

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

Доц. д-р Теодора Светославова Ханджиева-Дърленска, дм

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ И НЕФАРМАКОЛОГИЧНИ
ПОДХОДИ ЗА ПОВЛИЯВАНЕ НА АПЕТИТА И
ЗАТЛЪСТЯВАНЕТО**

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР НА НАУКИТЕ”**

**СОФИЯ
2023**

Дисертационният труд е написан на 114 стандартни печатни страници и е онагледен с 42 фигури и 20 таблици. Библиографията включва 172 литературни източника.

Материалите по защитата са на разположение в Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет, София

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Затлъстяването е хронично метаболитно заболяване, което се характеризира с натрупване на голямо количество мастна тъкан в организма. Разпространението му нараства навсякъде по света, като това вече не е само здравен проблем на развитите, но и на развиващите се страни. Затлъстяването се обуславя от много фактори и се свързва с генетични, епигенетични, физиологични, поведенчески, социално-културни и фактори на околната среда, които водят до нарушение в баланса между енергийния прием и енергийния разход в продължение на дълъг период от време. По-малката продължителност на съня, наличието на някои вредни химически съединения в опаковките за храни, самите храни, по-напредналата възраст при първо раждане, някои вътреутробни фактори и различия между поколенията, както и спирането на тютюнопушенето, повишаването на теглото, свързано с приема на някои медикаменти, са само част от предпоставките, допринасящи за епидемията от затлъстяване. По света повече от 1,9 милиарда души от възрастното население страда от наднормено тегло, като от тях 650 милиона са със затлъстяване. В България 61% от населението над 18 годишна възраст е с наднормено тегло, а около 20% – със затлъстяване.

Анализът на натрупания клиничен и експериментален опит в областта показва следните неизяснени и противоречиви моменти: не е изяснен ефектът на съществуващите и новите фармакологични средства за лечение на затлъстяването върху хормоните, които участват в регулацията на апетита и енергийната хомеостаза; не е установено, защо някои хора не увеличават теглото, докато при други се случва, което е необходимо за идентифицирането на дълготрайните системи на регулация на апетита; не е установено кои хранителни фактори в комбинация с физическа активност и поведенческа подкрепа могат да намалят риска и да превантират изявата на захарен диабет тип 2 при лица в риск (с наднормено тегло/ затлъстяване и предиабет); няма достатъчно данни за толерантност и безопасност относно използването на комбинирани лекарства в терапията на затлъстяването за дълъг период от време; не е изяснен механизъмът, по който бариатричната хирургия повлиява баланса между орексигенните и анорексигенни хормони и подобрява метаболитния статус.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия труд е да се проучи промяната в хормоните, които регулират апетита, след фармакологична, диетологична интервенция или бариатрична хирургия при експериментални животни и при хора с предиабет, инсулинова резистентност и затлъстяване.

За постигането на целта на дисертационния труд, бяха поставени следните **задачи**:

1. Да се сравни ефектът на различни лекарствени средства върху орексигенните и анорексигенни хормони при експериментален модел на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза.
2. Да се създаде експериментален модел на затлъстяване чрез кафетерийна диета с цел изследване ефекта на Метформин и Лираглутид върху параметрите на метаболизма.
3. Да се изследват фармакогенетичните механизми при избор на лекарствена терапия на затлъстяването при експериментално индуциран модел на затлъстяване.
4. Да се установи влиянието на субхроничното приложение на хранителен режим, обогатен с фруктоза върху плазмените нива на глюкоза и инсулин, баланса на хормоните грелин и лептин и показатели на въглехидратна и мастна обмяна при жени с метаболитен синдром.
5. Да се установи ефекта на гликемичния индекс и на белтъчините като фактори за редукция на телесната маса и в превенцията на захарния диабет тип 2 при лица с наднормено тегло/ затлъстяване и предиабет.
6. Да се проследи ефекта на бариатричната/ метаболитна хирургия върху хормоните, които регулират апетита и енергийната хомеостаза.
7. Да се установи ефекта на бариатричната/ метаболитна хирургия върху проинфламаторните цитокини и медиатори на ниско-степенното възпаление.

Представените експериментални и клинични проучвания са финансирани по грантове на МУ-София, МОН и 7-ма Рамкова програма на Европейския съюз и покриват съотв. етични принципи и имат разрешение за провеждането им от КЕНИМУС (Комисия по Етика на Научните изследвания при Медицински Университет София) и от Българската агенция по безопасност на храните.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

A. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ

I. Сравнително изследване на ефекта на Метформин и Емпаглифлозин върху хормоните, които регулират апетита при експериментално индуцирани модели на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза

За целите и задачите на проведените експериментални изследвания се използваха половозрели мъжки плъхове порода Вистар (200-230 гр), доставени от централен вивариум. Опитите се проведоха при спазване на стандартните условия за отглеждане, храна и вода. Експериментите бяха извършени спрямо Международните Насоки и Принципи на Експерименти с Животни (International Guiding Principles for Animals Research), както и етичните принципи при планиране и провеждане на експериментите според КЕНИМУС (Комисия по Етика на Научните изследвания при Медицински Университет). Опитите се осъществяваха при спазване на циркадния ритъм (12ч. светло/ 12 ч. тъмно). Поддържаната температура на околната среда по време на експериментите беше 22 С. Плъховете бяха рандомизирани в три групи: 1-ва група с експериментално индуциран хипотиреоидизъм, 2-ра група с експериментално индуциран модел на хипертиреоидизъм и 3-та контролна група. Животните бяха разделни по три в кафез. Всички животни от трите групи имаха достъп до вода и стандартна лабораторна храна *ad libitum*. Телесната маса на всички животни беше измервана седмично.

1. Модел на експериментално индуциран хипотиреоидизъм

В продължение на един месец плъховете от експерименталната група получаваха чрез водата пропилтиурацил в дневна доза 1 mg/ml с цел създаването на този модел. Дневната доза на плъх беше оценена, като се раздели дневното количество изпита вода върху общото тегло на всички плъхове. Пропилтиурацил (Propyl 50 mg, ALMEDA LTD) представлява тиреостатик, принадлежащ към групата на производните на тироурейта.

2. Модел на експериментално индуциран хипертиреоидизъм

Плъховете от експерименталната група получаваха чрез водата (L-tyroxin 100 µg, Berlin-Chemie) в дневна доза 2µg/ml в продължение на

един месец. За диагностициране на хипертиреозидизъм се отчиташе теглото на плъховете, тяхното поведение и общо състояние и след 30-ия ден от третирането се определяха хормони на щитовидната жлеза и ТТХ.

След създаването на съответните експериментални модели плъховете бяха разпределени на случаен принцип с цел изследване ефекта на две фармакологични средства върху параметри на обмяната и върху серумните концентрации на хормоните, които повишават и потискат апетита. **Групата с модел на хипофункция на щитовидната жлеза бе разделена на три подгрупи:** група, третирана с Метформин (Berlin-Chemie Menarini Group, 50 мг/кг телесна маса), разтворен в 0.5мл физиологичен разтвор три пъти дневно; група, третирана с Емпаглифлозин (Boehringer Ingelheim International GmbH) 3 мг еднократно/ дневно, разтворен в 0.5мл физиологичен разтвор и трета група, която бе контрола без въвеждане на лекарство. **Групата с модел на хиперфункция на щитовидната жлеза бе разделена на три подгрупи:** групата, третирана с Метформин (Berlin-Chemie Menarini Group, 50 мг/кг телесна маса) три пъти дневно; група, третирана с Емпаглифлозин (Boehringer Ingelheim International GmbH) 3 мг еднократно/ дневно, разтворен в 0.5мл физиологичен разтвор и трета група, която бе контрола без въвеждане на лекарство. **Чистата контролната група** на група, третирани с Метформин, група, третирана с Емпаглифлозин в съответната дозировка, посочена по-горе и група - контролна група.

Метформинът е медикамент от групата на бигвадините, които са орални антидиабетни средства. Емпаглифлозинът е от групата на SGLT2 инхибиторите, които са селективни конкурентни на натриево-глюкозния котранспортер 2 (SGLT2).

3. ELISA (enzyme immunosorbent assay) метод

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

Тези методи се осъществяват на базата на реакцията двоен-антитяло сандвич. Плаката е предварително инкубирана с моноклонално антитяло, специфично за С-края на хормона. Това антитяло се свързва с цялото количество хормон, което се намира в стандарта или кръвната проба. Конюгиран разтвор (вторично антитяло) се прибавя към ямките, за да разпознае другия край на хормона. По този начин двете антитела формират сандвич, като се свързват за различни краища на хормона. Концентрацията на хормона в ямките се определя при прибавяне на Субстратен разтвор (Ellman's Reagent), който спира реакцията. Чрез спектрофотометър се отчита резултата.

3.2. Протокол за изследване на пълши ацетилян грелин чрез ELISA кит (BioVender, Чехия)

Кръвта за определяне на грелин се събираше в EDTA епруветки, които съдържаха р-hydroxymercuribenzoic киселина (10 µl/ml кръв). Пробите се центрофугираха на 3500 оборота за 10 мин. на +4 С. След отделянето на плазмата се добавяше 100 µl 1M HCl на 1 ml плазма. След това пробите се центрофугираха повторно за 5 мин. на +4 С. Супернатантата се отделя за провеждане на изследвания върху грелин. Реакцията се осъществява на основата на реакцията двоен-антитяло сандвич. Плаките са предварително инкубирани с моноклонално антитяло, специфично за С-края на грелин. То показва количествено свързване на грелин, намиращ се в кръвната проба. Добавя се вторично (конюгирано антитяло) в ямките, за да се разпознае N-терминалният край на ацетиления грелин. По този начин двете антитела формират сандвич, като се свързват за различни краища на хормона. Концентрацията на хормона в ямките се определя при прибавяне на Субстратен разтвор (Ellman's Reagent), който спира реакцията. Резултатът се отчита чрез спектрофотометър на 405 nm. Съдържанието на грелин се изчислява в pg/ml.

