. Fernandes T, Casaes L, Soci U, Silveira A, Gomes J, Barretti D, et al. Exercise Training Restores the Cardiac MicroRNA-16 Levels Preventing Microvascular Rarefaction in Obese Zucker Rats. *Obesity facts*. 2018;11(1):15-24.
195. Spinetti G, Fortunato O, Caporali A, Shantikumar S, Marchetti M, Meloni M, et al. MicroRNA-15a and microRNA-16 impair human circulating proangiogenic cell functions and are

increased in the proangiogenic cells and serum of patients with critical limb ischemia. *Circulation research*. 2013;112(2):335-46.

196. Cao RY, Li Q, Miao Y, Zhang Y, Yuan W, Fan L, et al. The Emerging Role of MicroRNA-155 in Cardiovascular Diseases. *BioMed research international*. 2016;2016:9869208.

197. Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, Akhtar S, Zhou Z, Koenen RR, et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(11):4190-202.

198. Yao R, Ma Y, Du Y, Liao M, Li H, Liang W, et al. The altered expression of inflammation-related microRNAs with microRNA-155 expression correlates with Th17 differentiation in patients with acute coronary syndrome. *Cellular & molecular immunology*. 2011;8(6):486-95.

199. Hao L, Wang XG, Cheng JD, You SZ, Ma SH, Zhong X, et al. The up-regulation of endothelin-1 and down-regulation of miRNA-125a-5p, -155, and -199a/b-3p in human atherosclerotic coronary artery. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2014;23(4):217-23.

200. Costantino S, Paneni F, Luscher TF, Cosentino F. MicroRNA profiling unveils hyperglycaemic memory in the diabetic heart. *European heart journal*. 2016;37(6):572-6.

201. Zhang D, Cui Y, Li B, Luo X, Li B, Tang Y. miR-155 regulates high glucose-induced cardiac fibrosis via the TGF-beta signaling pathway. *Molecular bioSystems*. 2016;13(1):215-24.

202. Li Y, Song YH, Li F, Yang T, Lu YW, Geng YJ. MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;381(1):81-3.

203. Contu R, Latronico MV, Condorelli G. Circulating microRNAs as potential biomarkers of coronary artery disease: a promise to be fulfilled? *Circulation research*. 2010;107(5):573-4.

204. Coskunpinar E, Cakmak HA, Kalkan AK, Tiryakioglu NO, Erturk M, Ongen Z. Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction. *Gene*. 2016;591(1):90-6.

205. Zhou Y, Richards AM, Wang P. MicroRNA-221 Is Cardioprotective and Anti-fibrotic in a Rat Model of Myocardial Infarction. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2019;17:185-97.

206. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(23):15878-83.

207. Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, Yla-Herttuala S. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS letters*. 2008;582(16):2397-401.

208. Sayed AS, Xia K, Li F, Deng X, Salma U, Li T, et al. The diagnostic value of circulating microRNAs for middle-aged (40-60-year-old) coronary artery disease patients. *Clinics*. 2015;70(4):257-63.

209. Greco S, Fasanaro P, Castelvechio S, D'Alessandra Y, Arcelli D, Di Donato M, et al. MicroRNA dysregulation in diabetic ischemic heart failure patients. *Diabetes*. 2012;61(6):1633-41.

210. Guan Y, Song X, Sun W, Wang Y, Liu B. Effect of Hypoxia-Induced MicroRNA-210 Expression on Cardiovascular Disease and the Underlying Mechanism. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019:4727283.

211. Osipova J, Fischer DC, Dangwal S, Volkmann I, Widera C, Schwarz K, et al. Diabetes-associated microRNAs in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus: a cross-sectional cohort study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(9):E1661-5.

