



Медицински университет – София, Медицински факултет
Катедра по фармакология и токсикология
ул. „Здраве“ № 2, 1431 София, ☎ (02) 9172 714, тел./факс 9172 620

Д-р Людмил Калистратов Лазаров

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ И КЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ
МЕХАНИЗМИ НА ПРЕДИАБЕТ С ИНСУЛИНОВА РЕЗИСТЕНТНОСТ**

*Автореферат на дисертационен труд
за придобиване на
образователна и научна степен „доктор“*

в област на висше образование „7. Здравеопазване и спорт“,
професионално направление „7.1. Медицина“ и научна специалност
„Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“

Научни ръководители:

проф. д-р Надка Бояджиева, дм, дмн –
Катедра по фармакология и токсикология, МФ, МУ – София

доц. д-р Емил Гачев, дм – Ръководител на
Катедра по клинична фармакология и терапия, МФ, МУ – София

Официални рецензенти:

Доц. д-р Румен Павлов Николов, дм
Доц. д-р Иван Тодоров Ламбев, дм

София • 2017

Дисертационният труд се състои от 112 страници и е онагледен с 19 фигури и с 6 таблици. Библиографията включва 208 литературни източника, от които 6 на кирилица и 202 на латиница.

Официалната публична защита ще се проведе на 14.09. 2017 г. от 15.45 часа, в аудитория № 2 на Предклиничния университетски център МФ – София, ул.Здраве № 2, съгласно чл. 76 и 77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в Медицински университет – София и въз основа на Заповед № РК36-1103/06.07.17 на Ректора на МУ – София, пред научно жури в състав:

Председател:

Проф. д-р Надка Иванова Бояджиева, дм, дмн

Членове:

1. Доц. д-р Румен Павлов Николов, дм
2. Проф. д-р Витан Даков Влахов, дмн
3. Доц. д-р Иван Тодоров Ламбев, дм
4. Доц. д-р Мария Делчева Желязкова-Савова, дм

Резервни членове:

1. Доц. д-р Павлина Ангелова Гатева, дм
2. Доц. д-р Мария Ганева Ганева, дм

Материалите по защитата са на разположение на заинтересуваните ги в Катедра „Фармакология и токсикология” на Медицински факултет, Медицински университет – София, и са публикувани на интернет страницата на МУ – София.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

БИА – биоелектричен импеданс анализ
ЗД – захарен диабет
ИТМ – индекс на телесната маса
НГГ – нарушена гликемия на гладно
НЛР – нежелани лекарствени реакции
ОГТТ – орален глюкозо толерантен тест
ОТ – обиколка на талията
СЧТ – стомашно чревен тракт
СУП – сулфанилурейни препарати
ТТ – телесно тегло

На латиница

AMA – American Medical Association
BMI – индекс на т.м. (ИТМ)
BMR – базален метаболизъм (основна обмяна)
ССК – холецистокинин
CID - clinical investigation day
CFU – колония формиращи единици
CRP – С-реактивен протеин
DPP-4 – дипептидил пептидаза-4
ECW – екстрацелуларна вода
GLP – глюкагон-подобен пептид
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
FFA – свободни мастни киселини
FM – fat mass
FFM – fat free mass
FMT – фекален микрофлорен трансплант
FTO – Fat mass and obesity-associated protein
HbA_{1c} – гликиран хемоглобин
HDL – високоплътностен липопротеин
НОМА – homeostatic model assessment
IL-1 – интерлевкин 1
iNOS – индицируема NO синтаза
LCD – low-calorie diet
NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease
NIRDIABO – NONPHARMACOLOGICAL INTERVENTIONS FOR THE REDUCTION OF RISK OF DIABETES IN OBESE PEOPLE
NK cells – клетки естествени убийци

NO – азотен оксид
NOS – азот-оксид синтаза
QUICKI – quantitative insulin sensitivity check index
PPARG – Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RYGB – Roux-en-Y Gastric Bypass
SCFAs – Short-chain fatty acids
T2DM – захарен диабет тип 2
TBW – total body water
TCF7L2 – Transcription Factor 7-Like 2
TNF- α – туморо-некрозен фактор-алфа
TZD – тиазолидиндиони
UCP1 – несвързан протеин 1
VFR – visceral fat rating
VLCD – very low-calorie diet

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	3
1. ВЪВЕДЕНИЕ	7
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	10
2.1. Цел	10
2.2. Задачи	10
2.2.1. Фармакологично експериментални задачи.....	10
2.2.2. Клинични изследователски задачи.....	11
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	12
3.1. Материали.....	12
3.1.1. Опитни животни.....	12
3.1.2. Фармакологични средатва	12
3.1.3. Нефармакологични средства	13
3.2. Методи за изследване на показатели на	14
метаболизма и въглехидратна обмяна	
3.2.1. Клинично-лабораторни методи.....	14
3.2.2. ELISA методи.....	15
3.2.3. Методи за оценка на затлъстяването.....	15
3.2.4. Метод за определяне на предиабет	17
3.2.5. Генетични методи	17
3.2.6. Статистически методи на анализ.....	18
4. РЕЗУЛТАТИ	20
4.1. Лабораторни опити с плъхове	19
4.2. Резултати от изследвания по проекта НИРДИАБО	23

5. ОБСЪЖДАНЕ.....	38
6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ	45
6.1. Изводи	43
6.2. Приноси	44
7. Публикации и участия на научни форуми	47
7.1. Публикации	45
7.2. Участия в научни форуми	46
8. SUMMARY	50

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет (ЗД) е хронично прогресиращо заболяване, което придобива мащабите на световна епидемия. От него страдат над 360 млн. души. В света на всеки 10 секунди двама души се разболяват от диабет, а един човек умира от това заболяване. Годишно 7 млн. души се разболяват от диабет, от тях 70 000 са деца. СЗО предвижда към 2030 г. над 500 млн. души да бъдат засегнати от диабет (Mathers CD and Loncar D. 2006). В България според статистиката от ЗД (инсулино зависим ЗД тип 1 и неинсулино зависим тип 2) страдат над 720 000 души, като 90% от тях имат ЗД тип 2 (Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1999). При част от пациентите с диабет тип 2 често липсват признаци на заболяването и понякога то се открива случайно при провеждане на изследвания по друг повод. Последствията и усложненията от ЗД могат да бъдат много тежки и с висока цена както за отделната личност, така и за обществото. Главният проблем произтича от големия брой случаи на безсимптомно протичащ ЗД тип 2. Най-често той преминава през фаза на предиабет и впоследствие настъпва разгръщането на клиничната картина на ЗД. При *предиабет* плазмените нива на кръвната захар са по-високи от нормалните: на гладно те са $> 6.1 \text{ mmol/l}$, а след провеждане на пероралния тест за глюкозен толеранс те са под 11 mmol/l . Без намеса се очаква, че предиабетът може да премине в ЗД тип 2 за период до 10 години. Прогресията от предиабет към ЗД тип 2 може да бъде спряна с рационални промени в начина на живот – като например хранене със здравословни храни, умерена ежедневна физическа активност, отстраняване на стерсогенните фактори и др. Поддържането на здравословно тегло е важен фактор и осигурява нормализиране на гликемията.

Инсулиновата резистентност е състояние, при което клетките намаляват своята чувствителност към действието на инсулин. Рецепторите за инсулин

понижават своята активност, по-малко глюкоза се усвоява от клетките на тялото и повече глюкоза се натрупва в кръвта. Диагностицира се хипергликемия. При някои пациенти се отчитат и повишени концентрации на инсулин в кръвта.

Предлагани са различни механизми за обяснение на патогенезата на инсулиновата резистентност, но са възприети основно три от тях:

- ектопично отлагане на липиди;
- стрес на ендоплазматичния ретикулум
- промени в чувствителността на инсулиновите рецептори при системно възпаление.

Инсулиновата резистентност почти винаги се счита за патологичен процес и е в основата на захарния диабет тип 2. Регулирането на тази чувствителност е част от метаболитната физиология. Денонощните, сезонните, свързаните с възраст, с бременност и др. колебания в приема на хранителни вещества изискват хомеостатична гъвкавост, включително и промяна в чувствителността към инсулин. Посоченото е свързано с оптимизиране на хранителния прием, което може да наложи нискокалоричен диетичен режим.

Водещ подход в преодоляването на инсулиновата резистентност при лечение на захарен диабет тип 2 е насочен към интензивна промяна в начина на живот, свързана с намаляване на затлъстяването. След редукция на прием на хранителни вещества, се намалява метаболитния стрес върху тъканите и се подобряват кардиоваскуларните резултати. Понижаването на гликемията чрез понижаване на инсулиновата резистентност под влияние на нискокалоричен диетичен режим води до нормализиране на въглехидратната обмяна. Включеният пробиотик подобрява метаболизма и намалява рисковете от инсулинова резистентност при изследванията в дисертационния труд. Процесът на подобряване на показателите на предиабет и затлъстяване

е индивидуален и зависи от различни фактори (генетични, пол, придружаващи заболявания, особено възпалителни и др).

В настоящия дисертационен труд се изследват няколко гени при мъже и жени с доказан предиабет и затлъстяване.

Направени са генетични изследвания върху вариации на 3 гена (TCF7L2, PPARG, FTO)

Предпоставки за подбор на посочените гени са следните: **TCF7L2:** Напоследък TCF7L2 беше описан като водещ ген за риск за ЗД2. Този генен продукт е от групата на транскрипционни фактори, свързани в кръвната глюкозна хомеостаза. **PPARG:** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) са нуклеарна хормонална супер фамилия на лиганд-активирани транскрипционни фактори. PPARG2 е специфичен за мастната тъкан, където има водеща роля в регулация на диференциране на адипоцити. Ще бъде изследвана следната аминокиселинна замяна Pro12Ala. **FTO:** Основно се експресира в хипоталамус. Допуска се, че има роля в регулация на енергийната хомеостаза (Fredriksson et al., 2008; Stratigopoulos et al., 2008), деметилация на нуклеинови киселини и регулация на мастната тъкан чрез контрол на липолизата (Wahlen et al., 2008).

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел: *Да се проучат механизми на предиабет чрез експериментални и клинични изследвания.*

2.2. Задачи

2.2.1. Фармакологично експериментални задачи

1. Да се създадат експериментални модели на инсулинова резистентност на половозрепи мъжки плъхове линия Wistar чрез два подхода: а) фруктоза и б) затлъстяване.
2. Да се проучат промените във въглехидратна и мастната обмяна с разработените модели и се определи фармакологичният ефект на пробиотика ЕЛБИВИТ върху посочените показатели.
3. Да се изследват ефектите на мелатонин върху мъжки плъхове с модели на инсулинова резистентност и затлъстяване и се определят показателите на т.м. и въглехидратна обмяна.
4. Да се определят ефектите на лабораторно сертифицирана субстанция, извлечена от растението *Tribulus terrestris*, върху мъжки плъхове с модел на инсулинова резистентност и затлъстяване.

2.2.2. Клинични изследователски задачи

1. Да се определят ефектите на нискокалорийна диета, съчетана с приемане на пробиотици ЕЛБИВИТ, върху разпределението на мазнини в организма, общи масти и тяхното натрупване (показатели от биометричен импеданс), антропометрични показатели на участници-доброволци в научно-изследователския проект НИРДИАБО от двата пола на възраст от 20 до 70 години с предиабет и затлъстяване.
2. Да се определят ефектите на нискокалорийна диета, съчетана с приемане на пробиотици ЕЛБИВИТ, върху показатели на въглехидратна обмяна(глюкоза на гладно и ОГТТ) и мастна обмяна(холестерол-общ,холестерол-HDL,холестерол-LDL,триглицериди) на участници–доброволци в проекта НИРДИАБО от двата пола на възраст от 20 до 70 години с предиабет и затлъстяване.
3. Да се определят ефектите на нискокалорийна диета и пробиотици ЕЛБИВИТ върху НОМА индекса и серумните нива на цитокини в кръв на участници–доброволци в проекта НИРДИАБО от двата пола на възраст от 20 до 70 години с предиабет и затлъстяване.
4. Да се изследват основни параметри на генетичния статус на доброволци с предиабет(нарушена гликемия на гладно и/или нарушен глюкозен толеранс) и затлъстяване($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$), чрез определяне на три гена, имащи връзка със затлъстяване и предиабет.