3.3. Протокол за изследване на пълши лептин и адипонектин чрез ELISA кит (BioVender, Чехия)

Това е двоен-антитяло сандвич имунологичен метод за количествено изследване на плазмена концентрация на лептин и адипонектин спрямо указанията на производителя. Кръвните проби се събираха в EDTA епруветки. Пробите се центрофугираха на 2000 оборота за 15 мин. на +4 С. Супернатантата се отделяше за изследване върху лептин и адипонектин. Комплектът на тази ELISA съдържа разредени проби, които са инкубирани в клетки с моноклонални анти-адипонектин антитела, конюгирани към ензима horseradish peroxidase (HRP). След 2 часа инкубация се добавят конюгираните към ензима антитела и се държат заедно още 90 мин. След измиване, оставащите HRP- антитела комплекси реагират с хромогенен субстрат. Пробите се отчетоха чрез спектрофотометър на 450 nm, като абсорбцията беше пропорционална на концентрацията на лептин и адипонектин. Плазменото съдържание на лептин се определяше в pg/ml, а на адипонектин в ng/ml.

II. Изследване на генетичните полиморфизми на OX1, MATE1, MATE2, GLP1R рецепторите за Метформин и Лираглутид при пълхове с експериментално-индуцирано затлъстяване

4. Създаване на експериментален модел на затлъстяване с продължителност 19 седмици чрез кафетерийна диета (първи етап)

Мъжки пълхчета порода Вистар (n=40) се аклиматизираха за една

седмица на лабораторните условия в Катедра по фармакология и токсикология. Възрастта на плъховете бе два месеца. Всички плъхове получаваха стандартна лабораторна храна (пелети), вода и кафетерийна диета ad libitum в продължение на 19 седмици. Кафетерийната диета се състои от три високо-енергийни храни: обикновено две сладки, една солена и сладък сок всекидневно в изобилие (таблица 1). Кафетерийната диета представлява добър метод за получаване на метаболитни промени, които са характерни за човека. Животните са настанени в групи по три в клетка на стайна температура от 20-22 градуса на стандартен 12ч. бодърстване-сън цикъл (07:00-19:00ч.). Телесното тегло се измерваше веднъж седмично. В края на експеримента бяха измерени назо-аналната дължина, индекса на телесна маса, които са антропометрични параметри за определяне на затлъстяване при експериментни животни. По време на първия етап се установи екзитус на един плъх.

Таблица 1. Хранително съдържание на стандартна лабораторна храна и на кафетерийна диета

Храна	Енергийна стойност (ккал)	Белтъчини (гр)	Общо мазнини (гр)	Общо въглехидрати (гр)	Захари (гр)	Ненаситени мастни киселини (гр)
Вафли с фъстъци	555	66.9	33	56	41	
Шоколадови топчета	386	7.3	2.6	81	26	0.4
Медени кръгчета	384	8.5	2.6	80	25	1
Царевични пръчици със сирене	528	4.3	32.	52	3.4	14
Царевични пръчици с вкус на лешник	8.4	501	11	26	54	1.4
Крекери	476	8.8	19.9	64	3.9	13
Какаови кексчета	427.5	5.2	21.5	53.3	30.72	2.96
Мини вафли	549	3.56	32.86	59.73	28.75	14.8
Солени печени фъстъци	588	25	47	13	3.4	8
Шоколад	525	28	61	60	17	5.4
Бисквити	500.4	7.3	23.2	65.6	27.3	9.8
Сладкиши	502	28.5	55.4	23.4	8.6	5.2

5. Сравнителен анализ на ефекта от третирането с Метформин и Лираглутид върху антропометрични, биохимични и генетични параметри при плъхове с експериментално индуцирано затлъстяване в продължение на шест седмици (втори етап)

Плъховете се разделят на три групи на случаен принцип. Първата група (Метформин група, n=17) се третира с Метформин в доза 250мг/кг Телесна маса, разтворен в 0.5мл физиологичен разтвор. Втората група (GLP-1 група, n=11) се третира с Лираглутид, GLP-1 рецепторен агонист, в доза 75 мкгр/кг Телесна маса, разтворен в 0.5мл физиологичен разтвор ежедневно. Третата група (контролна група, n=11) остава на кафетерийна диета. След края на периода на третиране с двата медикамента плъховете от двете експериментални групи се декапитират под анестезия с фенобарбитал 50мг/кг Телесна маса, въведен интраперитонеално. Взима се кръв за изследване нивото на кръвна захар, липиден профил и триглицериди.

6. Глюкооксигеназен метод

Използва се за измерване на плазмената глюкоза. Основава се на базата на глюкооксигеназната реакция. При използване на глюко-анализатор се определя само глюкозата, тъй като посредством селективни, кислородчувствителни електроди се измерва количеството на кислорода, участвал в глюкооксигеназната реакция.

При варианта с колориметричен завършек на ензимната реакция (глюкооксигеназна-пероксидазна реакция) се включват още един ензим-пероксидаза и хромогени като донатори на водород.

7. Генетични методи:

7.1. Преданалитична обработка на материала: Изолиране на ДНК чрез комерсиален кит за изолиране на ДНК от кръв, като се следват инструкциите на фирмата- производител.

7.2. Аналитична обработка на материала:

7.2.1. Провеждане на полимеразна верижна реакция

Амплификация чрез полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction, PCR) на специфичните фрагменти от геномната ДНК. 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, хибридация на праймерите (анийлинг), синтез на ДНК.

7.2.2. Директно секвениране по Sanger на намножените фрагменти

Полученият амплификационен продукт е необходимо първона-

чало да бъде пречистен от останалите дезоксинуклеотидтрифосфати и праймери, които биха повлияли по-нататъшните реакции. Използва се ензимно пречистване с екзонуклеаза и алкална фосфатаза I. Секвенционната реакция се извършва посредством кит за секвениране BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, CA, USA), включващ Thermo Sequenase II ДНК-полимераза и флуоресцентно белязани нуклеотиди. Секвенционните продукти се пречистват чрез преутаяват с етанол. Сухата утайка може да се съхранява на тъмно на стайна температура за няколко дни. Секвенционният продукт се разтваря в Hi-Di формамид. Така приготвената проба е готова за анализ и се подава на апарата за електрофоретично разделяне. Извършва се посредством автоматичен секвенатор ABI Prism 3130 Sequence Genetic Analyzer. Получените данни се обработват автоматично от програма ABI3130 Data Collection Software и се получават в готов вид под формата на електрофореграма.

8. Антропометрични методи

Антропометричните измервания включват Телесна маса, индекс на телесна маса и индекс на Лий. *Телесното тегло* се измерва сутрин, ежеседмично. *Индексът на телесна маса (ИТМ)* отразява съотношението на телесното тегло разделено на корен квадратен от ръста. За плъхчета от породата Вистар варира от 0.45-0.68 гр/см². Над тези стойности се отчита затлъстяване. *Индексът на Лий* се формира като корен квадратен от теглото (грамове) разделен на назо-аналната дължина на тялото (сантиметри). Плъхове с индекс на Лий над 0,31 се считат за затлъстели.

Б. КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ

III. Изследване на влиянието на субхроничното приложение на хранителен режим, обогатен с фруктоза върху плазмените нива на глюкоза и инсулин, баланс на хормоните грелин и лептин и показатели на въглехидратна и мастна обмяна при жени с метаболитен синдром

Научното изследване представлява диетологично проучване при жени с метаболитен синдром, при които се изследва ефикасността и безопасността на приложението на хранителен режим, обогатен с фруктоза. Проучването се проведе в Катедрата по фармакология и токсикология и Клиниката по ендокринология на Александровска болница, София. Пациентите постъпваха в клиниката за лечение на метаболитен синдром. Лицата, които участваха в изследването имаха индекс на телесната маса (ИТМ) ≥ 30 кг/м² и отговаряха на критериите за метаболитен синдром (таблици 2 и 3). Първоначално всички лица бяха скринирани и взеха участие тези, които покриваха включващите критерии и нито един от изключващите критерии за участие.

В продължение на една седмица участниците консумираха хранителен режим за лечение на болестното свръхтегло (диета номер 8), както и приемаха четири пъти дневно по 210 мл сок от ябълка по време на всяко хранене. Съдържанието на хранителния режим: Диета номер 8 (1400 ккал/ дневно), Белтъчини: 75-100 г на ден, Мазнини: 45-50 г на ден, Въглехидрати: до 150 г на ден и ябълков сок (100%): Белтъчини: 0, Мазнини: 0, Въглехидрати, от които 11.5 г фруктоза/ 100 мл сок.

Таблица 2. Критерии за метаболитен синдром

1. Централен тип на затлъстяване, дефинирано като обиколка на талията ≥ 80 см за жени и ≥ 94 см за мъже. Ако ИТМ е ≥ 30 кг/м², се счита, че е налично централно затлъстяване и не е необходимо измерването на обиколката на талията.