212. Amr KS, Abdelmawgoud H, Ali ZY, Shehata S, Raslan HM. Potential value of circulating microRNA-126 and microRNA-210 as biomarkers for type 2 diabetes with coronary artery disease. *British journal of biomedical science*. 2018;75(2):82-7.
213. Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, Zhang X, Joshi HP, Basi D, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-alpha isoforms and promotes angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(11):4141-54.
214. Kakimoto Y, Tanaka M, Hayashi H, Yokoyama K, Osawa M. Overexpression of miR-221 in sudden death with cardiac hypertrophy patients. *Heliyon*. 2018;4(6):e00639.
215. Yu CG, Zhang N, Yuan SS, Ma Y, Yang LY, Feng YM, et al. Endothelial Progenitor Cells in Diabetic Microvascular Complications: Friends or Foes? *Stem cells international*. 2016;2016:1803989.
216. Pelosi E, Castelli G, Testa U. Endothelial progenitors. *Blood cells, molecules & diseases*. 2014;52(4):186-94.
217. Timmermans F, Plum J, Yoder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(1):87-102.
218. Yoder MC. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(7):a006692.
219. Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, Baesso I, Penno G, Balbarini A, et al. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia*. 2007;50(10):2156-63.
220. Fadini GP, Pagano C, Baesso I, Kotsafti O, Doro D, de Kreutzenberg SV, et al. Reduced endothelial progenitor cells and brachial artery flow-mediated dilation as evidence of endothelial dysfunction in ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. *Acta ophthalmologica*. 2010;88(1):135-41.
221. Mund JA, Estes ML, Yoder MC, Ingram DA, Jr., Case J. Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(4):1045-53.
222. Almici C, Skert C, Verardi R, Di Palma A, Bianchetti A, Neva A, et al. Changes in circulating endothelial cells count could become a valuable tool in the diagnostic definition of acute graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2014;98(7):706-12.
223. Woywodt A, Schroeder M, Mengel M, Schwarz A, Gwinner W, Haller H, et al. Circulating endothelial cells are a novel marker of cyclosporine-induced endothelial damage. *Hypertension*. 2003;41(3 Pt 2):720-3.
224. Farace F, Massard C, Borghi E, Bidart JM, Soria JC. Vascular disrupting therapy-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2007;18(8):1421-2.
225. Goon PK, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD, Lip GY. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thrombosis and haemostasis*. 2006;96(1):45-52.
226. Kraan J, Strijbos MH, Sieuwerts AM, Foekens JA, den Bakker MA, Verhoef C, et al. A new approach for rapid and reliable enumeration of circulating endothelial cells in patients. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012;10(5):931-9.
227. Lachmann R, Lanuti P, Miscia S. OMIP-011: Characterization of circulating endothelial cells (CECs) in peripheral blood. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2012;81(7):549-51.

228. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95(3):952-8.
229. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzadeh MR, et al. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Experimental hematology*. 2007;35(7):1109-18.
230. Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *Jama*. 2002;288(20):2579-88.
231. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS letters*. 2000;477(3):258-62.
232. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature medicine*. 2003;9(11):1370-6.
233. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*. 2000;87(10):840-4.
234. Ding Y, Vaziri ND, Coulson R, Kamanna VS, Roh DD. Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2000;279(1):E11-7.
235. Zhang Y, Luo XY, Wu DH, Xu Y. ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica*. 2015;36(1):71-87.
236. Zhen J, Lu H, Wang XQ, Vaziri ND, Zhou XJ. Upregulation of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression by reactive oxygen species. *American journal of hypertension*. 2008;21(1):28-34.
237. Rosso A, Balsamo A, Gambino R, Dentelli P, Falcioni R, Cassader M, et al. p53 Mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(7):4339-47.
238. Palmer BF, Clegg DJ. Oxygen sensing and metabolic homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;397(1-2):51-8.
239. Cooper ME, Vranes D, Youssef S, Stacker SA, Cox AJ, Rizkalla B, et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes*. 1999;48(11):2229-39.
240. Mecollari V, Nieuwenhuis B, Verhaagen J. A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:328.
241. Seidkhani-Nahal A, Khosravi A, Mirzaei A, Basati G, Abbasi M, Noori-Zadeh A. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in ischemic stroke patients: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2021;42(5):1811-20.
242. Albalawi IA, Mir R, Abu Duhier FM. Genetic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) and Its Association with Disease Progression in Breast Cancer Population of Saudi Arabia. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2020;21(1):139-45.
243. Gupta N, Mansoor S, Sharma A, Sapkal A, Sheth J, Falatoonzadeh P, et al. Diabetic retinopathy and VEGF. *The open ophthalmology journal*. 2013;7:4-10.
244. Liu E, Morimoto M, Kitajima S, Koike T, Yu Y, Shiiki H, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(7):2094-104.