(TCF7L2, PPARG, FTO)

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1 Материали

3.1.1. Опитни животни

Опитите са проведени върху 54 бели мъжки полови зрели плъха линия Wistar на възраст 3 месеца. Броят на животните в отделните групи варира от 6 до 9 и подробностите са посочени в съответните части в раздел "Резултати". Отглеждането на животните е провеждано при стандартни условия на температура и съответно изискване към помещението. Спазени са етичните правила за работа с опитни животни.

Храненето на животните включва, както използваните пелети за експериментални плъхове (предимно за контролните групи), така и експериментален модел на затлъстяване със слънчоглед, ядки, сланина (адаптиран метод по доц. д-р Ханджиева-Дърленска) и експериментален модел на инсулинова резистентност, предизвикан с фруктоза (Thorburn, A.W. et al., 1989) (за експерименталните групи). Достъпът до вода и храна на всички животни беше *ad libitum*.

Фармакологични средства

Мелатонин (Адифарма АД) – таблетки по 1 mg (оп. 60 бр.), регистриран като хранителна добавка доза-20мг./кг.-тегло р.о. (чрез сонда)

Трибестан (Софарма АД) – филмирани таблетки 250 mg (оп. 60 бр.). Всяка таблетка съдържа стандартизиран сух екстракт от надземната част на *Tribulus terrestris L.* Биологично активните вещества са биофлавоноиди, стероидни сапонини и сапогенени (Ламбев, 2105).

доза на трибестан- 250мг./кг.-тегло р.о. (чрез сонда)

Пробиотик(ЕЛБИВИТ)- доза - 1гр/кг-тегло р.о. (чрез сонда)

Определяне на глюкозата

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

Орален глюкозо толерантен тест (ОГТТ)

Плъховете бяха оставени без храна за 12-16 h. Определяше се на гладно кръвната захар сутрин, след което с помощта на стомашна сонда се въвеждаше 20% разтвор на глюкоза (2 g/kg т.м.) и се определяше глюкозата в кръвта на 30-а, 60-а, 90-а и 120-а min. При някои от животните се определяше на 120-а min след натоварване с глюкоза.

Експериментални модели на инсулинова резистентност и затлъстяване

- Чрез фруктоза-експериментален модел на инсулинова резистентност (Thorburn, A.W. et al., 1989)
- Чрез експериментално затлъстяване (адаптиран метод по доц. д-р Ханджиева-Дърленска)

3.1.2. Фармакологични средства при хора

Пробиотикът ЕЛБИВИТ (ЕлБи Булгарикум) представлява *обезмаслен лиофилизиран млечнокисел продукт*. Той съдържа жизнеспособни клетки на селектиран щам *Lactobacillus bulgaricus* с пробиотично действие. *Lactobacillus bulgaricus* се отличава с висока степен на преживяемост и изключителна жизнеспособност в СЧТ. *Lactobacillus bulgaricus* в обезмаслен вид поддържа баланса на чревната микрофлора и помага за пълноценното усвояване на лактоза (млечна захар), млечни белтъци, витамини и минерали. Съхранява се на сухо място при температура от 2 до 6 °C.

Таблица 1. Състав на ЕЛБИВИТ в 100 g сух продукт

Мазнини	0,5 g
Белтъчини	32 g
Въглехидрати	52 g
Енергийна стойност	341 kcal (1447 kJ)
Сухо обезмаслено мляко, монокултура от избран щам <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Повече от 100 000 млн. жизнеспособни клетки/100 g
Ароматизиращо вещество	Ванилия

Препоръчителна доза е от 25 до 50 g прах на ден, което отговаря на 3 до 6 супени лъжици. Преди употреба продуктът се разтваря с вода до желаната консистенция, без загряване. Прилагана бе доза- 30г./дневно.

3.1.3. Нефармакологични средства

Нискокалорична храна. Диетата, с която започваме, без да увеличаваме физическата натовареност или да включваме определена физкултура, е нискокалорична. Тя е определена на конкурсен принцип на база на хранителност, качество, безвредност и запазени хранителни вещества. В продължение на 2 месеца (8 седмици) утвърдените участници в проекта се подложиха на ниско-енергийна диета (1000 до 1200 ккал/дневно). Състав-масти (30%), въглехидрати (45%), протеини (25%). Диетата включва 5 хранения, разпределени през деня, като едно от тези хранения е заместено с пробиотика ЕЛБИВИТ.

Останалите хранения са извършени с храни с ниско съдържание на мазнини, умерено количество белтъчини и ниско съдържание на въглехидрати. Целта е през този 8-седмичен период участниците да намалят с $\geq 5\%$ от първоначалното си тегло. Тези, които успеят да достигнат желаната редукция на теглото, да продължат с балканска диета (1500-1700 kcal/ден), с нисък гликемичен индекс, с високо-протеинно съдържание (30 E%), с умерено количество масти (30 E%) и въглехидрати с нисък гликемичен

индекс (40 E%).* E % = energy-percent, умерена физическа активност и психологическа работа. Този период продължава и през останалите месеци на 2-годишния период на проучването. Това е период на поддържане на първоначалната редукция на теглото с последващо значително намаление на телесната маса.

3.2. Методи за изследване на показатели на метаболизма и въглехидратна обмяна

3.2.1. Клинично-лабораторни методи

3.2.2. ELISA методи

❶ Метод за определяне на човешки TNF- α ELISA Kit

Беше приложен подвид на ELISA метода, Сандвич-ELISA. Този метод се базира на реакция двоен-антитяло сандвич. Плаката предварително е инкубирана с антитяло, насочено към единия край на TNF-alpha. Това антитяло се свързва с TNF-alpha в стандарта и кръвната проба. На следващия етап в ямките се прилага второ антитяло, което се свързва със свободния край на TNF-alpha. По този начин двете антитела се свързват с различни краища на TNF-alpha, при което се оформя сандвич. По-късно се прибавя субстратен разтвор, който спира реакцията. Резултатите се отчитат със спектрофотометър при 450 nm. Концентрацията на TNF-alpha се определя спрямо стандартна крива на база на резултатите от спектрофотометрията, в pg/ml.

❷ Метод за определяне на IL-1beta

ELISA kit е използван за определянето на IL-1beta в кръв на хора. Методът е сандвич-ELISA. При изследванията се спазват указанията на

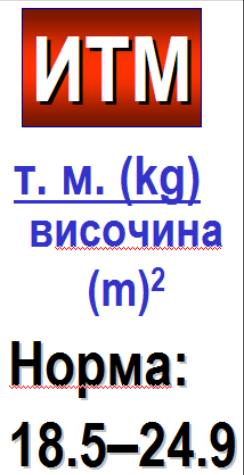
производителя, като накрая резултатът се определя спектрофотометрично при дължина на вълната 450 nm. Концентрацията на IL-1beta в кръв на хора се определя чрез изчисления на база на стандартна крива (стандартите са част от набора реактиви в Kit-a).

3.2.3 Методи за оценка на затлъстяване

❶ Антропометрични

- **Телесно тегло (ТТ)** – този метод е сред най-използваните в клиничната практика. Краткосрочните промени обикновено са свързани с баланса на течности. Дългосрочните промени демонстрират промяна в т.м., но не предоставят информация за промените в телесния състав.

- **Индекс на телесната маса (ИТМ)**

	18 – малнутриция, респ. недोхранване
	18-20 – възможна малнутриция, респ. недохранване
	20-25 – норма
	25-30 – наднормено тегло
	30-35 – затлъстяване пръва степен
	35-40 – затлъстяване втора степен
	>40 – затлъстяване трета степен

❸ **Биоелектричен импеданс анализ (БИА)** – това е метод за рутинно изследване на телесния състав, основаващ се на различията в проводимостта на различните тъкани и се извършва със специален апарат – биоимпеданс-анализатор. Тъканите, които съдържат повече вода и електролити са добри проводници, докато мастната тъкан, въздухът и костите са лоши проводници. Нискочестотният ток не преминава през клетъчната мембрана и се получава съпротивление, което е в негативна връзка с екстрацелуларната течност.

Високочестотният ток преминава през клетъчната мембрана и измереното съпротивление отразява общата вода в организма. Стойностите на измереното съпротивление с ниска и висока честота се използват за изчисляване на екстрацелуларната вода (ECW) и общата вода в организма (TBW). Тези компоненти се използват за изчисляване на мастната тъкан (FM) и немастната тъкан (FFM).

БИА е лесен, неинвазивен, относително евтин метод, без излагане на йонизираща радиация, който може да се прилага при здрави индивиди и хронични пациенти със стабилен воден и електролитен баланс.

Използваният биоимпеданс апарат беше Tanita BC-420 MA.

3.2.4 Метод за определяне на предиабет

❶ Методи за определяне на глюкоза

- кръвно-захарен профил или натоварване с глюкоза
- НОМА-индекс.

НОМА или хомеостатичен модел за оценка на инсулиновата чувствителност е индекс за определяне чувствителността на клетките към инсулин, базиран на стойностите на кръвна захар на гладно и на инсулин на гладно по стандартна формула:

$$\text{НОМА-IR} = \text{глюкоза}(\text{mmol/l}) * \text{инсулин}(\text{mU/l}) / 22.5$$

Референтни стойности са следните:

Нормален НОМА-IR < 2.5

Рискова зона: 2.5-5.0

Висока инсулинова резистентност: (НОМА-IR) > 5.0

3.2.5. Генетични методи

- Амплификация чрез полимеразна верижна реакция (*polymerase chain reaction, PCR*) на специфични фрагменти от геномната ДНК на

подбраните гени и полиморфизми. В амплификационната реакция участва термостабилна ДНК-зависима ДНК-полимераза, която в буферна среда с подходяща концентрация на Mg^{2+} йони и в присъствието на свободни нуклеотиди, извършва полимеразната реакция. Амплификационната реакция се извършва в PCR апарат, който поддържа определените температури, необходими за последователното осъществяване на всеки етап от PCR реакцията – денатурация, хибридизация на праймерите (анийлинг), синтез на ДНК.

3.2.6. Статистически методи

Сравнение на клиничните показатели (BMI, НОМА, тегло, талия, % мазнини, VFR) на първо и второ измерване

Преди провеждане на статистически тестове данните бяха прегледани за липсващи стойности, грешни записи и други потенциални проблеми. Данните от двете измервания (CID1 и CID2) бяха анализирани общо, а след това и разделени по пол. След изчистването на данните беше проведен едностранен тест на Student за сравнение на групи от двойки стойности (*paired samples*). Беше избран едностранен тест, поради предварително очакваната посока на разликите между групите, а именно – към намаляване на разглежданите индекси и клинични и телесни показатели. За праг на значимост беше приета стандартната стойност **на $p < 0.05$.**

Генетична асоциация

Тестовите за асоциация на наблюдаваните генотипи на изследваните варианти в гените PPARC, FTO и TCF7L2 с клиничните показатели НОМА и BMI бяха извършени с програмата Plink, v. 1.07 (1) при използване на хи-квадрат теста, както и точния тест на Фишър (Fisher's exact test) за групите с малък брой измервания. От тестовите бяха изключени участници, за които липсват данни от едно или повече измервания. При оценката на генетичните

асоциации бяха използвани следните форми на представяне на клиничните показатели:

1) Реална стойност на НОМА индекса - стойността от първичното измерване (CID1) без кодиране или групиране. По този начин беше направена оценка на количествената връзка между НОМА и генетичните варианти.

2) Кодирана стойност на НОМА при CID1 - стойностите бяха кодирани като ниски (под 2.5) и високи (равни на или по-високи от 2.5). Тестът за асоциация бе качествен (не се прави разлика между отделните измервания в двете групи, факторът е с дискретни подредени стойности).