Плюс два от следните четири критерии:

1. Увеличени нива на триглицериди ≥ 1.7 ммол/л или лечение на патологията;

2. Намалени нива на HDL-холестерола (1.03 ммол/ л за мъже и 1.29 ммол/л за жени или лечение на патологията);

3. Увеличено артериално налягане $\geq 130/80$ mmHg или лечение;

4. Увеличено ниво на кръвната захар на гладно (НГГ ≥ 5.6 ммол/л) или диагностициран ЗДТ2

Таблица 3. Класификация на нарушенията на въглехидратната обмяна въз основа на препоръките на ADA, IDF и WHO***

Диагноза	Венозна плазма	Капилярна кръв
ЗД		
Симптоми на диабет и случайна кръвна захар	> 11,1 mmol/L	> 11,0 mmol/L
кръвна захар на гладно	> 7,0 mmol/L	> 6,1 mmol/L
2 ч. след натоварване/ОГТТ	> 11,1 mmol/L	> 11,1 mmol/L
Намален глюкозен толеранс/НГТ		
Кръвна захар на гладно	< 7,0 mmol/L	< 6,1 mmol/L
2 ч. след натоварване/ОГТТ	7,8 - 11,1 mmol/L	7,8 - 11,1 mmol/L
Нарушена гликемия на гладно/НГГ		
Кръвна захар на гладно	6,1 - 6,9 mmol/L	5,6 - 6,0 mmol/L
2 ч. след натоварване/ОГТТ	< 7,8 mmol/L	< 7,8 mmol/L
Нормален глюкозен толеранс		
Кръвна захар на гладно	< 6,1 mmol/L	< 5,6 mmol/L
2 ч. след натоварване/ОГТТ	< 7,8 mmol/L	< 7,8 mmol/L

*** ADA – American Diabetes Association (StandardsofMedicalCareinDiabetes.DiabetesCare,27, Suppl 1, Jan. 2004); IDF - International Diabetes Federation; WHO – World Health Organization (Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation 1999)

9. Антропометрични изследвания и качествен анализ на тъканите чрез био-импеданс

В началото на прочването на всички участници бяха направени следните антропометрични измервания: Телесна маса (кг), височина (см), индекс на телесна маса (ИТМ, кг/ м²), обиколка на талията (см), обиколка на ханша (см), както и качествена оценка на тъканите - % на мастна тъкан, % на висцерална мастна тъкан, отношение на мастна тъкан към свободна мастна тъкан, основна обмяна, измерване на стойностите на кръвното налягане (систолно и диастолично налягане в mmHg). Освен това на пациентите беше направена пълна кръвна картина с биохимични показатели, липиден профил, както и орално глюкозо-толерантен тест (ОГТТ). Продължителността на проучването беше пет дни.

10. ELISA методи за изследване на човешки грелин и лептин (протоколът е преставен по-горе)

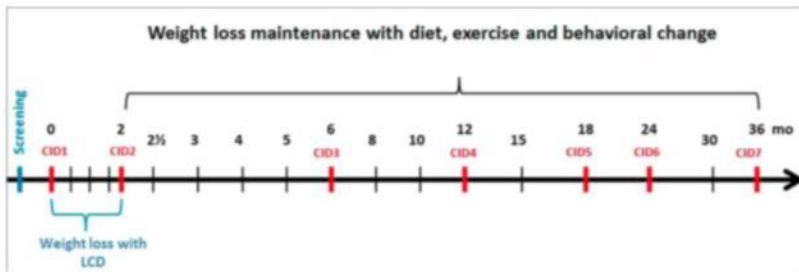
Важно е да се подчертае, че кръвните проби на пациентите се обработваха отделно за грелин, съгласно указанията на метода. За всеки

пациент имаше 8 пъти определяне на грелин – 4 преди курсът на прием на фруктоза и 4 след 7 дневния прием на богатата на фруктоза диета. Часовете бяха определени с оглед търсене и на ритъм в денонощието на секреция на грелин и изключване на пряк ефект на храненето, защото е известно че голям процент от грелин в кръвта е от грелин – продуциращите клетки в стомаха. Часовете бяха 7 сутрин на гладно, 10.0, 14.0 и 18 часа, както посочихме преди и след диетата с богатата на фруктоза храна. Ние адаптирахме методът за целите на проучването, като препоръчваме за лабораторната практика кръвта да се обработи съгласно указанията на производителя за определяне на грелин, както и преди да се накапе плазмата в елайза се изисква много прецизно поне петкратно суспендиране с цел точност на взетите микролитри.

IV. Проучване ефекта на комбинацията на различни хранителни фактори (нисък/ висок гликемичен индекс и умерено/ висок прием на белтъчини) с различна по интензитета физическа активност върху развитието на захарен диабет тип 2 при пациенти с наднормено тегло/ затлъстяване и предиабет

Научно-изследователският проект **PREVIEW** (*превенция на захарен диабет тип 2 при лица със затлъстяване*) представлява рандомизирано, контролирано, многоцентрово проучване. В проекта са включени участници от осем държави: България, Дания, Финландия, Испания, Холандия, Великобритания, Австралия и Нова Зеландия. основната цел на проекта е да се определи превентивният ефект на диета с високо съдържание на белтъчини и с въглехидрати с нисък гликемичен индекс, комбинирана с умерена или висока по интензивност физическа активност, върху честотата на развитие на метаболитна патология при предразположени към диабет от втори тип, деца, хора на средна възраст и възрастни (от двата пола) в предиабетно състояние. Проектът е насочен към превенция на хора с висок риск от развитие на захарен диабет тип 2. В проекта са включени участници, при които съществува риск от развитие на диабет (нарушен глюкозен толеранс, наднормено тегло или затлъстяване и повишени рискови фактори на диабет).

Проектът се осъществява в два основни периода: 1-ви период на нискоенергийна диета с продължителност 8 седмици; 2-рият период включва запазване на първоначалната редукция на теглото чрез различна комбинация между хранителна интервенция, физическа активност и поведенчески подход с продължителност 3 години. През различните клинично-изследователски дни (CID) 1-7 се проследяват различни антропометрични параметри, анализ на тъканите, кръвно налягане, кръвни и биохимични показатели и други, представени на фигура 1.



Фигура 1. Етапи на проучването (скрининг; период на загуба на тегло чрез нискоенергийна диета, представени в синьо; период на поддържане на предварителната загуба на тегло чрез диета, физическа активност и поведенчески промени, представени в черно. Легенда: CID, клинично-изследователски ден, LCD, ниско-енергийна диета.

В проучването участват 2000 доброволци (800 на възраст 25-45 години, и 1200 възрастни, 55-70 години), (таблица 4). В България проучването се проведе в Катедрата по фармакология и токсикология при общо 368 участника. При всички възрастни първо беше приложена нискоенергийна диета в продължение на 8 седмици, чиято цел беше да се постигне намаление на теглото с $>8\%$. Дневният енергиен прием е приблизително 3,4 MJ (800 kcal), а целевият макронутриентен състав на диетата е бил 15-20 Е% мазнини, 35-40 Е% белтъчини (84 g белтъчини) и 45-50 Е% СНО. Дневната диета се състоеше от общо 4 x 40 g сашета за заместване на храната Cambridge Weight Plan® (Cambridge Weight Plan Ltd, Великобритания), 3 от които бяха разтворени в 250 ml нискомаслено мляко (обща доза 750 ml) и 1 в 250 ml вода. Участниците, които не могат да пият млечни продукти, можеха да изберат соево мляко или мляко без лактоза. Разрешени са и напитки без съдържание на енергия. Освен това можеше да се консумират максимум 400 g нескорбялни зеленчуци с ниско съдържание на въглехидрати, като маруля, аспержи, броколи, целина, краставици, гъби, репички, домати и кресон.

След етапа на нискоенергийната диета участниците се рандомизираха произволно в две различни хранителни интервенции и две интервенции с физически упражнения с обща продължителност 148 седмици (таблица 11). **Двете хранителни интервенции** са: МР=умеренобелтъчна (15%) в комбинация с въглехидрати (55 Е%) с умерен до висок гликемичен индекс на храната (GI) ≥ 56 ; НР = високобелтъчна (25 Е%) в комбинация с въглехидрати (45 Е%) с нисък гликемичен индекс ≤ 50 . И при двете диети е предвидено да се ползват здравословни храни. **Двете интервенции с физически упражнения** са следните: МП = умерено интензивна: 60-75% от максималната стойност

на сърдечната честота (HRmax), т.е. бързо ходене за възрастни; HI = високоинтензивна: 76-90% HRmax, т.е. бягане за възрастни. Тъй като всички участници са групирани произволно в една диета, както и в една група за упражнения, общият брой комбинации (интервенции-групи) е четири (MP-MI, MP-HI, HP-MI и HP-HI).

Таблица 4. Основни характеристики на участниците в европейското научно проучване PREVIEW

Място	Предскрининг (бр)	Скрининг (бр)	Рандомизирани (бр)	Мъже (бр)	Жени (бр)	Възраст 25-45 г. (бр)	Възраст 46-54 г. (бр)	Възраст 55-70 г. (бр)	Средна възраст в г. (SD)
UCPH	2061	908	379	159	220	86	62	233	54.2 (10.9)
HEL	1269	633	289	88	201	39	33	221	58.2 (8.9)
UM	675	555	203	94	109	42	17	145	56.6 (10.0)
UNOTT	3914	980	264	102	162	95	42	133	51.6 (12.0)
UNAV	1740	733	307	93	214	145	82	93	47.5 (10.6)
MU	1190	486	368	87	281	190	7	158	47.8 (12.0)
UNSYD	3108	595	195	56	139	59	36	102	53.0 (10.8)
UOA	1654	584	321	77	244	156	47	103	47.0 (11.4)
Общ брой	15,611	5,474	2,326	756	1570	812	326	1188	51.6 (11.6)

Легенда: UCPH = University of Copenhagen (Университет в Копенхаген, Дания); HEL = University of Helsinki (Университет в Хелзинги, Финландия); UM = Maastricht University (Университет в Маастрихт, Холандия); UNOTT = University of Nottingham (Университет в Нотингам, Великобритания); UNAV = University of Navarra (Университет в Навара, Испания); MU = Medical University of Sofia (Медицински Университет-София, България); UNSYD = University of Sydney (Университет в Сидни, Австралия); UOA = University of Auckland (Университет в Оукланд, Нова Зеландия).

Основните критерии, на които доброволците трябва да отговарят, за да бъдат включени в научно-изследователския проект бяха: възраст 25-45 години или 55-70 години; предиабетно състояние (по критериите от Международната федерация за борба с диабета); ИТМ > 25 kg/m², което отговаря на наднормено тегло или затъстяване; информирано съгласие, без ограничения за етрическа принадлежност. На всички участници в проекта на различни интервали по протоколите на проекта се измерваха и изследваха различни параметри.