245. Amo Y, Masuzawa M, Hamada Y, Katsuoka K. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor-D in angiosarcoma patients. *The British journal of dermatology*. 2004;150(1):160-1.
246. Young LR, Inoue Y, McCormack FX. Diagnostic potential of serum VEGF-D for lymphangioliomyomatosis. *The New England journal of medicine*. 2008;358(2):199-200.
247. Sant'Anna RT, Eibel B, Markoski MM, Rodrigues CG, de Salles FB, Giusti, II, et al. Gene therapy for refractory angina and cell therapy for heart failure: experience of a Brazilian research group. *Gene therapy*. 2020;27(1-2):40-50.
248. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling*. 2007;19(10):2003-12.
249. Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*. 2000;19(49):5598-605.
250. Liu Y, Liao WJ, Zhu Z, Zeng H, He HQ, Sun XL, et al. Effect of procyanidine on VEGFR-2 expression and transduction pathway in rat endothelial progenitor cells under high glucose conditions. *Genetics and molecular research : GMR*. 2016;15(1).
251. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(9):1449-57.
252. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(9):4748-53.
253. Marfella R, Esposito K, Nappo F, Siniscalchi M, Sasso FC, Portoghese M, et al. Expression of angiogenic factors during acute coronary syndromes in human type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(9):2383-91.
254. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, Albiero M, Baesso I, Cabrelle A, et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia*. 2006;49(12):3075-84.
255. Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Takeuchi K, et al. Effects of treatment for diabetes mellitus on circulating vascular progenitor cells. *Journal of pharmacological sciences*. 2006;102(1):96-102.
256. Egan CG, Lavery R, Caporali F, Fondelli C, Laghi-Pasini F, Dotta F, et al. Generalised reduction of putative endothelial progenitors and CXCR4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(7):1296-305.
257. Fadini GP. A reappraisal of the role of circulating (progenitor) cells in the pathobiology of diabetic complications. *Diabetologia*. 2014;57(1):4-15.
258. Brunner S, Hoellerl F, Schmid-Kubista KE, Zeiler F, Scherthaner G, Binder S, et al. Circulating angiopoietic cells and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus, with or without macrovascular disease. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(7):4655-62.
259. Asnagli V, Lattanzio R, Mazzolari G, Pastore MR, Ramoni A, Maestroni A, et al. Increased clonogenic potential of circulating endothelial progenitor cells in patients with type 1 diabetes and proliferative retinopathy. *Diabetologia*. 2006;49(5):1109-11.
260. Tan K, Lessieur E, Cutler A, Nerone P, Vasanji A, Asosingh K, et al. Impaired function of circulating CD34(+) CD45(-) cells in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Experimental eye research*. 2010;91(2):229-37.

261. Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, Richter S, Passauer J, Fischer S, et al. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2005;183(1):163-7.
262. Cubbon RM, Kahn MB, Wheatcroft SB. Effects of insulin resistance on endothelial progenitor cells and vascular repair. *Clinical science*. 2009;117(5):173-90.
263. Xiao-Yun X, Zhao-Hui M, Ke C, Hong-Hui H, Yan-Hong X. Glucagon-like peptide-1 improves proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via upregulating VEGF generation. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2011;17(2):BR35-41.
264. Humpert PM, Neuwirth R, Battista MJ, Voronko O, von Eynatten M, Konrade I, et al. SDF-1 genotype influences insulin-dependent mobilization of adult progenitor cells in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2005;28(4):934-6.
265. Jeong JO, Kim MO, Kim H, Lee MY, Kim SW, Ii M, et al. Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation*. 2009;119(5):699-708.
266. Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(9):2140-6.
267. Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, et al. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(7):1246-52.
268. Herbrig K, Gebler K, Oelschlaegel U, Pistrosch F, Foerster S, Wagner A, et al. Kidney transplantation substantially improves endothelial progenitor cell dysfunction in patients with end-stage renal disease. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006;6(12):2922-8.
269. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004;103(3):921-6.
270. Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, et al. Decreased circulating CD34+ cells are associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2009;26(2):171-3.
271. Yoon YS, Uchida S, Masuo O, Cejna M, Park JS, Gwon HC, et al. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. *Circulation*. 2005;111(16):2073-85.
272. Docherty K, Clark AR. Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1994;8(1):20-7.
273. Wimalawansa SJ. Vitamin D Deficiency: Effects on Oxidative Stress, Epigenetics, Gene Regulation, and Aging. *Biology*. 2019;8(2).
274. Chagas CE, Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes. *Nutrients*. 2012;4(1):52-67.
275. Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, Mitri J, Brendel M, Patel K, et al. Systematic review: Vitamin D and cardiometabolic outcomes. *Annals of internal medicine*. 2010;152(5):307-14.
276. Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *International journal of clinical practice*. 2003;57(4):258-61.