3) Съотношение на първата (CID1) и втората (CID2) измерени стойности на ВМІ. Това представяне дава резултат под 1 ако ВМІ намалява, и обратно. Получените стойности бяха използвани като количествен фактор при тестовете.

4) Кодирано съотношение на ВМІ - стойности под 1 бяха приети за „понижени“, а над 1 - за „повишени“, като двата кода бяха използвани като качествен фактор с дискретни подредени стойности.

5) Съотношение на първата (CID1) и втората (CID2) измерени стойности на НОМА, подобно на 3).

6) Кодирана промяна в НОМА индекса между CID1 и CID2, както следва: Измерванията на CID2 бяха кодирани като ниски и високи подобно на 2). След това бяха дефинирани всички възможни комбинации от двете измервания, наблюдавани при изследваните пациенти (високи-ниски, високи-високи, ниски-високи, ниски-ниски) и беше тествана асоциацията на генетичните промени с двете групи, показващи промяна (високи-ниски и ниски-високи). За да се намали шума в данните от теста бяха изключени пациентите, показващи високи нива на кръвната захар и нисък НОМА индекс на второ измерване, тъй като тази комбинация предполага прогресия на

заболяването, а не само промяна на индекса поради ефект на диетата/третирането.

За праг на значимост беше приета стандартната стойност на $p < 0.05$.

Оценка на опитите с лабораторни животни

За оценките беше използван двустранен Т-тест на Стюдънт с граница на значимост $p < 0.05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Лабораторни опити с плъхове

Използвани са тримесечни 54 бели мъжки полово зрели плъха линия Wistar, разпределени в три групи с по 3 подгрупи във всяка основна група:

I група (6 бр.) - контрола

(6 бр.) - третирани с фруктоза 10%-разтвор, р.о. (във водата за пиене).

(6 бр.) – третирани със слънчоглед, ядки, сланина (за предизвикване на затлъстяване)

Тези животни бяха третирани в продължение на 45 дни и след това разпределени в следните групи:

II група (6 бр.) - контрола

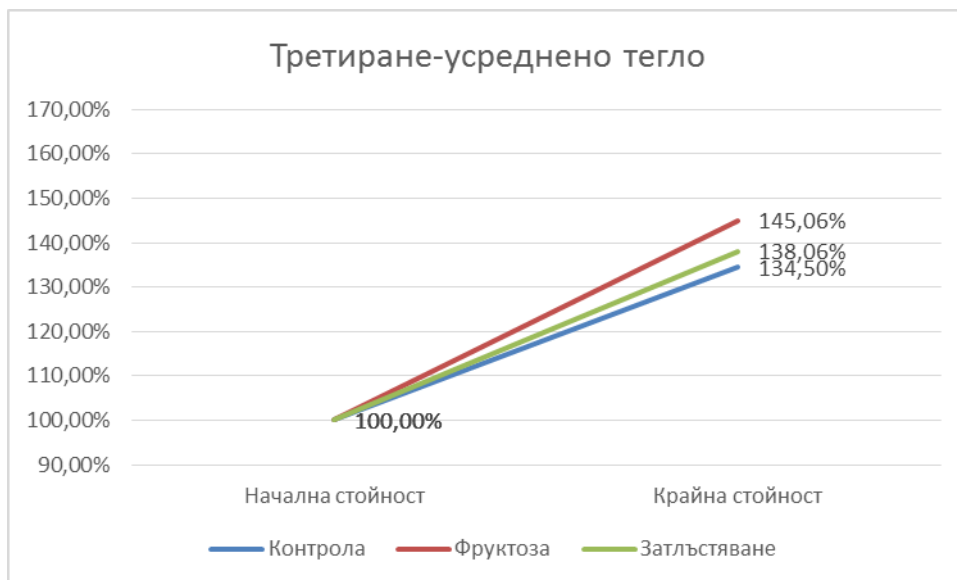
(6 бр.) - третирани с фруктоза + пробиотик
доза на пробиотик- 1гр/кг-тегло р.о. (чрез сонда)

(6 бр.) - затлъстяване + пробиотик

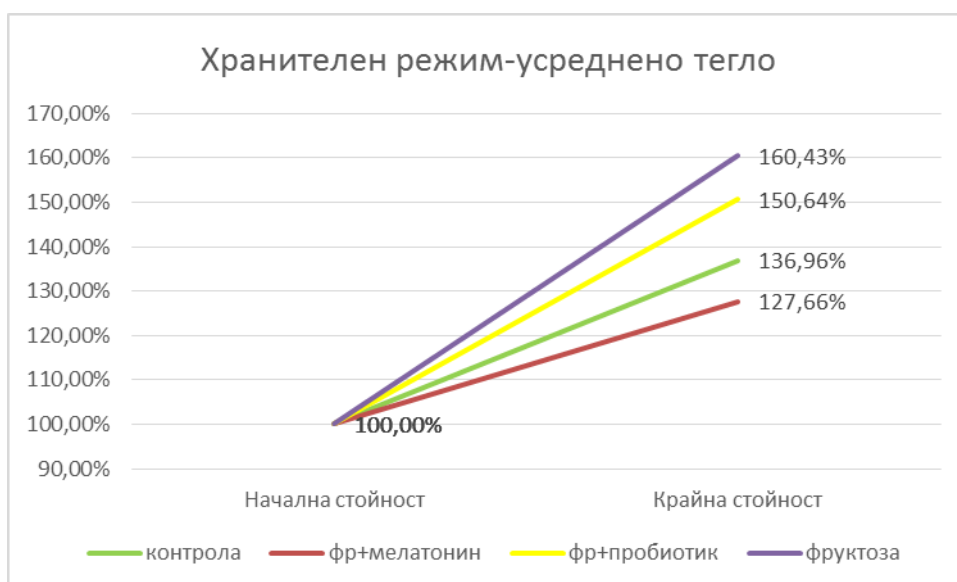
III група (6 бр.) - контрола

(6 бр.) - третирани с фруктоза + мелатонин
доза на мелатонин- 20мг./кг.-тегло р.о. (чрез сонда)

(6 бр.) - затлъстяване + мелатонин



Фиг. 1. Процентна промяна в теглото на експериментални плъхове на следните три групи- контроли, третирани с фруктоза и подложени на затлъстяване след 45 дни. Не се наблюдава статистически значима разлика между крайните стойности на теглото между контролите и двете тестови групи ($p=0.17$ за сравнението контроли-фруктоза; $p=0.74$ за контроли-затлъстяване; използван е двустранен Т-тест на Стюдънт).



Фиг. 2. Процентна промяна в телесното тегло на експериментални плъхове от четирите групи. (Т-тест на Стюдънт; за сравнението на контролите с групите третиранис мелатонин $p=0.12$, пробиотик $p=0.008$, чиста фруктоза $p=0.006$)

Извод: Групата плъхове третиранис само с фруктоза показва най-бързо покачване на теглото. Прибавянето на пробиотик или мелатонин показва забавяне в покачването на теглото ($p=0.22$ за пробиотика с тенденция за по-слабо увеличение на теглото, $p=0.003$ за мелатонина при извършен Т-тест на Стюдънт), което говори за благоприятния ефект на тези субстанции върху животински модели третиранис в продължение на 45 дни с фруктоза.

Изследвания върху трибестан

Трибестан е природен продукт, за който има данни че повлиява въглехидратната обмяна. Задача на настоящето изследване беше да се определят неговите ефекти върху телесното тегло и показателите на въглехидратната обмяна на експериментални плъхове. Използвани са 18 бели мъжки половозрели плъха на възраст 3 месеца, разпределени в три групи:

I група (6 бр.) - контроли

II група (6 бр.) - третиранис с фруктоза

III група (6 бр.) - третиранис с фруктоза и трибестан

доза на трибестан- 250мг./кг.-тегло р.о. (чрез сонда)

Таблица 2. Средно тегло на опитите животни и глюкоза на гладно

I гр. контрола - начално тегло	II гр., третирана с фруктоза - начално тегло	III гр., третирана с фруктоза - начално тегло
150 g ± 10 g	155 g ± 15 g	152 g ± 10 g
Контрола - тегло след 45 дни	II гр., третирана с фруктоза - тегло след 45 дни	III гр., третирана с фруктоза тегло след 45 дни

267 g ± 15 g	293 g ± 15 g	257 g ± 25 g
Контрола <i>тегло след 15 дни</i>	II гр. фруктоза <i>тегло след 15 дни</i>	III гр., третирана с фруктоза + трибестан- <i>тегло сл. 15 дни</i>
302 g ± 25 g	320 g ± 30 g	290 g ± 40 g
Контрола <i>- глюкоза на гладно</i>	II гр., третирана с фруктоза - глюкоза на гладно	III гр., третирана с фруктоза+трибестан-глюкоза на гладно
5,3 mmol/l ± 0.4	5,4 mmol/l ± 0.5	5,6 mmol/l ± 0.4

Извод: Резултатите не показаха статистически значима разлика ($p=0.52$ за контроли-фруктоза, $p=0.46$ за контроли-фр/трибестан; резултатите са от двустранен T-тест на Стюдънт) в теглото и глюкозата на гладно при третираните с трибестан животни в сравнение с останалите групи плъхове. Необходими са допълнителни изследвания, свързани с адаптиране на дозата и увеличаване продължителността на експеримента

4.2. Резултати от изследвания по проекта НИРДИАБО²

Таблица 3. Общ брой участници – мъже и жени, разпределени в три възрастови групи и утвърдени след скрининг за стартиране с първият етап на диетичен режим с пробиотик

Общ брой участници	220
Жени (общ брой)	179
• На възраст от 25 до 40 години	41
• На възраст от 41 до 60 години	95
• На възраст от 61 до 70 години	43
Мъже (общ брой)	41
• На възраст от 25 до 40 години	15

² В изследването не са включени участници на възраст < 25 г. и > 70 г.

• На възраст от 41 до 60 години	17
• На възраст от 61 до 70 години	9

На таблицата са представени участниците в НИРДИАБО, които са утвърдени след скрининг. Те включват доброволци от София, Пловдив и Плевен.

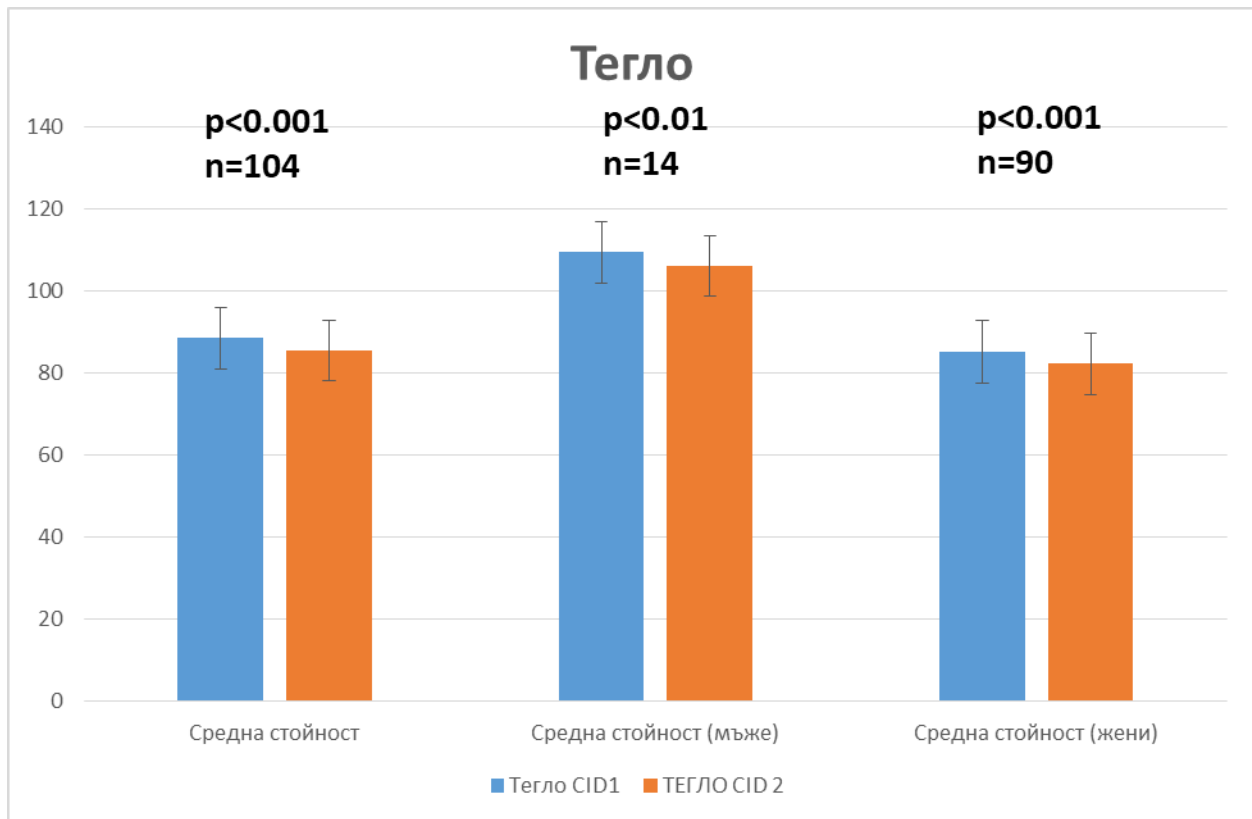
Критериите за включване в проекта са: ВМІ- над 25кг/м², възраст: 25-70 год., добро общо здравословно състояние, доброволно подписано информирано съгласие, нарушен глюкозен толеранс.