11. Антропометрични данни и телесен състав. Те включваха Телесна маса, височина, обиколка на талията, ханша и бедрата, телесен състав и разпределение на мазнините. Измерването на телесния състав се извършваше чрез биоимпеданс в зависимост от наличността в отделните центрове. Измерванията се осъществяваха съгласно указанията на производителя и на гладно. По време на цялото изследване се използваха същият уред и софтуер и той трябва да бъде калибриран съгласно инструкциите на производителя.

12. Орален глюкозо-толерантен тест и кръвни проби: Двучасов орален глюкозо-толерантен тест (OGTT). Всеки участник

приемаше перорално 75 g глюкоза (търговски продукт) разтворена в 300 ml вода в рамките на 5 минути. По време на тази процедура участниците оставаха в полулегнало състояние и в покой, като преди започването на теста не трябва да са приемали храна (освен 1 dL вода). Не се позволяваха никакви храни и напитки (различни от даваното по време на изследването) до приключване на изследването. Вземаха се кръвни проби за измерване на глюкозата на 0-ва, 30-та, 60-та, 90-та и 120-та минута след като изпиваха течният глюкозен разтвор.

13. Кръвни проби. Вземаха се на гладно. Пробата веднага се центрофугираше, серумът се отделяше и пробата се съхраняваше съгласно отделни инструкции, предоставени от Централната лаборатория на проекта. Следните видове анализи от кръвната проба се извършиха: кръвна захар на гладно и след натоварване, инсулин, С-пептид, HbA1c, общ холестерол, HDL- и LDL-холестерол, триглицериди, CRP, чернодробни ензими.

14. Кръвно налягане и сърдечен ритъм. Измерваше се систолно и диастолно кръвно налягане с автоматично устройство на дясната ръка 5-10 мин. по-късно, докато пациентът си почиваше в седнало положение. Кръвното налягане се измерваше три пъти с интервал от 1 минута между измерванията, а отбелязването се извършва с точност до 1 mmHg. Прилага се средната стойност между тези три измервания. През последните 12 часа преди измерването не се позволяваше енергичната физическа активност, употребата на кафе или тютюнопушенето. Уредът трябва да се поддържа и калибрира редовно (поне веднъж годишно). Измерваше се сърдечният ритъм в покой и - ако е възможно - вариабилността на сърдечната честота.

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

V. Влияние на бариатричната хирургия върху антропометричните параметри и хормоните, регулиращи апетита и метаболизма при хора с високостепенно затлъстяване

Научното изследване беше планирано в четири етапа: Първият етап включваше подбор на лица с високостепенно затлъстяване, които са подходящи за бариатрична/ метаболитна операция (Таблица 5). Вторият етап включваше измерване на антропометричните параметри и телесен състав, както и взимане на кръв за изследване на следните хормоните, които регулират апетита и метаболизма (лептин, адипонектин, глюкагон-подобен пептид 1, пептид YY, грелин) на пациенти с високостепенно затлъстяване преди бариатричната операция. Третият етап включваше

измерване на антропометричните параметри и телесен състав, както и взимане на кръв за изследване на следните хормони, които регулират апетита и метаболизма (лептин, адипонектин, глюкагон-подобен пептид 1, пептид YY, грелин) на същите пациенти един месец след бариатричната операция. Четвъртият етап включваше измерване на плазмените нива на лептин, адипонектин, глюкагон-подобния пептид 1, пептид YY и грелин в проби преди и след хирургичната интервенция чрез ELISA методика, както и статистическа обработка на данните и анализ на получените резултати.

Таблица 5. Критерии за бариатрична/ метаболитна хирургия*

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

*Изследването е проведено 2019 година, когато се използваша тези критерии. От 2022 година има нови критерии, свързани с ИТМ.

На таблица 6 са представени характеристиките на пациентите преди бариатричната интервенция.

Таблица 6. Основни характеристики на пациентите (n=20)

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

Данните са представени като средна стойност ± стандартно отклонение.

15. Използвани методи по време на научно-изследователския проект

15.1. Антропометрични данни и телесен състав

Те включваха Телесна маса, височина, телесен състав и разпределение на мазнините. Измерването на телесния състав се извършваше чрез биоимпеданс Танита BC-420MA. Измерванията се осъществяваха съгласно указанията на производителя и на гладно.

15.2. Кръвни проби

Вземаха се на гладно. Пробата веднага се центрофугираше, серумът/ плазмата се отделяше и пробата се съхраняваше на -80°C .

15.3. ELISA метод за количествено определяне на човешки плазмени/ серумни нива на лептин, адипонектин, грелин, GLP-1, PYY (3-36) и холецистокинин (тези методи за описани по-горе).

VI. Проследяване на промяната във вкусовите предпочитания, мотивацията и самоконтрола при хранене и в хормоните, регулиращи апетита след бариатрична/ метаболитна хирургия

Научното изследване беше планирано в следните етапи: Първият етап включваше осъществяването на правилен подбор на лица с високо-степенно затлъстяване, които са подходящи за бариатрична операция; Вторият етап (преди бариатричната/ метаболитна хирургия) включваше: попълване на въпросници, измерване на антропометричните параметри и телесен състав, взимане на кръв за изследване на плазмените нива на ентералните хормони (грелин, глюкагон подобен хормон-1, пептид YY3-36 и холецистокинин) и на адипокините (лептин и адипонектин); Третият етап (един месец след бариатричната/ метаболитна хирургия) включваше попълване на въпросници, измерване на антропометричните параметри и телесен състав, взимане на кръв за изследване на плазмените нива на ентералните хормони и адипокините на същите пациенти; Четвърти етап: Измерване на плазмените концентрации на ентералните хормони (грелин, глюкагон подобен хормон-1, пептид YY3-36 и холецистокинин) и на адипокините (лептин и адипонектин) чрез ELISA методика, анализ на резултатите.

16. Оценка на хранителен прием

16.1. Оценяване на въздържанието от храна. Въздържанието от храна означава **самоконтрол над храненето**. Ограниченията в храненето могат да се характеризират като променливи или постоянни. Използвахме пълната версия на Въпросника за трифакторното хранене (TFEQ), за да оценим всички характеристики на въздържанието от храна, както е обяснено по-горе. Въпросниците за трифакторното хранене се връщаха лично на техническото лице, ангажирано в изследването, което

незабавно ги проверяваше и задаваше пояснителни въпроси, ако е необходимо.

16.2. Оценяване на апетита. Субективните оценки на апетита (глад, ситост, усещане за пълен стомах, очаквана консумация на храна, жажда) се измерваха посредством уеб-базирани резултати или на хартия VAS (100-милиметрова скала).

VII. Ефект на бариатричната/ метаболитна хирургия върху адипокиновия профил и адипокин-индуцираното възпаление при хора с високостепенно затлъстяване

Научното изследване беше планирано в следните етапи: Първият етап включваше осъществяването на правилен подбор на лица с високостепенно затлъстяване, които са подходящи за бариатрична операция; Вторият етап (преди бариатричната/ метаболитна хирургия) включваше: измерване на антропометричните параметри и телесен състав; взимане на кръв за изследване на на проинфламаторните адипокини (апелин, резистин и аполипопротеин М); Третият етап (шест месеца след бариатричната/ метаболитна хирургия) включваше: измерване на антропометричните параметри и телесен състав; взимане на кръв за изследване на плазмените нива на проинфламаторните адипокини (апелин, резистин и аполипопротеин М); Четвъртият етап включваше ELISA методика за изследване на плазмените нива на проинфламаторните адипокини (апелин, резистин и аполипопротеин М) от проби преди и шест месеца след бариатрична/ метаболитна хирургия и анализ на данните.

17. Статистически анализ. Данните от всички експерименти (експериментални и клинични) бяха анализирани и представени графично със софтуер SPSS, v. 21 и GraphPad. **Описателни методи:** Вариационен анализ на количествени променливи – средна, стандартно отклонение, стандартна грешка на средна при 95% доверителен интервал, **Метод на Kolmogorov-Smirnov:** за проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива. Параметрични (при нормално разпределение на данните): **Student t-тест** за две независими извадки – за сравняване на средните между две независими групи; One-way analysis of variance (ANOVA) за повече от две групи. Непараметрични (при неправилно разпределение на данните) резултати чрез Mann-Whitney тест. **Методи за проверка на статистически хипотези:** Използването на ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ или *** $p < 0.001$.

4. РЕЗУЛТАТИ

А. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ

I. Сравнително изследване на ефекта на Метформин и Емпаглифлозин върху хормоните, които регулират апетита при експериментално индуцирани модели на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза

За целите на изследването бяха проследени следните биохимични показатели TSH, fT3 и fT4 за определяне на функцията на щитовидната жлеза. Счита се, че показателят TSH е скринингов маркер за състоянието на жлезата. Резултатите демонстрират създаването на двата експериментални модела на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза (таблица 7).

Таблица 7. Промяна в хормоните, свързани с функцията на щитовидната жлеза при експериментален модел на хипо- и хиперфункция

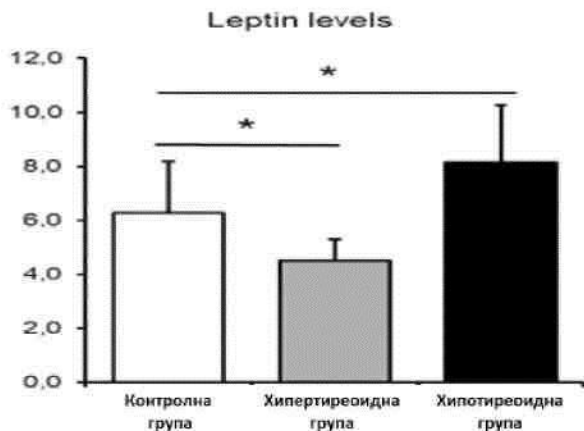
Показател (средни стойности)	Контролна група	Модел на хипофункция на щитовидната жлеза	Модел на хиперфункция на щитовидната жлеза	Статистическа значимост
TSH (ng/ml)	1.08	20.49	1.05	* p< 0.05
ft3 (ng/ml)	2.08	2.07	2.54	няма
ft4 (ng/ml)	1.74	2.53	2.32	* p< 0.05

За степента на повлияване на щитовидната функция се определяха и нивата на периферните хормони в кръвта. Спрямо стойността на fT3 нашите резултати демонстрират нормално разпределение на стойностите на хормона за отделните групи. При проследяването стойността на fT4 също се демонстрират промени, които характеризират хипо- и хиперфункцията на щитовидната жлеза при нашите експериментални модели.