277. Holick MF. Calcium plus vitamin D and the risk of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;354(21):2287-8; author reply -8.
278. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Widespread vitamin D insufficiency: A new challenge for primary prevention, with particular reference to multiple sclerosis. *Presse medicale*. 2011;40(4 Pt 1):349-56.
279. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2010;39(2):419-46, table of contents.
280. Препоръки за диагностика, профилактика и лечение на дефицит и недостатъчност на витамин D. Българско дружество по ендокринология. 2019.
281. Borissova AM, Shinkov A, Vlahov J, Dakovska L, Todorov T, Svinarov D, et al. Vitamin D status in Bulgaria--winter data. *Archives of osteoporosis*. 2013;8:133.
282. Reichrath J. Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited. *Experimental dermatology*. 2007;16(7):618-25.
283. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29(12):664-73.
284. Pike JW, Meyer MB. Fundamentals of vitamin D hormone-regulated gene expression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;144 Pt A:5-11.
285. Fetahu IS, Hobaus J, Kallay E. Vitamin D and the epigenome. *Frontiers in physiology*. 2014;5:164.
286. Seuter S, Pehkonen P, Heikkinen S, Carlberg C. Dynamics of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-dependent chromatin accessibility of early vitamin D receptor target genes. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1829(12):1266-75.
287. Pan L, Matloob AF, Du J, Pan H, Dong Z, Zhao J, et al. Vitamin D stimulates apoptosis in gastric cancer cells in synergy with trichostatin A /sodium butyrate-induced and 5-aza-2'-deoxycytidine-induced PTEN upregulation. *The FEBS journal*. 2010;277(4):989-99.
288. Doig CL, Singh PK, Dhiman VK, Thorne JL, Battaglia S, Sobolewski M, et al. Recruitment of NCOR1 to VDR target genes is enhanced in prostate cancer cells and associates with altered DNA methylation patterns. *Carcinogenesis*. 2013;34(2):248-56.
289. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocrine reviews*. 2008;29(6):726-76.
290. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology*. 2006;147(12):5542-8.
291. Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(3):509-11.
292. Abbas MA. Physiological functions of Vitamin D in adipose tissue. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2017;165(Pt B):369-81.
293. Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(1):98-108.
294. Maestro B, Molero S, Bajo S, Davila N, Calle C. Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Cell biochemistry and function*. 2002;20(3):227-32.

295. Dunlop TW, Vaisanen S, Frank C, Molnar F, Sinkkonen L, Carlberg C. The human peroxisome proliferator-activated receptor delta gene is a primary target of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its nuclear receptor. *Journal of molecular biology*. 2005;349(2):248-60.
296. Berridge MJ. Vitamin D deficiency and diabetes. *The Biochemical journal*. 2017;474(8):1321-32.
297. Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS. Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappaB activation via NADPH oxidase. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;294(2):E345-51.
298. Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Garland FC. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia*. 2008;51(8):1391-8.
299. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92(6):2017-29.
300. Scragg R, Sowers M, Bell C, Third National H, Nutrition Examination S. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes care*. 2004;27(12):2813-8.
301. Liu S, Song Y, Ford ES, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes care*. 2005;28(12):2926-32.
302. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, Van Dam RM, Willett WC, Manson JE, et al. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes care*. 2006;29(3):650-6.
303. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(5):820-5.
304. Orwoll E, Riddle M, Prince M. Effects of vitamin D on insulin and glucagon secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The American journal of clinical nutrition*. 1994;59(5):1083-7.
305. Isaia G, Giorgino R, Adami S. High prevalence of hypovitaminosis D in female type 2 diabetic population. *Diabetes care*. 2001;24(8):1496.
306. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *The British journal of nutrition*. 2003;89(5):552-72.
307. George PS, Pearson ER, Witham MD. Effect of vitamin D supplementation on glycaemic control and insulin resistance: a systematic review and meta-analysis. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2012;29(8):e142-50.
308. Krul-Poel YH, Ter Wee MM, Lips P, Simsek S. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: The effect of vitamin D supplementation on glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *European journal of endocrinology*. 2017;176(1):R1-R14.
309. Maestro B, Davila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2003;84(2-3):223-30.
310. Wolden-Kirk H, Overbergh L, Gysemans C, Brusgaard K, Naamane N, Van Lommel L, et al. Unraveling the effects of 1,25OH<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on global gene expression in pancreatic islets. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2013;136:68-79.
311. Jayanarayanan S, Anju TR, Smijin S, Paulose CS. Vitamin D<sub>3</sub> supplementation increases insulin level by regulating altered IP<sub>3</sub> and AMPA receptor expression in the pancreatic islets of streptozotocin-induced diabetic rat. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015;26(10):1041-9.