Критерии непозволяващи включване в проекта: диагностициран захарен диабет, клинично-значими активни сърдечно-съдови заболявания (инфаркт на миокарда, мозъчен инсулт през последните 6 месеца и/или сърдечна недостатъчност), участници, занимаващи се със състезателни спортове, специални диети (например вегани, диета на Аткинс) в рамките на 2 месеца преди да започне изследването, употреба на наркотични вещества, психиатрично заболяване, бременни или кърмачки, лица без достъп до мобилен телефон или интернет (това е необходимо за контакт от страна на инструктора по време на етапа на поддържане на теглото), недобра комуникация на езика, на който се провежда проучването.

Таблица 4. Общ брой участници от трите изследователски центъра (София, Пловдив и Плевен), разпределени са по пол и възраст

	София	Пловдив	Плевен	ОБЩО
Общ брой участници	162	30	28	220
Жени (общ брой)	128	26	22	176
• На възраст от 25 до 40 г.	30	6	5	41
• На възраст от 41 до 60 г.	66	17	12	95
• На възраст от 61 до 70 г.	35	3	5	43

Мъже/общ брой	31	4	6	41
• На възраст от 25 до 40 г.	10	2	3	15
• На възраст от 41 до 60 г.	13	2	2	17
• На възраст от 61 до 70 г.	8	0	1	9



Фигура 3. Тегло – общо (мъже и жени) на участници в НИРДИАБО при CID 1 – преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 – след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. Визита 6 е визитата на CID 2, когато лекарят е определил показателите на тегло, на общо здраве и е измерил участника с апарат Танита. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка.

Извод: Участниците от двата пола намалиха статистически значимо теглото си след двумесечния режим на хранене с нискокалорична диета и пробиотик. Всички постигнаха 5% намаляване на теглото, а 40% от

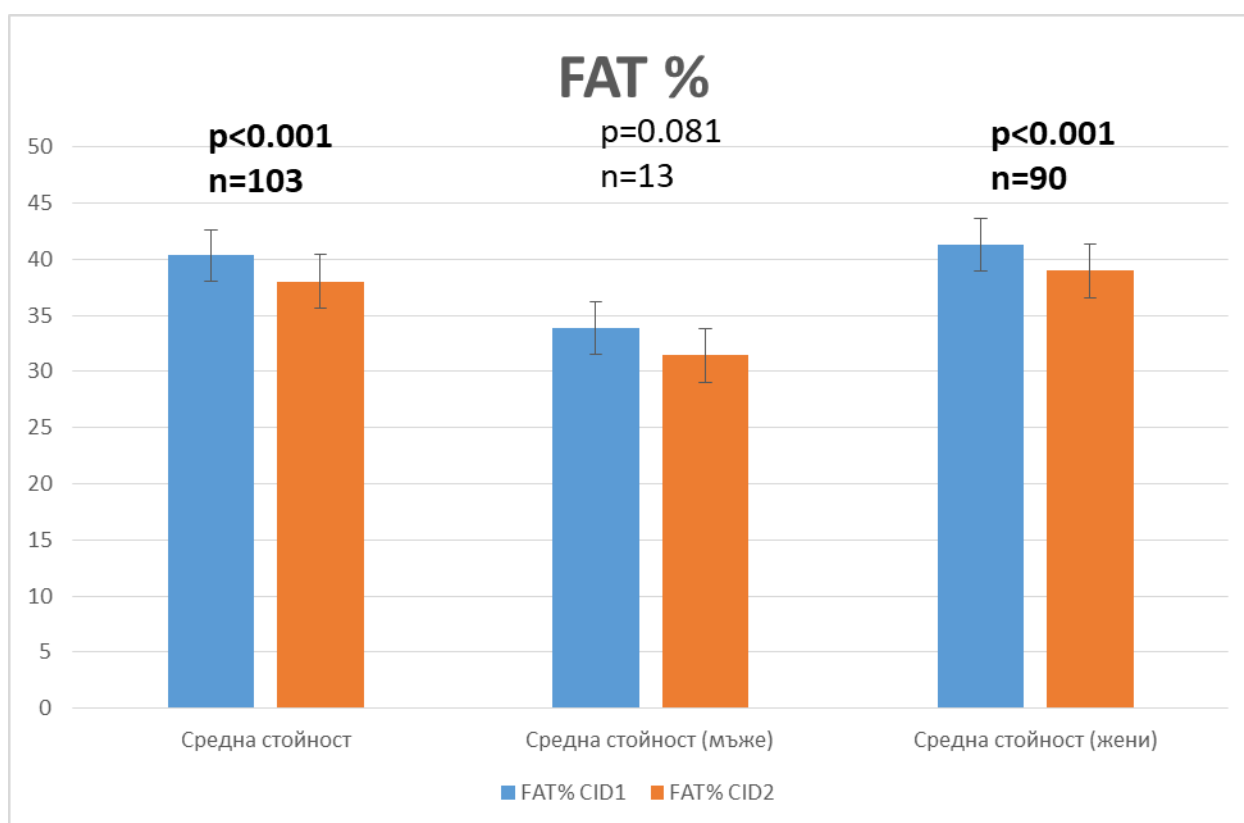
участниците постигнаха над 5% намаляване на теглото (съответно от 8 до 14%). Анализът на резултатите показва, че по-голям процент на намаляване на теглото се наблюдава при тези участници с по-високо телесно тегло.

Сравнено е телесното тегло на мъжете – участници в проекта НИРДИАБО при СИД 1 преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при СИД 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик.

Извод за мъжете: *Статистически значимо е намалено теглото на мъжете, участници в НИРДИАБО ($p < 0.01$). Отражено е средното тегло, но някои от мъжете намалиха теглото си с 10-12 kg за 2 месеца.*

Сравнено е теглото на жените - участници в НИРДИАБО при СИД 1 – преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при СИД 2 – след завършване на 2-месечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик.

Извод за жените: *Теглото на жените е намалено след двумесечна нискокалорична диета плюс пробиотик.*



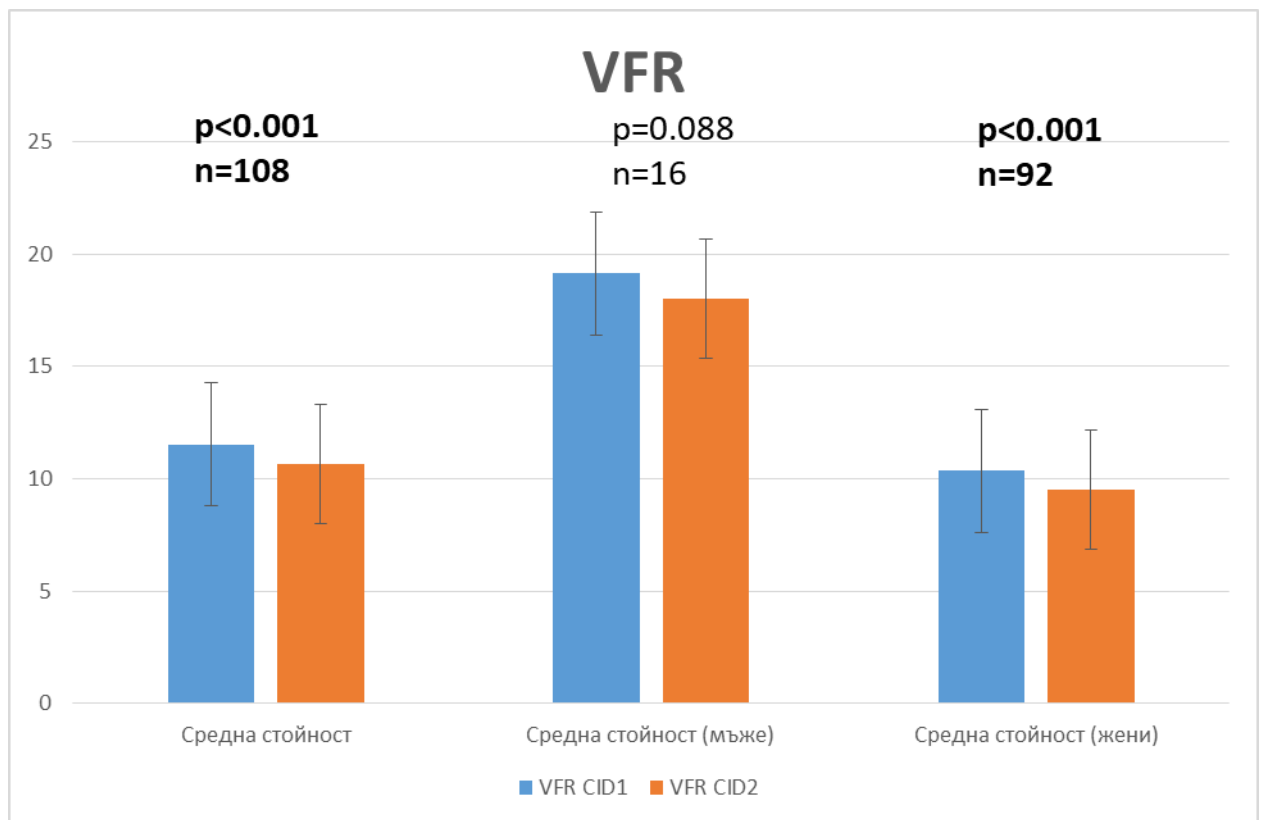
Фигура 4. Процент мазнини общо за мъже и жени - участници в НИРДИАБО при CID 1 преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка.

Чрез апарат Танита се измерват, както теглото, така и мазнините в организма на всеки участник. Танита определя и процента на мазнини спрямо теглото, което е важен показател за степента на затлъстяване. Намалването на процента на мазнини беше отчетено при всички участници след 2-месечен период на диета + пробиотик.

Извод: *Под влияние на 2-месечен хранителен режим с ниско калорична диета + пробиотик се отчете намаляване на процента мазнини в тялото на участниците от двата пола. ($p < 0.001$).*

Сравнен е процентът на мазнини при мъже – участници в НИРДИАБО при CID 1 преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 – след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. Наблюдава се тенденция за намаляване на процента на мазнини при мъже под влияние на 2-месечния хранителен нискокалоричен режим (р има гранична стойност).

Сравнен е процентът на мазнини при жени – участници в НИРДИАБО при CID 1 – преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. Наблюдава се намаляване на процента на мазнини при жени под влияние на 2-месечния хранителен ниско калоричен режим. Намаляването е статистически значимо при $P < 0.05$ за жените ($p < 0.001$).