След индуцирането на тиреоидната дисфункция, експерименталните мъжки плъхове порода Вистар във всяка група бяха разделени съответно на три подгрупи: 1. **модел на хиперфункция на щитовидната жлеза на група 1.1, третирани с Метформин, група 1.2, третирани с Емпаглифлозин и група 1.3- контролна група;** 2. **модел на хипофункция на щитовидната жлеза на група 2.1,**

третиран с *Метформин*, група 2.2, третиран с *Емпаглифлозин* и група 2.3- контролна група; и 3. контролната група на група 3.1, третиран с *Метформин*, група 3.2, третиран с *Емпаглифлозин* и група 3.3- контролна група.

Резултатите показват, че хипотиреоидизмът е свързан с високи нива на лептин в кръвта, на което би могло да се дължат последващите метаболитни промени, характерни за състоянието, ($p < 0.05$), (фигура 2).

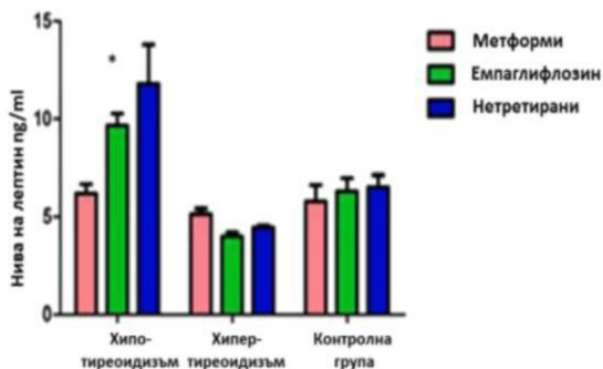


Фигура 2. Средни стойности на лептин в трите групи (контролна, хипотиреоидизъм и хипертиреоидизъм). Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, $*p < 0.05$.

В изследването беше проучено влиянието на *Метформин* и *Емпаглифлозин* върху серумните концентрации на адипокините (лептин и адипонектин), както и върху орексигения хормон грелин при моделите на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза при мъжки плъхове порода Вистар.

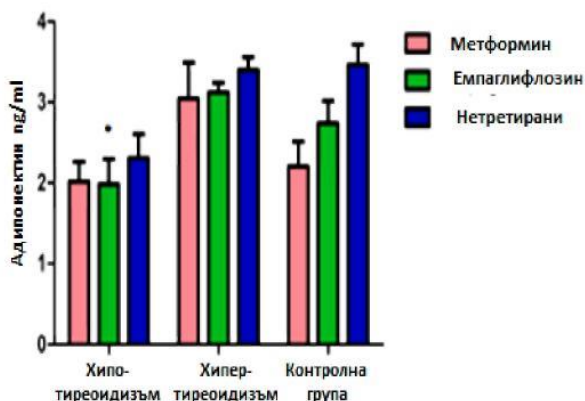
Резултатите демонстрираха промени в серумните концентрации на лептин след третирането с *Емпаглифлозин* в продължение на един месец в трите групи (хипотиреоидизъм, хипертиреоидизъм и контрола), (фигура 3). Интересен е фактът, че само в групата с хипотиреоидизъм се наблюдава статистически значимо понижение на серумните концентрации на лептин вследствие терапията, както с *Емпаглифлозин*, така и с *Метформин* в сравнение с нетретираната група ($p < 0.05$), (фигура 3). Третирането с *Метформин* не води до статистически значими ефекти

върху серумните концентрации на лептин.



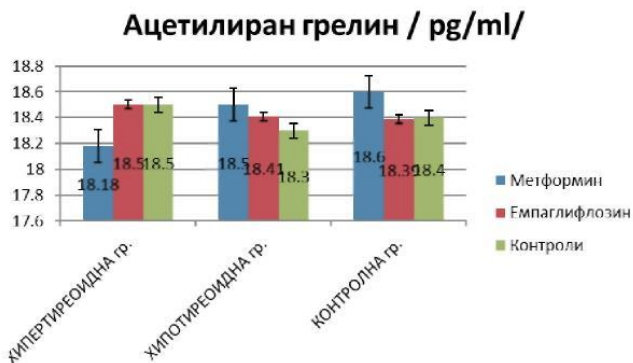
Фигура 3. Серумни нива на лептин (ng/ml) в двете групи с тиреоидна дисфункция и контролна група, с приложена терапия с Метформин и Емпаглифлозин. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, * $p < 0.05$.

Още повече, третирането с Емпаглифлозин и Метформин на експерименталните плъхове с хипотиреоидизъм води до статистически значимо намаляване на серумните нива на адипонектин в сравнение с нетретираните животни с хипотиреоидизъм, $p < 0.05$, (фигура 4). Такъв ефект не се наблюдава в останалите две групи.



Фигура 4. Серумни нива на адипонектин (μ /ml) в двете групи с тиреоидна дисфункция и контролна група, с приложена терапия с Метформин и Емпаглифлозин. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, * $p < 0.05$.

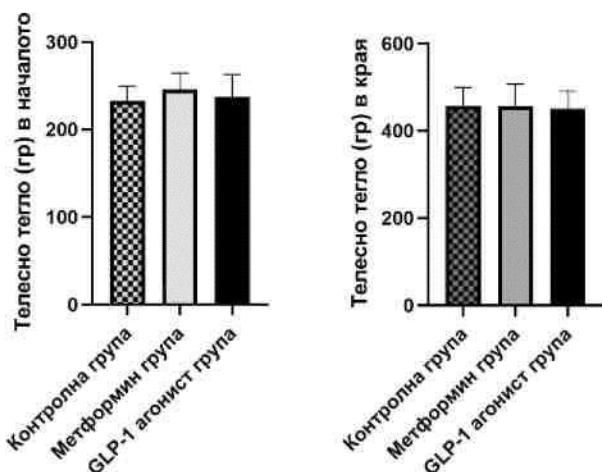
Не се установи промяна в нивата на ацетилян грелин, вследствие третирането с Метформин и Емпаглифлозин в трите изследвани групи (фигура 5).



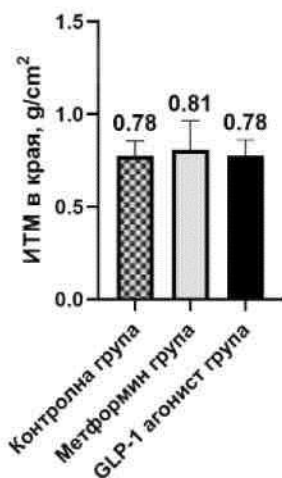
Фигура 5. Серумни нива на грелин (pg/ml) в двете групи с тиреоидна дисфункция и контролна група, третираны с Метформин и Емпаглифлозин. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

II. Изследване на генетичните полиморфизми на OGT1, MATE1, MATE2, GLP1R рецепторите за Метформин и Лираглутид при плъхове с експериментално-индуцирано затлъстяване

За целите на проучването създадохме модел на експериментално затлъстяване (първи етап) чрез кафетерийна диета в продължение на 19 седмици (фигури 6 и 7).



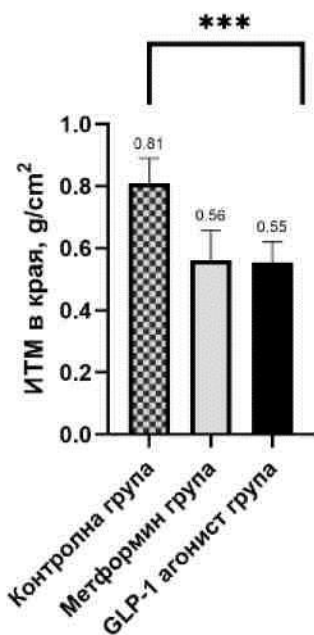
Фигура 6. Телесна маса (гр) в трите групи в началото и в края на 19-седмичния модел на експериментално затлъстяване. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.



Фигура 7. Индекс на телесна маса (ИТМ, гр/ см²) в края на 19-седмичния модел на експериментално затлъстяване. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

Вторият етап на изследването включваше проследяването на ефекта на Метформин и Лираглутид върху антропометрични и биохимични параметри в продължение на шест седмици. Плъховете бяха разпределени на случаен принцип в три групи: контролна група (n=11), група, третирана с Метформин (n=17) и група, третирана с Лираглутид (GLP1R агонист, n=11). Най-много експериментални животни бяха в групата, третирана с Метформин, тъй като при тази група се изследваха генетични полиморфизми съответно на три варианта на рецептора за Метформин.

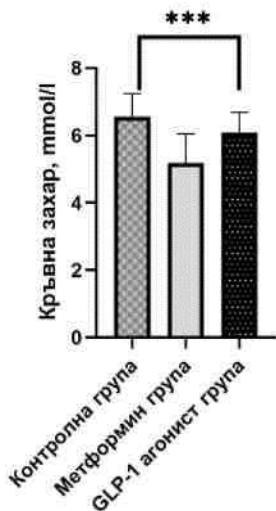
Резултатите демонстрират статистически значимо намаляване на ИТМ след третиране с Метформин и Лираглутид в продължение на шест седмици в сравнение с контролната група ($p=0.0001$), (фигура 8).



Фигура 8. Индекс на телесна маса (ИТМ, гр/ см²) в края на втория етап на изследването. Данните са представени като средна стойност ± стандартно отклонение, *** $p=0.0001$.