312. Bornstedt ME, Gjerlaugsen N, Olstad OK, Berg JP, Bredahl MK, Thorsby PM. Vitamin D metabolites influence expression of genes concerning cellular viability and function in insulin producing beta-cells (INS1E). *Gene*. 2020;746:144649.
313. Safarpour P, Daneshi-Maskooni M, Vafa M, Nourbakhsh M, Janani L, Maddah M, et al. Vitamin D supplementation improves SIRT1, Irisin, and glucose indices in overweight or obese type 2 diabetic patients: a double-blind randomized placebo-controlled clinical trial. *BMC family practice*. 2020;21(1):26.
314. Seldeen KL, Pang M, Rodriguez-Gonzalez M, Hernandez M, Sheridan Z, Yu P, et al. A mouse model of vitamin D insufficiency: is there a relationship between 25(OH) vitamin D levels and obesity? *Nutrition & metabolism*. 2017;14:26.
315. Mason C, Xiao L, Imayama I, Duggan C, Wang CY, Korde L, et al. Vitamin D3 supplementation during weight loss: a double-blind randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2014;99(5):1015-25.
316. Khosravi ZS, Kafeshani M, Tavasoli P, Zadeh AH, Entezari MH. Effect of Vitamin D Supplementation on Weight Loss, Glycemic Indices, and Lipid Profile in Obese and Overweight Women: A Clinical Trial Study. *International journal of preventive medicine*. 2018;9:63.
317. Imga NN, Karci AC, Oztas D, Berker D, Guler S. Effects of vitamin D supplementation on insulin resistance and dyslipidemia in overweight and obese premenopausal women. *Archives of medical science : AMS*. 2019;15(3):598-606.
318. Yang K, Liu J, Fu S, Tang X, Ma L, Sun W, et al. Vitamin D Status and Correlation with Glucose and Lipid Metabolism in Gansu Province, China. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2020;13:1555-63.
319. Branco J, Smoraog DC, Bentes CM, Netto CC, Marinheiro LPF. Association between vitamin D status and glycemic profile in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2019;13(3):1685-8.
320. Major GC, Alarie F, Dore J, Phouttama S, Tremblay A. Supplementation with calcium + vitamin D enhances the beneficial effect of weight loss on plasma lipid and lipoprotein concentrations. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(1):54-9.
321. Swink TD, Vining EP, Freeman JM. The ketogenic diet: 1997. *Advances in pediatrics*. 1997;44:297-329.
322. Gano LB, Patel M, Rho JM. Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases. *Journal of lipid research*. 2014;55(11):2211-28.
323. Cahill GF, Jr., Veech RL. Ketoacids? Good medicine? *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2003;114:149-61; discussion 62-3.
324. Volek JS, Fernandez ML, Feinman RD, Phinney SD. Dietary carbohydrate restriction induces a unique metabolic state positively affecting atherogenic dyslipidemia, fatty acid partitioning, and metabolic syndrome. *Progress in lipid research*. 2008;47(5):307-18.
325. Boden G, Sargrad K, Homko C, Mozzoli M, Stein TP. Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes. *Annals of internal medicine*. 2005;142(6):403-11.
326. Mattson MP, Moehl K, Ghena N, Schmaedick M, Cheng A. Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health. *Nature reviews Neuroscience*. 2018;19(2):63-80.
327. Sato K, Kashiwaya Y, Keon CA, Tsuchiya N, King MT, Radda GK, et al. Insulin, ketone bodies, and mitochondrial energy transduction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9(8):651-8.