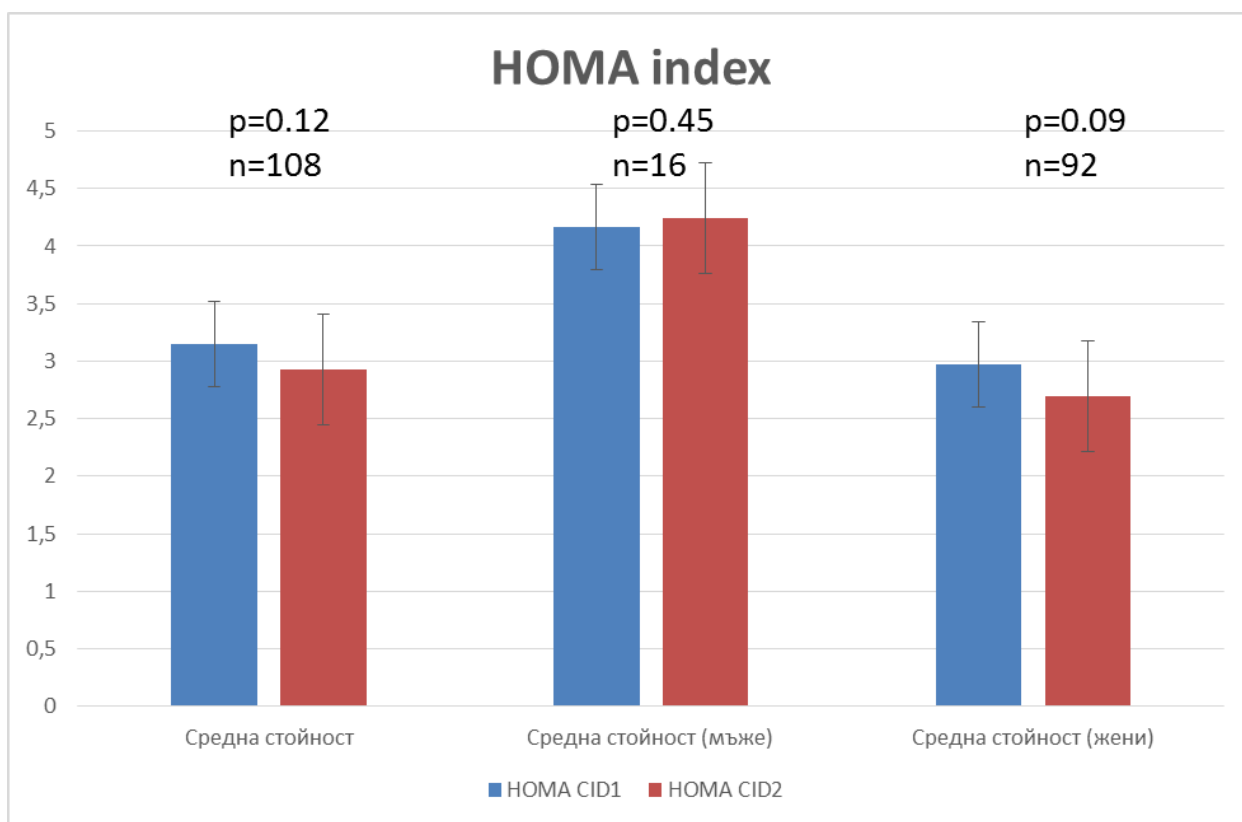
Фигура 5. Рейтинг на висцералното затлъстяване при мъжете и жените, участници в проекта НИРДИАБО, при CID 1 преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик ($p < 0.001$). Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка.

Висцералното затлъстяване е рисково за развитие на предиабет – факт, който редица изследователи съобщават при клиничните си наблюдения. С помощта на Танита се отчита и степента на висцерално затлъстяване за всеки участник в НИРДИАБО. Фигурата представя общо за мъже и жени отчетените резултати чрез Танита за висцерално затлъстяване преди и след 2-месечния режим на интервенция с ниско калорична диета. И при този показател се отчита ефект на диетата в комбинация с пробиотик. Намалява се *висцералното затлъстяване* при мъже и при жени.

Извод: *Двумесечният период на интервенция с ниско калоричен диетичен режим + пробиотик намалява рейтинга на висцерално затлъстяване на участниците (мъже и жени) в проект НИРДИАБО.*

Изследван е рейтингът на висцералното затлъстяване при мъжете - участници в НИРДИАБО при CID 1 преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. Установено е, че висцералното затлъстяване показва тенденция към намаляване при мъже след двумесечен период на ниско калорична диета + пробиотик (p е гранично).

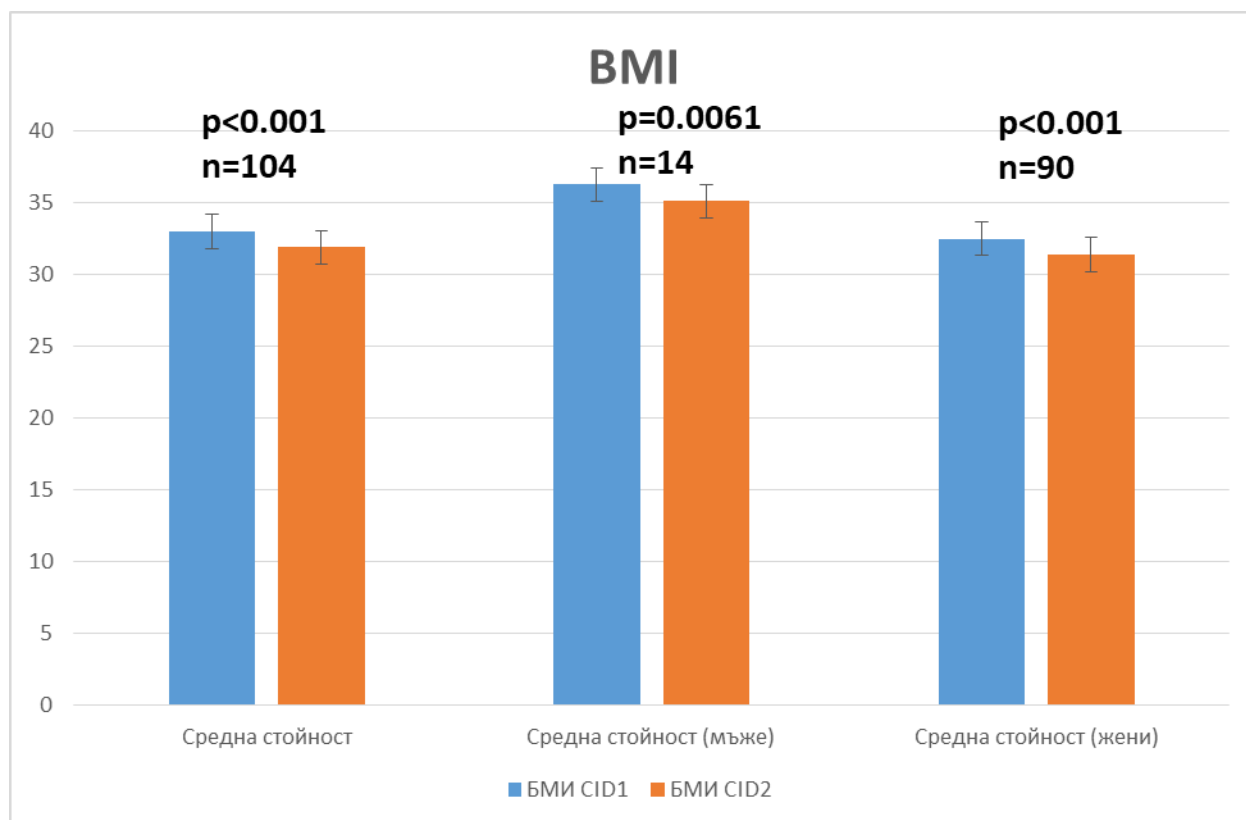
Изследван е рейтингът на висцералното затлъстяване при жените участници в НИРДИАБО при CID 1 преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. Висцералното затлъстяване намалява статистически значимо при жени след двумесечен период на ниско калорична диета + пробиотик ($p < 0.05$) между CID 1 и CID 2 ($p < 0.001$).



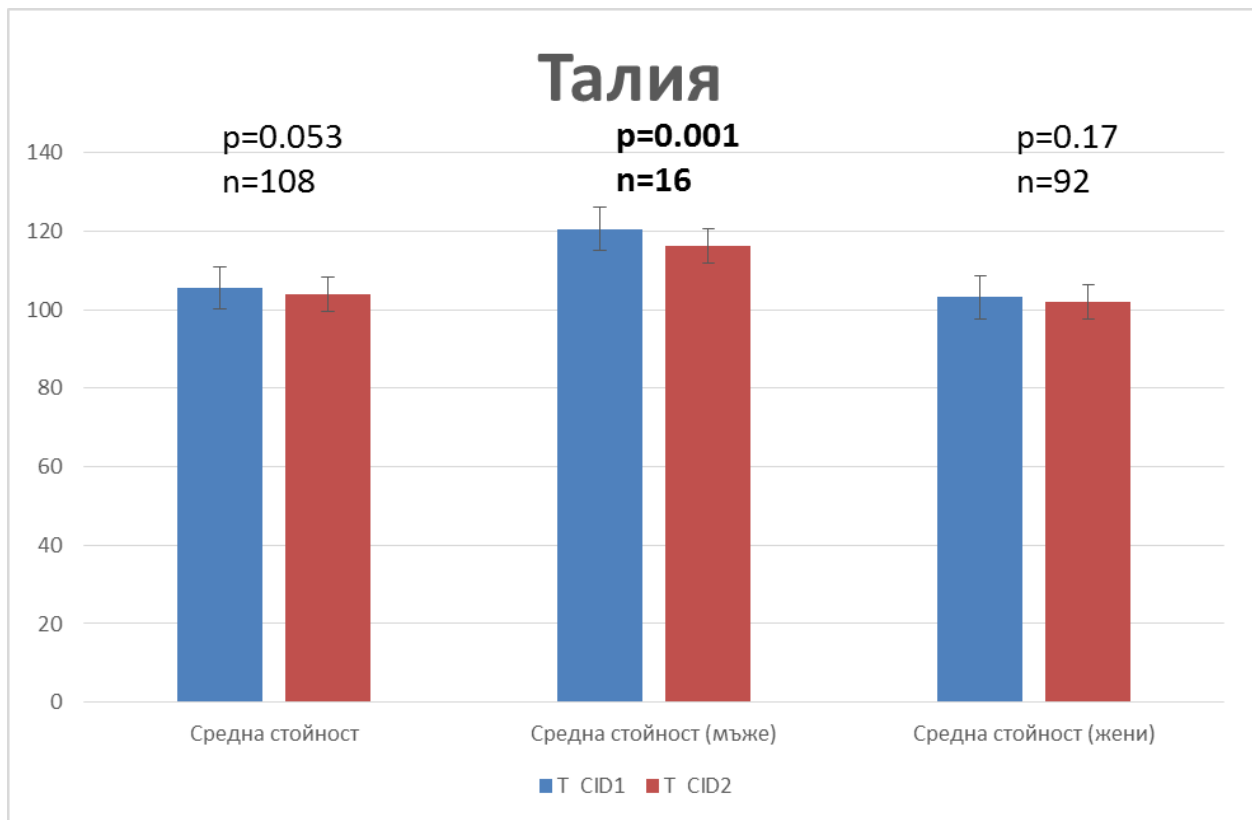
Фигура 6. НОМА – общ (мъже и жени) участници в НИРДИАБО при CID 1 – преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка.

За всеки участник в НИРДИАБО е изчислен НОМА индекс за риска от развитие предиабет. На фигурата е представен средният НОМА индекс за мъже и жени. Сравнителните изследвания между мъже и жени показват, че мъжете са с по-висок НОМА индекс, а жените са с по-нисък НОМА индекс преди стартиране на двумесечния период. След двумесечния период НОМА индексът има тенденция за намаление ($p=0.09$) при жените, което определя намаляване на риска от ЗД.