Наблюдаваха се промени и в биохимичните параметри. На фигура 9 са представени промените в нивата на кръвната захар в трите групи. Прави впечатление силният ефект на Метформин и Лираглутид върху плазмените нива на кръвна захар, $p=0.0001$. Средните стойности (ммол/л) на кръвна захар в трите групи са: в контролна група - 6.6 ± 0.7

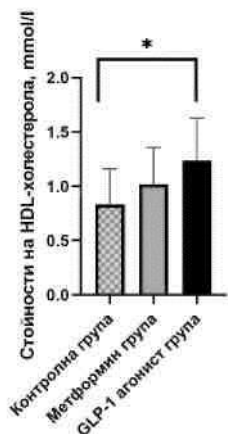
(най-нисък 95% CI of mean 6.1 - най-висок 95% CI of mean 7); в групата, третирана с Метформин 5.2 ± 0.9 (най-нисък 95% CI of mean 4.7 - най-висок 95% CI of mean 5.6) и в групата, третирана с Лираглутид 5.7 ± 0.6 (най-нисък 95% CI of mean 5.7-най- висок 95% CI of mean 6.5).



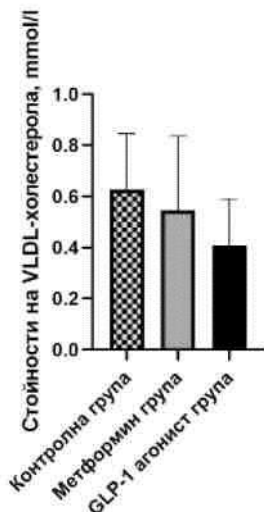
Фигура 9. Серумни стойности на кръвната захар (mmol/l). Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, *** $p=0.0001$.

Данните показаха значително повишаване на серумните нива на HDL-холестерола след третиране с Метформин и Лираглутид, $p < 0.05$ (фигура 10). Средните серумни нива на HDL-холестерол в контролата, групите на Метформин и Лираглутид бяха $0,8 \pm 0,3$ (най-нисък 95% CI of mean 0,6 - най-висок 95% CI of mean 1,1), $1 \pm 0,3$ (най-нисък 95% CI of mean 0,8 - най- висок 95% CI of mean 1,2) и $1,2 \pm 0,4$ (най-нисък 95% CI of mean 0,1 - най- висок 95% CI of mean 1,5), съответно.

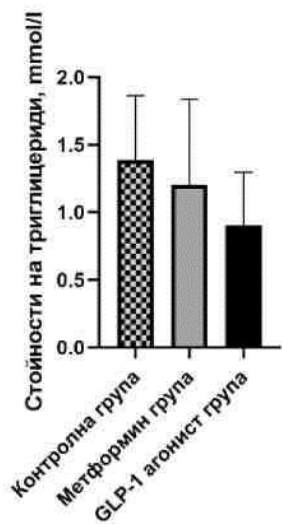
Не се установиха промени в серумните концентрации на триглицеридите и VLDL-холестерола след третирането с Метформин и Лираглутид (фигури 11-12).



Фигура 10. Серумни стойности на HDL-холестерола (mmol/l). Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, * $p < 0.05$ в сравнение с двете третиранни групи.



Фигура 11. Серумни стойности на VLDL-холестерола (mmol/l). Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.



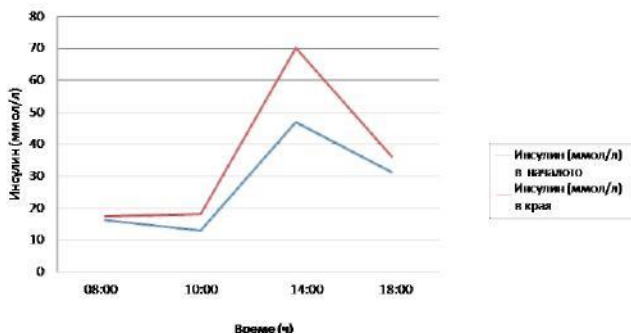
Фигура 12. Серумни стойности на триглицеридите (mmol/l). Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

Анализ на генетичните полиморфизми на гените за рецепторите (OCT1, MATE 1, MATE 2), както и за GLP1R беше направен с цел търсене на връзка между ефекта от лечението (по отношение на гликемичен контрол и редукция на тегло) и генетични вариации в рецепторите. Изследвани бяха 39 плъха за варианти в гените OCT1, MATE1, MATE2 и GLP1R. Подбраните региони представляват екзони (кодираща за протеин ДНК последователност) от ДНК на плъх, съответстващи по последователност на човешка ДНК, съдържаща варианти, които водят до промяна в отговора при лечение с Метформин и/или GLP1-агонисти. На базата на проведените молекулярно-генетични анализи не бяха открити генетични варианти в изследваните региони на гените OCT1 (екзон 7), MATE1 (екзони 8-10), MATE2 (екзон 4) и GLP1R (екзон 5) при извадката от мъжки плъхове порода Вистар.

Б. КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ

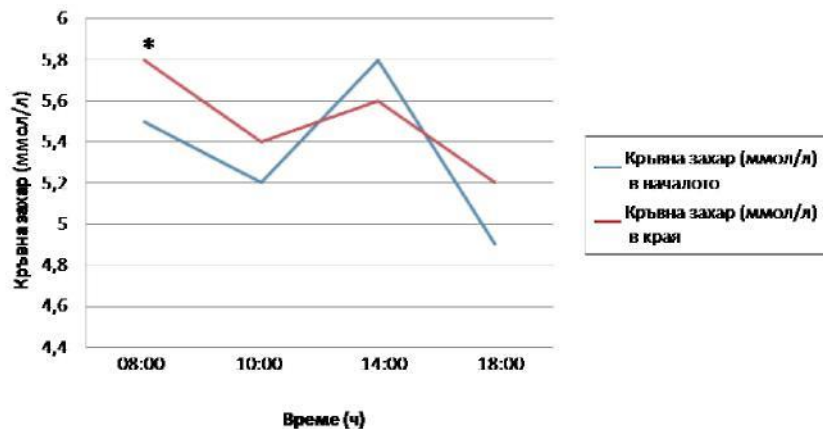
III. Изследване на влиянието на субхроничното приложение на хранителен режим, обогатен с фруктоза върху плазмените нива на глюкоза и инсулин, баланса на хормоните грелин и лептин и показатели на въглехидратна и мастна обмяна при жени с метаболитен синдром

Средните стойности на инсулин в кръвта на гладно не се различаваха между началото и края на проучването (фигура 13). Установихме по-високо плазмени концентрации на инсулин през последния ден на проучването (ден 5) в сравнение с първия ден на проучването (ден 1) с пик на инсулинова секреция в 14 ч.



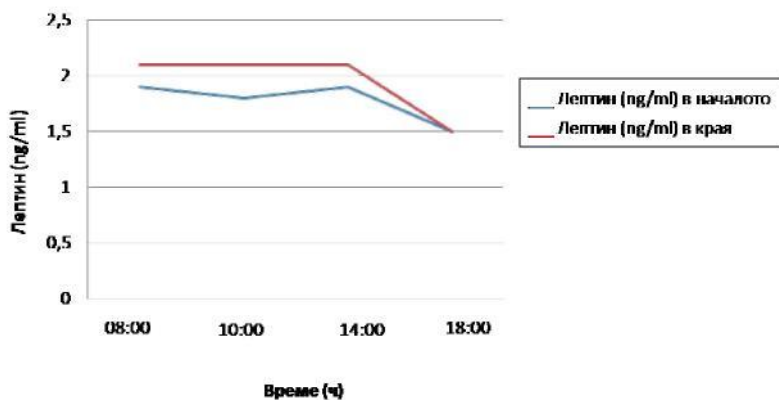
Фигура 13. Плазмени нива на инсулин ($\mu\text{U}/\text{mL}$) в началото и в края на диетологичното проучване при жени ($n=9$) с метаболитен синдром.

Установихме различни стойности на плазмените нива на захарта на гладно в началото и в края на изследването (5.5 ± 0.3 ммол/л, ден 1 vs. 5.8 ± 0.3 ммол/л, ден 5, $p < 0.05$), (фигура 14). Нивата на кръвната захар не се повлияха статистически значимо след субхроничния прием на фруктоза в сравнение със стойностите на глюкозата в началото на диетологичното проучване (фигура 14).



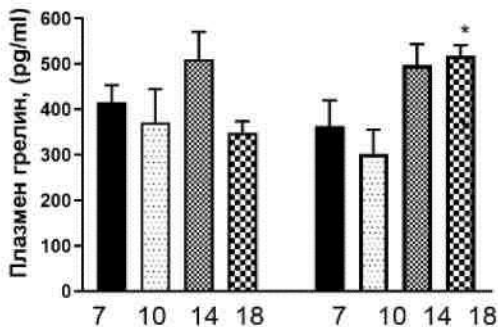
Фигура 14. Плазмени нива на кръвна захар (ммол/л) в началото и в края на диетологичното проучване при жени (n=9) с метаболитен синдром. Данните са представени като средна стойност, *p < 0.05.

Резултатите показаха повишение на плазмените нива на лептин през деня след субхроничен прием на фруктоза в сравнение с първия ден на проучването (фигура 15). Установихме, че през първия и последния ден не се наблюдават статистически значими различия в нивата на лептин в кръвта.



Фигура 15. Плазмени нива на лептин (ng/ml) в началото и в края на диетологичното проучване при жени с метаболитен синдром.