328. Yurista SR, Chong CR, Badimon JJ, Kelly DP, de Boer RA, Westenbrink BD. Therapeutic Potential of Ketone Bodies for Patients With Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*. 2021;77(13):1660-9.
329. Kanikarla-Marie P, Jain SK. Hyperketonemia and ketosis increase the risk of complications in type 1 diabetes. *Free radical biology & medicine*. 2016;95:268-77.
330. Gupta L, Khandelwal D, Kalra S, Gupta P, Dutta D, Aggarwal S. Ketogenic diet in endocrine disorders: Current perspectives. *Journal of postgraduate medicine*. 2017;63(4):242-51.
331. Brinkworth GD, Noakes M, Buckley JD, Keogh JB, Clifton PM. Long-term effects of a very-low-carbohydrate weight loss diet compared with an isocaloric low-fat diet after 12 mo. *The American journal of clinical nutrition*. 2009;90(1):23-32.
332. Dyson PA. A review of low and reduced carbohydrate diets and weight loss in type 2 diabetes. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association*. 2008;21(6):530-8.
333. Kinzig KP, Honors MA, Hargrave SL. Insulin sensitivity and glucose tolerance are altered by maintenance on a ketogenic diet. *Endocrinology*. 2010;151(7):3105-14.
334. Kennedy AR, Pissios P, Otu H, Roberson R, Xue B, Asakura K, et al. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2007;292(6):E1724-39.
335. Yuan X, WJ, Yang S., Gao M., Cao L. Effect of the ketogenic diet on glycemic control, insulin resistance, and lipid metabolism in patients with T2DM: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition & Diabetes* 2020;10.
336. Ma S, Huang Q, Yada K, Liu C, Suzuki K. An 8-Week Ketogenic Low Carbohydrate, High Fat Diet Enhanced Exhaustive Exercise Capacity in Mice. *Nutrients*. 2018;10(6).
337. Goday A, Bellido D, Sajoux I, Crujeiras AB, Burguera B, Garcia-Luna PP, et al. Short-term safety, tolerability and efficacy of a very low-calorie-ketogenic diet interventional weight loss program versus hypocaloric diet in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutr Diabetes*. 2016;6(9):e230.
338. Dashti HM, Mathew TC, Khadada M, Al-Mousawi M, Talib H, Asfar SK, et al. Beneficial effects of ketogenic diet in obese diabetic subjects. *Molecular and cellular biochemistry*. 2007;302(1-2):249-56.
339. Gumbiner B, Van Cauter E, Beltz WF, Ditzler TM, Griver K, Polonsky KS, et al. Abnormalities of insulin pulsatility and glucose oscillations during meals in obese noninsulin-dependent diabetic patients: effects of weight reduction. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996;81(6):2061-8.
340. Wang X, Wu X, Liu Q, Kong G, Zhou J, Jiang J, et al. Ketogenic Metabolism Inhibits Histone Deacetylase (HDAC) and Reduces Oxidative Stress After Spinal Cord Injury in Rats. *Neuroscience*. 2017;366:36-43.
341. Chriett S, Dabek A, Wojtala M, Vidal H, Balcerczyk A, Pirola L. Prominent action of butyrate over beta-hydroxybutyrate as histone deacetylase inhibitor, transcriptional modulator and anti-inflammatory molecule. *Scientific reports*. 2019;9(1):742.
342. Shimizu K, Saito H, Sumi K, Sakamoto Y, Tachi Y, Iida K. Short-term and long-term ketogenic diet therapy and the addition of exercise have differential impacts on metabolic gene expression in the mouse energy-consuming organs heart and skeletal muscle. *Nutrition research*. 2018;60:77-86.
343. Shukla SK, Gebregiworgis T, Purohit V, Chaika NV, Gunda V, Radhakrishnan P, et al. Metabolic reprogramming induced by ketone bodies diminishes pancreatic cancer cachexia. *Cancer & metabolism*. 2014;2:18.

344. Ellenbroek JH, van Dijck L, Tons HA, Rabelink TJ, Carlotti F, Ballieux BE, et al. Long-term ketogenic diet causes glucose intolerance and reduced beta- and alpha-cell mass but no weight loss in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2014;306(5):E552-8.