Извод: Двумесечният период на нискокалорична диета с пробиотик намали НОМА индекс при жени - участници в проект НИРДИАБО.



Фигура 7. BMI при мъже и жени - участници в НИРДИАБО при CID 1 – преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. BMI е намален, както при жени, така и при мъже под влияние на нискокалоричния режим на хранене с пробиотик. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка.



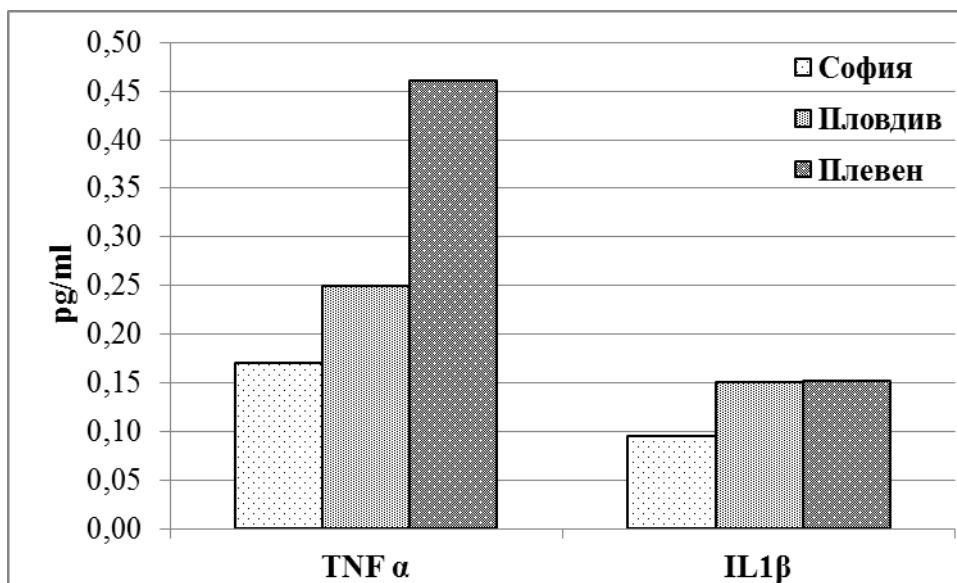
Фигура 8. Талия при мъже и жени - участници в НИРДИАБО при CID 1 – преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 – след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка.

Извод: Талията е намалена при мъжете под влияние на нискокалоричния режим на хранене с пробиотик. ($p=0.001$)

Резултати от определяне на цитокини в кръв на участниците преди стартиране на нефармакологичните интервенции с диети.

На фиг. 9. и 10. са представени резултатите от определяне на серумните нива на $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$ в кръв на мъже и жени, участници в НИРДИАБО. Цитокините са изследвани с ELAISA методи.

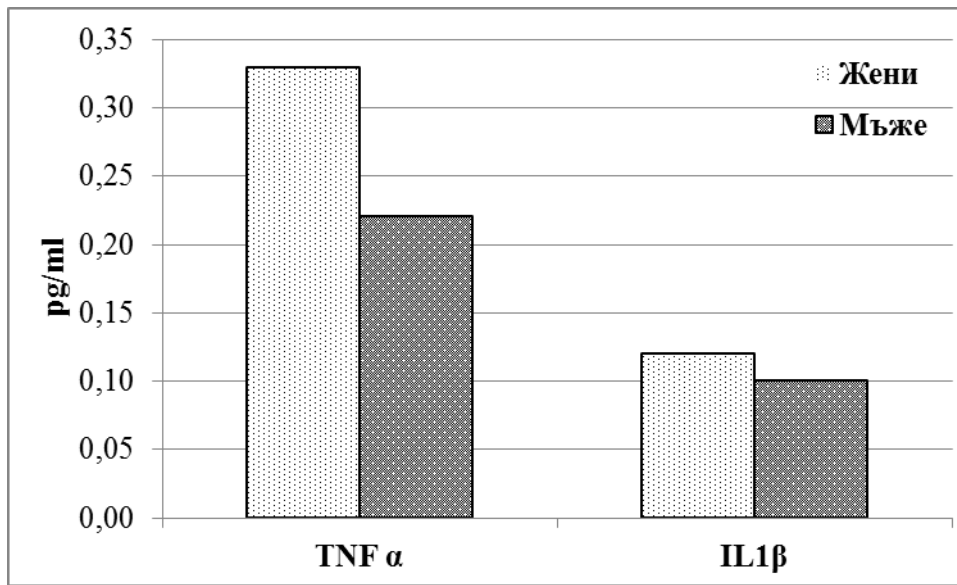
На фиг. 9 са представени серумните нива на $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$ на 220 мъже и жени със затлъстяване и предиабет от три географски района на България – София, Пловдив и Плевен. Има статистически значима разлика (Т-тест на Стюдънт, $p < 0.05$) в нивата на $\text{TNF}\alpha$ в серума на доброволците на трите научно-изследователски центъра. Статистически значима разлика се наблюдава и в нивата на $\text{IL-1}\beta$ при доброволците от Пловдив и Плевен в сравнение със София.



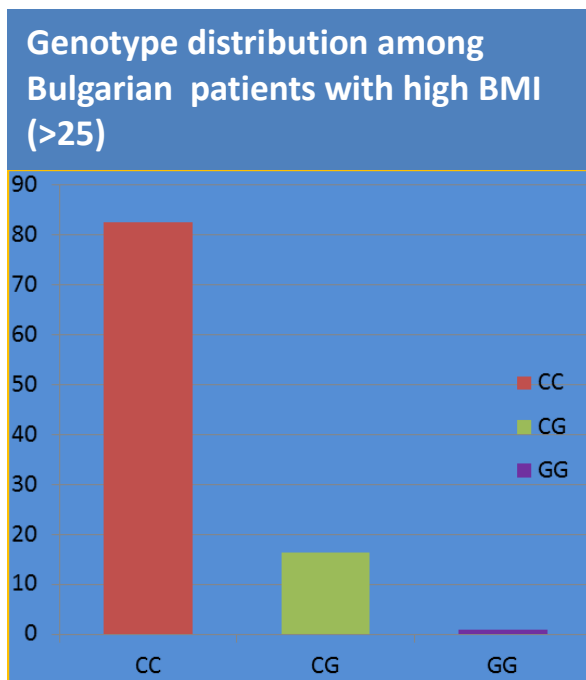
Фиг. 9. Серумни нива на $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$ при доброволци от трите научно-изследователски центъра – София, Пловдив и Плевен ($p < 0.05$).

На фиг. 10. са представени резултатите от определянето на серумните нива на $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IL1}\beta$ на доброволците, като е направено сравнение по пол.

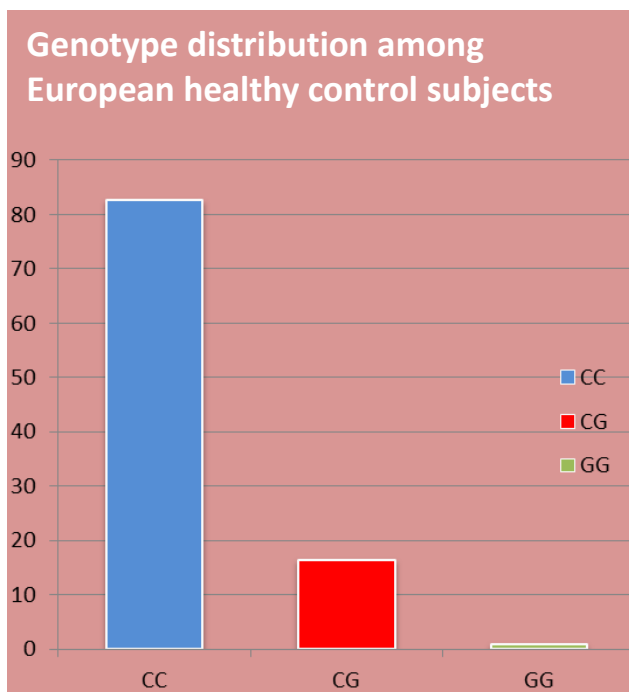
Статистически значима разлика се установява в нивата на $\text{TNF}\alpha$ между двете групи ($p < 0.05$). По-високо серумно съдържание на $\text{TNF}\alpha$, се наблюдава при жените в сравнение с мъжете. Нивото на $\text{IL-1}\beta$ при жените е по-високо отколкото при мъжете, но няма статистически значима разлика между тях.



Фиг. 10. Серумни нива на $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IL-1}\beta$ при доброволци от трите научно-изследователски центъра, разделени по полов признак



Фиг.11. Генотипно разпределение на Peroxisome Proliferator Activated Reseptor Gamma (*PPARG*) сред български пациенти с висок ВМІ (>25кг/м²) (CC: 82,6%, CG: 16,4%, GG: 1%)



Фиг.12. Генотипно разпределение на Peroxisome Proliferator Activated Reseptor Gamma (*PPARG*) сред здрави европейци (CC: 86%, CG: 13%, GG: 1%)

1%) Използвани са данни от: Online Mendelian Inheritance in Man® An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders и dbSNP.

Извод: *Не се наблюдава статистически значима разлика между двете групи ($p > 0.5$)*

Таблица 5. Резултати от статистически тестове за асоциация на редките алели на изследваните варианти в гените PPARG (rs1801282, алел G), FTO (rs9939609, алел A) и TCF7L2 (rs7903146, алел T) и техни комбинации. Начините на представяне на НОМА и ВМІ индексите са описани в **3.6.2. Статистически методи.**

	НОМА CID1 реални стойности	НОМА CID1 ниски/високи	ВМІ съотношение	ВМІ намалени/ Повишени	НОМА съотношение	НОМА кодирана промяна
TCF7L2	0.82	0.77	0.057	0.20	0.40	0.76
FTO	0.38	0.64	0.078	0.10	0.88	1
PPARG	0.69	0.76	0.86	0.81	0.56	0.63
TCF7L2/FTO	0.53	0.69	0.52	0.89	0.04	0.40
FTO/PPARG	0.78	0.49	0.57	0.79	0.91	1
TCF7L2/PPARG	0.23	0.35	0.51	0.26	0.24	1

Наблюдава се значима асоциация на комбинацията на редките алели на rs7903146 и rs9939609 с повишаването на стойността на НОМА-индекса. **Тази алелна комбинация (rs7903146-T/rs9939609-A) се оценява като рискова, с OR=2.56 (тези два алела се срещат два и половина пъти по-често при пациенти, които показват повишение в НОМА индекса като абсолютна стойност).** Тези резултати могат да се използват за оценка на риска от развитие на инсулинова резистентност у предразположени пациенти.

Таблица 6. Брой и честоти на алелите, използвани в тестовете за асоциация на редките алели на разглежданите варианти и техни комбинации. Честотите са посочени само за редките алели.