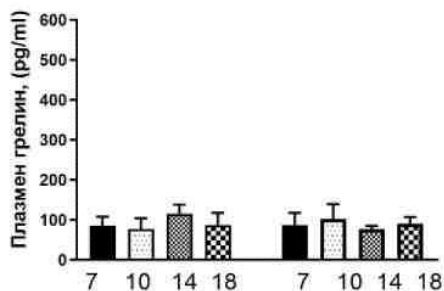
Резултатите показаха, че всеки от пациентите имаше своя характеристика на дневни и сутрешни нива на грелин в плазма, което се определяше от много фактори, вкл. индивидуалните особености на хранене на пациента преди включване в проучването. Първата група от пациенти със затлъстяване, които показаха високи нива на грелин в плазмата сутрин в 7.00 часа на гладно и чиито нива оставаха високи през целия ден преди приема на диета богата на фруктоза. На фигура 16 са представени резултатите, които показват и при четиримата пациенти увеличаване на грелин в плазма в 18 часа след диета с фруктоза. Грелин запази високи нива в плазмата при пациентите. При двама от пациентите нивата на грелин след фруктоза бяха с 50% увеличени сутрин в 7.00 в сравнение с тези преди фруктоза.



/Преди прием на фруктоза//След прием на фруктоза/

Фигура 16. Плазмени нива на грелин при пациенти със затлъстяване и високи начални сутрешни, дневни и вечерни нива на хормона преди стартиране на диета богата на фруктоза. Легенда: Грелин е определян сутрин в 7.00 на гладно, в 10.00, след обяд в 14.00 и вечер в 18.00 часа, съответно деня преди започване на диетата и деня след завършване на диетата.

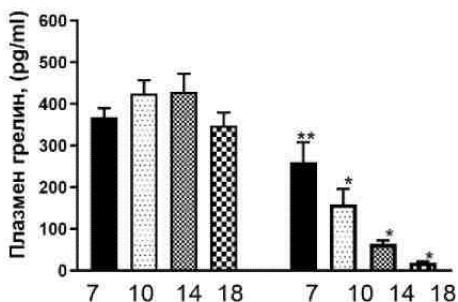
Втората група пациенти със затлъстяване показаха ниски нива на плазмен грелин сутрин на гладно преди диетата с фруктоза. При всичките грелин беше 2-3 пъти по-нисък от пациентите на първата група. Резултатите са представени на фигура 17. При пациентите от втора група грелин оставаше нисък целия ден преди стартиране на диета с фруктоза. Ниските нива на грелин се запазиха и след диетата с фруктоза при всичките пациенти. Няма статистически значими промени в нивата на грелин на всяко измерване след третиране с фруктоза в сравнение със съответните преди третиране.



/Преди прием на фруктоза/ /След прием на фруктоза/

Фигура 17. Плазмени нива на грелин при пациенти със затлъстяване и ниски начални сутрешни, дневни и вечерни нива на хормона преди стартиране на диета богата на фруктоза.

Трета група пациенти (двама) не бяха поставени на фруктоза поради откриване в първия ден на прием на непоносимост към фруктозата. Те обаче бяха на диетата на останалите пациенти с ограничаване на калорийния внос на храната но без фруктоза. Тази група е контрола, като за плацебо те имаха ниско калориен сок без фруктоза. Резултатите са показани на фигура 18. Пациентите постъпиха с високи плазмени нива на грелин при всички измервания преди поставяне на диета. Те бяха близки до тези на първа група пациенти със затлъстяване. След периода на диета се отчете значимо намаляване на плазмените нива на хормона.



/Преди плацебо диета/ /След плацебо диета/

Фигура 18. Плазмени нива на грелин при контролната-плацебо група пациенти със затлъстяване. Легенда: Грелин е определен сутрин в 7.00 на гладно, в 10.00, след обяд в 14.00 и вечер в 18.00 часа, съответно деня преди започване на диетата и деня след завършване на диетата

IV. Проучване ефекта на комбинацията на различни хранителни фактори (нисък/ висок гликемичен индекс и умерено/ висок прием на белтъчини) с различна по интензитета физическа активност върху развитието на захарен диабет тип 2 при пациенти с наднормено тегло/ затлъстяване и предиабет

След скрининга на пациенти бяха включени общо 2 326 лица, които бяха рандомизирани в проучването с n=555, n=556, n=559 и n=553 за групите НР-МІ, НР-НІ, МР-МІ и МР-НІ. В периода между рандомизацията и CID1 102 участници бяха напуснали проучването, главно поради оттегляне на съгласието по лични причини (таблица 8). Така общо 2224 пациенти участваха в CID1 и започнаха фазата на нискоенергийната диета. Поради това в анализите на данните от CID1 бяха включени 2223 пациенти. След фазата на нискоенергийния режим 122 лица не са загубили $\geq 8\%$ Телесна маса и следователно не са могли да продължат във фазата на поддържане на теглото. Други 79 лица не участваха в CID2, главно поради оттегляне на съгласието по лични причини. Седем лица бяха диагностицирани с ЗДТ2 на CID1 и поради това бяха изключени от изпитването. Общо 2 022 лица са участвали в CID2. От тях 1 857 отговарят на критериите за продължаване на фазата на поддържане на теглото. Общо 1 381 участници са завършили 1 година 1, 1 093 са завършили 2 години 2 и 962 са завършили 3-годишната интервенция (n = НР-МІ: 235, НР-НІ: 244, МР-МІ: 240, МР-НІ: 243). По този начин 1261 (или 54%) от всички рандомизирани лица (n=2326) са прекъснали участието си през 3-те години. Процентът на отпадане е бил сходен в четирите интервенционни групи (таблица 8).

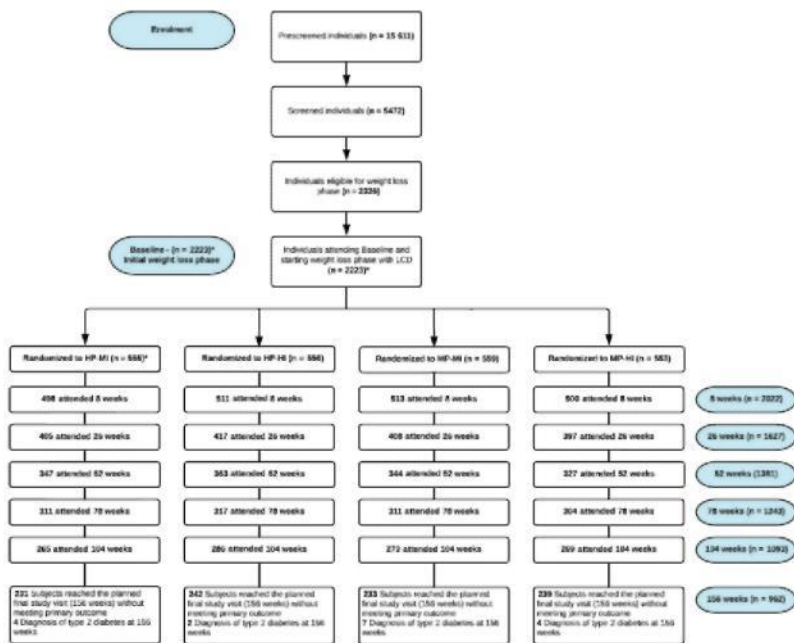


Таблица 8. Диаграма на проучването

Изходните характеристики на антропометричните оценки и кръвните анализи бяха сходни в четирите групи за интервенция. Жените представляваха 67,6 % от изследваната популация. Средната възраст е $51,4 \pm 11,6$ години (\pm стандартно отклонение) (в диапазон 25 - 70 години), Телесна маса $100,1 \pm 21,4$ кг, ИТМ $35,4 \pm 6,6$ kg/m^2 , плазмена глюкоза на гладно $6,2 \pm 0,7$ ммол/л, 2-часова натоварване $7,7 \pm 2,3$ ммол/л и HbA1c $36,7 \pm 4,1$ ммол/л.

Честотата на ЗДТ2 в зависимост от диетата, е постигнат при общо 62 участници, 30 в НР и 32 в МР диетата. Не се установи разлика между двете диети (коригирано съотношение на риска, HR за МР спрямо НР: 1,22 (95% доверителен интервал: 0,73 - 2,05), $p = 0,45$), но честотата беше по-ниска от очакваната и в двете групи (фигури 19-23).

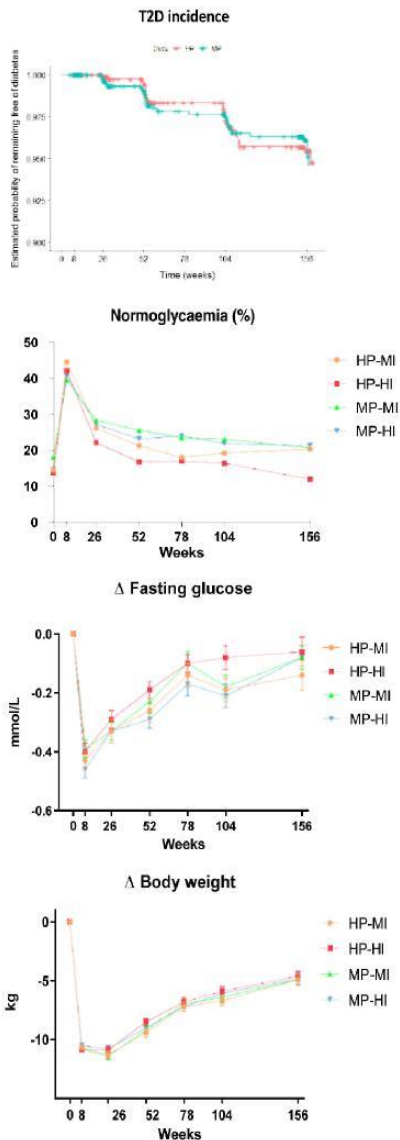
Телесна маса е намаляло с 11% след нискоенергийната фазата ($p < 0,001$). Допълнително малко намаление на телесното тегло е наблюдавано на шест месеца (4 месеца след фазата на поддържане на теглото). След 3 години средната промяна при завършилите интервенцията е $-4,8$ kg ($-6,1$ до $-3,4$ kg, $n = 962$) или -5% от първоначалното Телесна маса, което е значително различно от изходното ниво във всички интервенционни групи. Масната маса (ММ) показва подобна картина

като телесното тегло, докато свободната мастна тъкан остава на ниво, подобно на това след нискоенергийната фаза.