	НОМА CID1 реални стойности 272 алела, 136 пациента	НОМА CID1 ниски/високи 272 алела, 136 пациента	ВМІ съотношение 208 алела, 104 пациента	ВМІ намалени / Повишени 208 алела, 104 пациента	НОМА съотношение 178 алела, 89 пациента	НОМА кодирана промяна 42 алела, 21 пациента
TCF7L2	T: 94 C: 178	Ниски (0.3533 T) 41T:81C Високи (0.3361 T) 53T:97C	T: 66 C: 142	Ниски (0.2989 T) 52T:122C Високи (0.4118 T) 14T:20C	T: 53 C: 125	Ниски (0.3846 T) 7T:9C Високи (0.4375 T) 10T:16C
FTO	A: 125 T: 147	Ниски (0.4754 A) 58A:64T Високи (0.4467 A) 67A:83T	A: 94 T: 114	Ниски (0.477 A) 83A:91T Високи (0.3235 A) 11A:23T	A: 80 T: 98	Ниски (0.4231 A) 11A:15T Високи (0.4375 A) 7A:9T
PPARG	G: 23 C: 249	Ниски (0.0902 G) 11G:111C Високи (0.08 G) 12G:138C	G: 22 C: 186	Ниски (0.1034 G) 18G:156C Високи (0.1176 G) 4G:30C	G: 20 C: 158	Ниски (0.0769 G) 2G:24C Високи (0.125 G) 2G:14C
TCF7L2/FTO	ТА: 66 Други: 206	Ниски (0.2541 ТА) 31ТА:91-- Високи (0.2333 ТА) 35ТА:115--	ТА: 41 Други: 167	Ниски (0.1954 ТА) 34ТА:140-- Високи (0.2059 ТА) 7ТА:27--	ТА: 29 Други: 149	Ниски (0.1154 ТА) 3ТА:23-- Високи (0.25 ТА) 4ТА:12--
FTO/PPARG	AG: 17 Други: 255	Ниски (0.0533 AG) 8AG:142-- Високи (0.0738 AG) 9AG:113--	AG: 16 Други: 192	Ниски (0.0747 AG) 13AG:161-- Високи (0.0882 AG) 3AG:31--	AG: 14 Други: 164	Ниски (0.0385 AG) 1AG:25-- Високи (0.0625 AG) 1AG:15--
TCF7L2/PPARG	TG: 15 Други: 257	Ниски (0.0410 TG) 5TG:117-- Високи (0.0667 TG) 10TG:140--	TG: 15 Други: 193	Ниски (0.0632 TG) 11TG:163-- Високи (0.1176 TG)	TG: 12 Други: 166	Ниски (0.0769 TG) 2TG:24-- Високи (0.0625 TG) 1TG:15--

5. ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от проведените изследвания върху доброволци мъже и жени с предиабет и затлъстяване документират, че ежедневното прилагане на комбинацията от ниско калорична диета с пробиотик в продължение на два месеца подобрява общото състояние, както на мъже, така и на жени. Поизразено намалява теглото и НОМА индекса при жени, а ВМІ се понижава при двата пола. Посочените ефекти очаквано са придружени с намаляване процента на масти в организма при двата пола. Намалява обиклката на талията, което е по-отчетливо изразено при мъже. Факторът VFR намалява при двата пола. Резултатите показват нивото на провъзпалителни цитокини (TNF-alpha, И-1-beta) в серума на жени и мъже, в началото на проучването, когато се установяват по-високи концентрации при жените. Част от жените в проучването съобщаваха за ставни изменения, вследствие увеличеното тегло. Възможно е хронично ставно възпаление да е отговорно при част от жените с висок ВМІ за по-големите концентрации на TNF α . Това допускане се подкрепя и от данни в литературата за ролята на този цитокин в механизмите на хроничните ставни възпаления.

За първи път се документират факти от генома на участниците с промени на гени, отговорни, както за предиабет, така и за затлъстяване.

ЗД е широко разпространено заболяване, което през последното десетилетие се развива като епидемия в целия свят. Ежегодно се увеличава броят на новодиагностицираните пациенти с диабет тип 2 (Mathers CD and Loncar D., 2006). Анализът на литературните данни подсказва връзка между затлъстяването и развитието на ЗД тип 2 (Haslam DW, James WP

2005). При затлъстяване се увеличава производството на про-възпалителни цитокини (TNF α , IL-1 β и др.), в кръвта на мъже и жени.

Има данни, че тези цитокини повлияват рецепторите за инсулин и водят до развитие на *инсулинова рецепторна резистентност*. При пациенти със затлъстяване, установявахме високи нива на инсулин (от клинично-лабораторните изследвания). Различни са механизмите на развитие на инсулинова резистентност. Резултатите от настоящите изследвания показват, че експерименталната инсулинова резистентност, предизвикана с продължително хранене с фруктоза на плъхове, може да доведе до по-бързо покачване на телесното тегло.

През последните години различни автори, включително и български, се фокусират върху състоянието на предиабет, което се среща при пациенти преди диагностициране на ЗД тип 2. Едни от първите фармакологични изследвания в това направление са съобщени в дисертационния труд на Н. Бояджиева (1988). Там е документирано развитието на предиабет при плъхове, третирани с психотропни (нехормонални) средства. При хора се диагностицира предиабет, когато сутрешната захар на гладно е между 5,9 и 6,8. Това е фаза на развитие на промени във въглехидратната обмяна, при които организмът все още компенсира.

Важен елемент на профилактика на ЗД е да се осигури хранителен правилен режим в съчетание с физическа активност, за да се потисне развитието на това социално значимо заболяване още във фаза на предиабет. Такава е и целта на настоящото проучване, при което се извършиха изследвания върху доброволци с предиабет и различна степен на затлъстяване. Ниско калоричната диета беше определена от диетолози в размер на 1200 ккал/дневно, като храната включваше рационални комбинации на белтъци, мазнини и въглехидрати, повече зеленчуци и плодове, богати на витамини. Важен елемент на хранителния подход е разпределение на храните в пет хранения през деня (закуска, предобедна

закуска, обяд, следобедна закуска, вечеря). Този хранителен режим беше съчетан с ежедневна употреба на пробиотик и прилаган в продължение на два месеца на 220 доброволци (41 мъже и 179 жени).

Пробиотиците са класифицирани като *хранителни добавки*. Те представляват *сухи прахообразни вещества, съдържащи най-често лактобацилус булгарикус*. Този микробен агент е сред т.нар. положителни микроорганизми, които балансират с отрицателните за поддържане на нормалната чревна флора. Различни ефекти са доказани при изследвания през последните 20 години – стомашно-чревни, противовъзпалителни, имуноактивиращи и др.

През последните години се разработиха и внедриха различни пробиотици, един от които беше подбран за настоящото проучване на база на висока концентрация на лактобацили. Приемането на този пробиотик дневно в продължение на 2 месеца заедно с нискокалорийна диета доведе до подобряване на показателите на мастна и въглехидратна обмяна (данни от анализ на клинично-лабораторните резултати) на мъже и жени – доброволци в проучването. Допускаме, че продължителният прием на този пробиотик подобрява метаболитните функции на организма, хомеостазата в чревния тракт, намалява отлагането на мазнини и подобрява енергийният обмен при доброволците.

Предполагаме, че ниско калоричната диета потенцира благоприятните ефекти на пробиотика върху организма и намалява риска от натрупване на мазнини при хората с предиабет и затлъстяване. Допускаме, че при пациентите със затлъстяване и предиабет е нарушен т.нар. нормален микробиом. През последните години се натрупаха познания за човешкия микробиом и неговата огромна роля в патогенезата на 80-90% от заболяванията. В литературата са изказани хипотези, че при нарушаване на микробиома може да се развие ЗД.

Допускаме, че употребата на пробиотик ще подобри микробиома, ще окаже противодействие на патогенната микрофлора и с това ще се намали риска от увреждане на бета-клетките на панкреаса и риска на клетъчно ниво, който е свързан с рецепторите на инсулин. Резултатите от настоящите проучвания документират ефективност на изследваната комбинация от ниско калориен хранителен режим + пробиотик с намаляване на антропометричните и клинично-лабораторни показатели.

В настоящото проучване са документирани нови факти относно ролята на генотипа на изследваните варианти в развитието на предиабет при хора със затлъстяване. *За първи път се установяват промени*, в гени, които са отговорни за развитие на ЗД или за затлъстяване. При настоящото проучване се документира полиморфизмът rs1801282 в *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma* (PPARG) при доброволци. От анализиранияте 220 пациенти от три области на България (София, Пловдив и Плевен) пациентите с висок BMI показаха генотипно и алелно разпределение (CC: 82,6% CG: 16,4%, GG: 1%) подобно на това при европейската популация (CC:86%, CG:13%, GG:1%) (dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Отчитайки *ролята на PPARG гена* в ЗД тип 2 (Online Mendelian Inheritance in Man® An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders и dbSNP). може да се заключи, че *този ген не се асоциира с развитието на предиабет в популация българи със затлъстяване.*

При настоящите проучвания бяха изследвани още два гена - Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) и Fat mass and obesity-associated protein (FTO). За първи път се съобщават резултати от изследвания върху българи със затлъстяване и предиабет на посочените гени. В литературата е осветлена ролята на FTO и TCF7L2 в развитието на затлъстяване (Ali O. 2013). За първи път са документирани честотите на изследваните полиморфизми при български пациенти със затлъстяване и предиабет (**Таблица 6**).

Анализирането на НОМА индекса и степента на затлъстяване в комбинация с генетичните изследвания показва роля на генотипа на участниците в научния проект при техния отговор към двумесечния ниско калоричен хранителен режим и приемането на пробиотик. Анализът на отделните генотипи и намерените значими различия между участниците внася новост в литературата и предлага обяснение на факта, че участниците носещи алелната комбинация *rs7903146-T/rs9939609-A* се повлияват по-слабо (ако изобщо) от хранителния режим с пробиотик, а останалите проявяват по-бърз отговор на двумесечното третиране.

В настоящото проучване бяха включени мъже и жени на зряла възраст. Анализът на резултатите показва, че има различия при някои от измерените показатели в отговора на мъже и жени към ниско калоричния режим с пробиотик. Разпределението на мазнините в организма също се повлиява по-значимо при жените в сравнение с мъжете. В подкрепа на полови различия са намерените по-значими концентрации на двата провъзпалителни цитокини TNF alfa и IL-1beta при жените в сравнение с тези при мъжете. Резултатите дават основание да се направи заключението, че съществуват различия между мъже и жени със затлъстяване и предиабет в отговора им към ниско калоричен диетичен режим с пробиотик.

В настоящото проучване бяха проведени фармакологични експерименти и е създаден модел на инсулинова резистентност чрез фруктоза с определяне ефекти на мелатонин и на пробиотик върху теглото. Резултатите показват, че животните третирани с фруктоза за двумесечен период от време могат да проявят тенденция към увеличение на теглото. Хроничното третиране с пробиотик забавя увеличаването на теглото $r=0,22$, което корелира с посочените по-горе резултати от изследвания при хора. Получените резултати с пробиотик се подкрепят и от изследванията в дисертационен труд на д-р Г. Богданов (2016). Други автори съобщават също за развитие на инсулинова резистентност след продължително третиране с фруктоза

(Basciano, H., Federico, L. & Adeli, Khosrow, 2005). Изследванията с мелатонин показват също намаляване на теглото на мъжки плъхове с развит модел на инсулинова резистентност чрез продължително въвеждане на фруктоза. Известно е, че мелатонинът е важен хормон с роля в регулация на мозъчни функции, метаболизма и циркадните ритми (Carrillo-Vico, et al., 2005). Получените резултати дават основание да допуснем, че този епифизен хормон повлиява централно механизмите на регулация на апетит и съответно води до намаляване на теглото. В хода на фармакологичните изследвания бяха проведени опити с екстракт от растението *Tribulus terrestris L.* (препарат Tribestan®). Хроничното въвеждане на трибестан след 45-дневно третиране с фруктоза не доведе до статистически значимо намаляване на теглото в сравнение с контролната група. Очакванията за ефект на трибестана върху въглехидратната обмяна не се потвърдиха. При определяне на глюкоза в кръв няма данни за намаление на концентрациите при животните, третирани с трибестан, но тези ефекти не са статистически значими.

Резултатите от научните изследвания върху цитокини в кръв на доброволци, участващи в проект НИРДИАБО, демонстрират увеличени концентрации на два провъзпалителни цитокини при хора със затлъстяване и предиабет. Предиабетът е документиран чрез ОГТТ и изчислен НОМА индексите на база плазмена концентрацията на глюкоза и инсулин на гладно. ВМІ на всички участници е над 25кг/м². Резултатите от представеното изследване подкрепя хипотезата, че възпалението има роля в механизми на затлъстяване.

Водещи провъзпалителни цитокини като TNF α и IL-1 β са представени от други автори като отговорни в патогенезата на затлъстяването и ЗД тип 2 (Hotamisligil et al., 1995; Kern et al., 1995). Нашето предположение е, че при затлъстяване двата цитокина TNF α и IL-1 β се включват в механизмите на развитие на инсулинова резистентност на ниво инсулинови рецептори. В подкрепа на това са и данни на други автори в литературата. Новост в

проучването за България са различията между участниците от трите областни центъра (София, Пловдив и Плевен). Концентрациите на TNF α в кръв на участниците от Плевен са най-високи в сравнение с тези от София и Пловдив. На база на тези резултати ни предстои да проучим участниците с високи концентрации на провъзпалителни цитокини за прекарани възпалителни заболявания или хронични артрити и други хронични възпаления.

В механизмите на предиабет се включват фактори от мастната тъкан, някои цитокини, стресови въздействия и др. Резултатите от настоящото проучване обогатяват информацията в литературата чрез включване на пробиотик в хранителния режим, което насочва към ролята на човешкия микробиом в механизмите на развитие на предиабет. В подкрепа на това са данните, че пробиотиците повлияват нарушения баланс на микроорганизмите в микробиома.

6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

6.1. Изводи

1. Установено е, че мелатонинът оказва влияние върху тегло и показатели на въглехидратна обмяна на плъхове третирани с фруктоза.
2. Ефектът на пробиотика ЕЛБИВИТ се проучи върху два модела: инсулинова резистентност - натоварване с фруктоза и затлъстяване. Установи се намаляване на теглото на животните.
3. Прилагането на двумесечна ниско калорийна диета плюс пробиотик води до намаляване на теглото на мъже и жени със затлъстяване и предиабет.
4. За първи път е установено, че комбинацията от пробиотик и ниско калорийна диета, прилагани върху хора със затлъстяване и предиабет, подобрява кръвно-захарния профил и показателите на мастната и въглехидратната обмяна.
5. Установени са статистически значими разлики в кръвните нива на TNF-alpha и IL-1beta при участниците в проекта „НИРДИАБО“ разпределени по пол и региони.
6. За първи път се документират изследвания върху три гена на български мъже и жени с предиабет и затлъстяване.

6.2 Приноси

1. За първи път се установи ролята на многократното приложение на пробиотик върху показателите за предиабет при експериментален животински модел на затлъстяване и инсулинова резистентност.
2. Потвърждава се ролята на мелатонин за намаляване на телното на животни с модели на затлъстяване и инсулинова резистентност.
3. За първи път се документира ролята на пробиотик в комбинация с нискокалорична диета върху въглехидратния метаболизъм и антропометричните показатели на хора със затлъстяване и предиабет.
4. Документира се генотипното разпределение на изследвания (PPARG)- ген сред хора с висок ВМІ- индекс ($>25\text{кг./м}^2$), участници в проекта „НИРДИАБО“.
5. За първи път се демонстрира наличието на значима асоциация на комбинацията на двата гена (TCF7L2/FTO) с високи стойности на НОМА-индекса при мъже и жени с предиабет и затлъстяване.

7. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ

7.1. Публикации

1. **Лазаров, Л.**, Т. Ханджиева-Дърленска, Г. Богданов, Д. Пендичева, Д. Димитрова, Н. Бояджиева. Ефект на двумесечна нискокалорийна диета върху теглото и мастната обмяна на хора с предиабет и затлъстяване³
Лекарска практика, бр.2/2017 22-26
2. Каменова, К., **д-р Людмил Лазаров**, д-р Георги Богданов, доц. д-р Теодора Ханджиева-Дърленска, доц. д-р Галя Ставрева, доц. д-р Диана Пендичева, д-р Даринка Димитрова, Росица Методиева, Галина Добревска, проф. д-р Надка Бояджиева. Серумни нива на TNF α и IL-1 β при мъже и жени с различна степен на затлъстяване и предиабет. *Обща медицина* бр.1/ 2016 29-31
3. **Лазаров, Л.**, Н. Бояджиева, Метформин в терапията на диабет тип-2 и влияние върху абсорбцията на витамин В12. *Лекарска практика* бр.2/2015 3-5
4. **Лазаров, Л.**, Инсулинова резистентност- патологично състояние и (или) физиологичен отговор срещу метаболитен стрес в някои тъкани. *Лекарска практика* (под печат бр.3/ 2017г.)
5. Каменова, К, **Л. Лазаров**, Г. Богданов, Т. Ханджиева-Дърленска, Г. Ставрева, Д. Пендичева, Д. Димитрова, Г. Добревска, Р. Методиева, Д. Гетова, Н. Бояджиева. Плазмени нива на лептин, грелин и адипонектин при мъже и жени със затлъстяване и предиабет. *Обща медицина* бр.3/2016 8-12

³ Изследванията са по проекта НИРДИАБО (2015)

6. Kadiyska T., Glushkova M., Lazarov L. Role of the PPARG gene polymorphism rs1801282 in Bulgarian obese adults in the development of prediabetes. *Доклади на БАН* (под печат 2017г.)

7.2. Участия в научни форуми

7. Nadka Boyadjieva, Damianka Getova, Galia Stavreva, **Ludmil Lazarov**, Tania Kadiiska, Teodora Handjieva-Darlenska, Kalina Kamenova, Georgi Bogdanov, Galina Dobrevska, Rosica Metodieva. Scientific project “NIRDIABO: main characteristics, 14th International Symposium „Acad. Tasho Tashev”-Nutrition and obesity, Spetember 4-6 2015, Albena, Bulgaria.

8. Georgi Bogdanov, **Ludmil Lazarov**, Teodora Handjieva-Darlenska, Nadka Boyadjieva, The role of probiotics in the prophylaxis of diabetes mellitus type 2 in subjects with obesity and prediabetes. 14th International Symposium „Acad. Tasho Tashev”-Nutrition and obesity, Spetember 4-6, 2015, Albena, Bulgaria.

9. **Ludmil Lazarov**, Teodora Handjieva-Darlenska, Georgi Bogdanov, Nadka Boyadjieva. The effect of a low-calorie diet with Probiotic on the anthropometric parameters of subjects from Sofia.Data from “NIRDIABO” project. 14th International Symposium „Acad. Tasho Tashev”-Nutrition and obesity, Spetember 4-6, 2015, Albena, Bulgaria.

10. **Ludmil Lazarov**, Georgi Bogdanov, Teodora Handjieva-Darlenska, Nadka Boyadjieva. The effect of a low-calorie diet with Probiotic on the parameters of carbohydrate metabolism obese prediabetic subjects. Data from “NIRDIABO” project.

14th International Symposium „Acad. Tasho Tashev”-Nutrition and obesity, Spetember 4-6 2015, Albena, Bulgaria.

11. Teodora Handjieva-Darlenska, Svetoslav Handjiev, Georgi Bogdanov, **Ludmil Lazarov**, Damianka Getova, Galia Stavreva, Nadka Boyadjieva. Characteristics of the low calorie diet with Probiotic for prophylaxis of diabetes

mellitus type 2 in subjects with obesity and prediabetes. 14th International Symposium „Acad. Tasho Tashev”-Nutrition and obesity, Spetember 4-6 2015, Albena, Bulgaria.

12. **Lazarov L.**, Hadjieva-Darlenska T, Bogdanov G, Stavreva G, Pendicheva D, Getova D, Boyadjieva N. Effect of low calorie diet plus probiotic on obesity parameters. European Obesity Summit 1-4 June, 2016 Gothenburg, Sweden.

13. Handjieva-Darlenska T, Bogdanov G, **Lazarov L.**, Stavreva G, Dobrevska G, Pendicheva D, Dimitrova V, Boyadjieva N. Effect of a low calorie diet combined with a probiotic on carbohydrate metabolism in adults with obesity and prediabetes. European Obesity Summit 1-4 June 2016, Gothenburg, Sweden.

14. Kamenova K., **Lazarov L.**, Handjieva-Darlenska T, Bogdanov G, Metodieva R, Pendicheva A, Stavreva G, Getova D, Boyadjieva N. Effect of a low caloric diet plus a probiotic on cytokines in obese prediabetic adults. European Obesity Summit 1-4 June 2016, Gothenburg, Sweden.

15. **Lazarov L.**, Handjieva-Darlenska T, Bogdanov G, Stavreva G, Pendicheva A, Getova D, Boyadjieva N. Effect of probiotic and low calorie diet on fat distribution at obese people. 2017 International Workshop on “Metabolic diseases: genetics, epigenetics and proteomics”16-20 May 2017 Sofia, Bulgaria

16. Kamenova K., **L. Lazarov**, T. Handjieva-Darlenska, G. Bogdanov, R. Metodieva, D. Pendicheva, G. Stavreva, D. Getova, N. Boyadjieva. Effect of the combination of probiotic with a low caloric diet on immunological parameters in obese adults. 2017 International Workshop on “Metabolic diseases: genetics, epigenetics and proteomics”16-20 May 2017 Sofia, Bulgaria

17. Kadiyska T., Glushkova M., **Lazarov L.** , Getova D., Stavreva G. , Boyadjieva N.

Role of the PPAR γ gene polymorphism rs1808282 in Bulgarian obese adults in the development of prediabetes. 2017 International Workshop on “Metabolic diseases: genetics, epigenetics and proteomics”16-20 May 2017 Sofia, Bulgaria

7. SUMMARY

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a significant global public health problem affecting more than 285 million people worldwide. T2DM diabetes accounts for about 90% of all cases of diabetes, primarily caused by the worldwide overweight and obesity epidemic. Evidence suggests that lifestyle and other nonpharmacological interventions as a diets, physical activity or psychological support can delay and even prevent the development of T2DM and its complications.

Insulin resistance is a condition where cells decrease their sensitivity to insulin action. Insulin decreases its activity, less glucose is absorbed by the cells of the body and much glucose accumulates in the blood. Insulin resistance is almost always considered a pathological process and is at the heart of Type 2 diabetes mellitus. Regulation of insulin sensitivity is a part of the metabolic physiology. Fluctuations in nutrient intake require homeostatic flexibility, including a change in insulin sensitivity, so as to optimize the supply of nutrients in different tissues.

The prevention of diabetes is very important for the health system in each country in the world. Various studies demonstrated the use of metformin in treatment of obese people. Metformin is well known drug for the treatment of patients with insuline resistance which is popular in obese people. Research results suggest that it is possible to replace the effect of metformin in obese people with prediabetes by application of nonpharmacological interventions. Our studies indicated that the probiotics support the function of gastro-intestinal system, appetite, lipid and carbohydrate metabolism, may decrease the inflammation, etc. Those data verify the decision made for NIRDIABO project to include the low calorie diet with probiotics in the prevention of diabetes on individuals with prediabetes and obesity. Our data suggest that good nutrition components from the diet together with probiotic have beneficial effect on individuals with obesity and prediabetes.

Cytokines play a crucial role in both inflammation and diabetes. In addition, cytokines are responsible for complication of diabetes type 2 and obesity. The aim of our study was to examine two pro-inflammatory cytokines (TNF α and IL-1 β) in individuals with obesity and pre-diabetes. The results of the present study support the hypothesis that the inflammation plays a role in the mechanisms of obesity and prediabetes. Our findings show that TNF α and IL-1 β are involved in the mechanisms of development of insulin resistance in obese pre-diabetic subjects.

An important element of T2DM prophylaxis is to provide a nutritionally correct regimen in combination with physical activity to suppress the development of this socially significant disease already in the pre-diabetic phase. This study has documented new facts about the role of the individual genome in the development of pre-diabetes in people with obesity. It has been documented polymorphism in Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPARG) in volunteers. Analyzed 220 patients showed genotypic and allelic distribution in patients with high BMI Genotype and allelic distributions in patients with high BMI (CC: 82,6%, CG: 16,4%, GG: 1%), and in patients with normal BMI (CC: 86%, CG: 13%, GG: 1%). The analysis of these results indicates a lack of statistical significance between the two study groups. Considering the role of the PPARG gene in the development of the Type 2 diabetes, it can be concluded that this gene is not associated with the development of pre-diabetes in a population of Bulgarians with obesity, which distinguishes the Bulgarian population from other European populations.