Общо 737 (78%) от 945 завършили участници не демонстрираха повече загуба на тегло след 3 години. От тях 200 участници (21%) са показали загуба на тегло $\geq 10\%$, 243 (26%) $\geq 5-10\%$ и 294 (31%) $\geq 0-5\%$. Не бяха установени значителни разлики между групите, участвали в интервенцията.

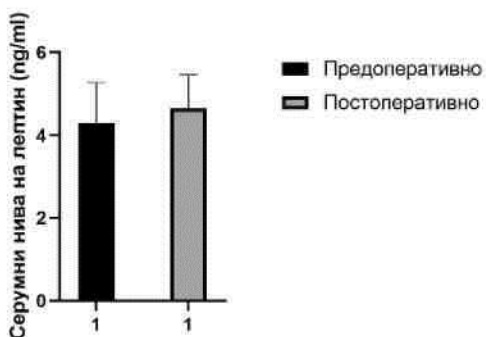
На 3тата година ИТМ, обиколката на талията и бедрата не се различаваха съществено между четирите интервенционни групи. Систоличното и диастоличното кръвно налягане, както и сърдечната честота бяха значително намалени след периода на нискоенергийния режим (фаза 1 на проучването), а сърдечната честота все още беше значително по-ниска след 3 години (фаза 2 на проучването). Всички изследвани параметри са значително намалени след фазата на нискоенергийния режим. По време на периода на поддържане на теглото плазмената глюкоза на гладно и HbA1c постепенно се увеличиха.

Фигури 19-23. Различни показатели (разпространение на ЗДТ2, нормогликемия, кръвна захар на гладно и телесна маса) спрямо интервенционната група.

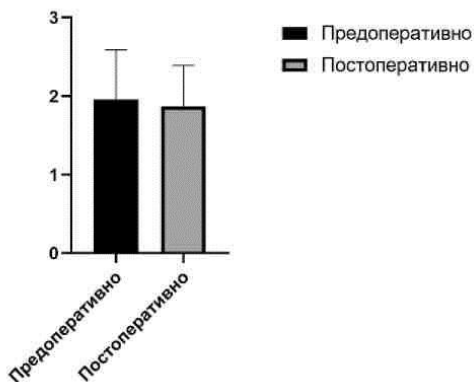


V. Влияние на бариатричната хирургия върху антропометричните параметри и хормоните, регулиращи апетита и метаболизма при хора с високостепенно затлъстяване

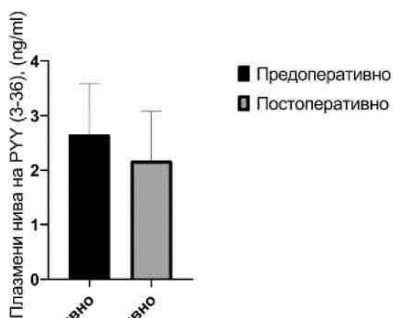
На фигури 24-29 са представени средните стойности на съответните параметри преди и един месец след бариатричната интервенция. Получените резултати не демонстрираха промяна в плазмените/ серумни нива на хормоните, регулиращи апетита. На първия месец след бариатрична интервенция нивата на лептин в кръвта се повишиха, докато на адипонектин и PYY (3-36) намаляха (фигури 24-26). Данните от грелин не са представени, тъй като не се отчете промяна в плазмените нива на този орексигенен хормон.



Фигура 24. Серумни нива на лептин преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

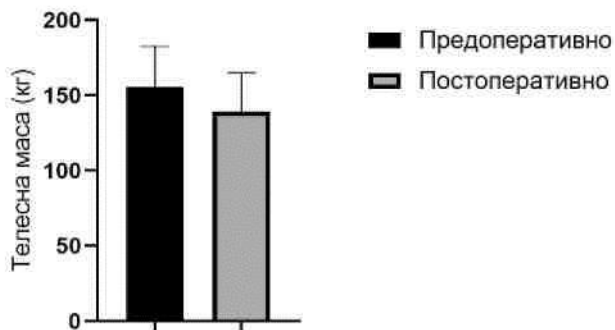


Фигура 25. Серумни нива на адипонектин преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

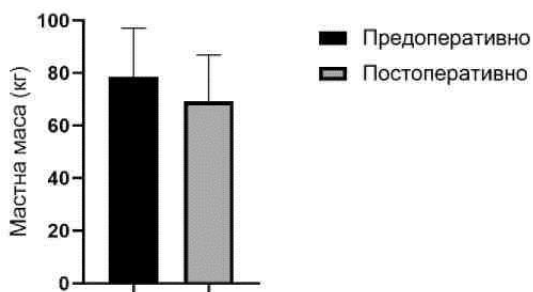


Фигура 26. Плазмени нива на PYY (3-36) преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

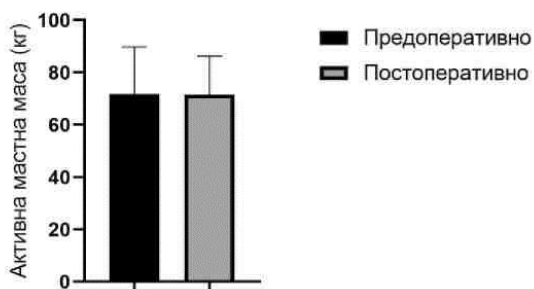
Не се установиха статистически значими разлики в стойностите на телесното тегло (кг), маснатата маса (кг) и активната мастна маса (кг) на първия месец след бариатричната интервенция (фигури 27-29). Редукцията на теглото беше очаквана от 15 кг на първия месец, което подкрепи данните в литературата (фигура 27).



Фигура 27. Телесна маса (кг) преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.



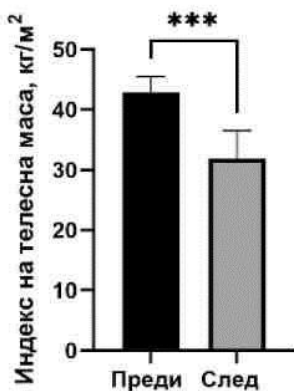
Фигура 28. Мастна маса (кг) преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.



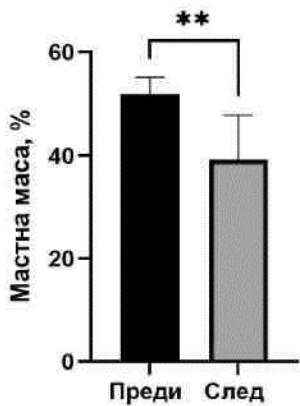
Фигура 29. Активна мастна маса (кг) преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

VI. Проследяване промяната във вкусовите предпочитания, мотивацията и самоконтрола при хранене и в хормоните, регулиращи апетита след бариатрична/ метаболитна хирургия

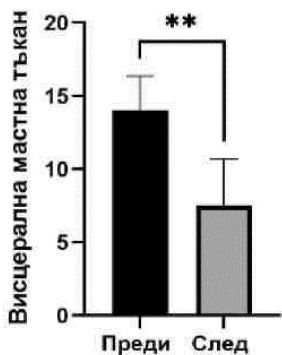
На фигури 30-33 са представени средните стойности на антропометричните параметри преди и шест месеца след бариатрична хирургия. Установиха се статистическо значимо намаление на ИТМ ($p=0.0002$), мастната тъкан ($p=0.008$) и висцералната мастна тъкан ($p=0.003$) след операцията в сравнение със същите параметри преди интервенцията. Не се наблюдаваха статистически значима промяна на свободната мастна тъкан преди и след бариатричната/ метаболитна хирургия (фигура 32).



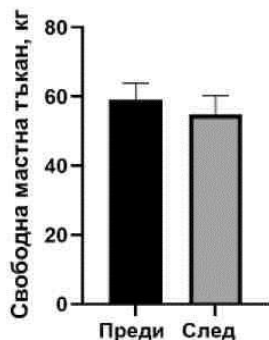
Фигура 30. Средна стойност на индекс на телесна маса (кг/м²) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, *** $p=0.0002$.



Фигура 31. Средна стойност на масната маса (кг) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, $**p= 0.008$.

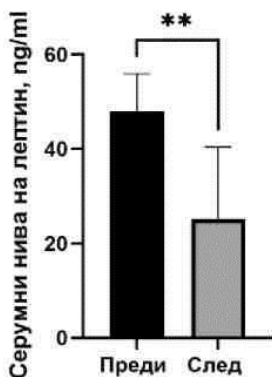


Фигура 32. Средна стойност на висцералната масна маса (кг) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, $**p= 0.003$.

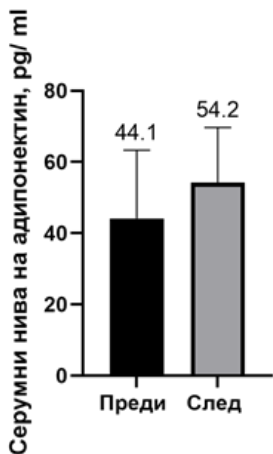


Фигура 33. Средна стойност на свободната мастна маса (кг) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

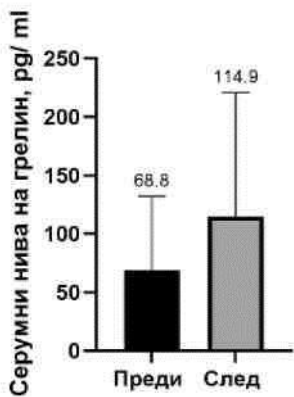
На фигури 34-37 са представени средните стойности на серумните концентрации на лептин (ng/ml), адипонектин (pg/ml), грелин (pg/ml) и холецистокинин (pg/ml) преди и шест след бариатричната хирургия. Наблюдаваше се статистически значимо намаление на серумните нива на лептин шест месеца след операцията сравнено с нивата преди операцията ($p=0.001$, фигура 34). Не се установиха статистически значима разлика в серумните нива на ентералните хормони и адипонектин преди и след хирургичната интервенция (фигури 36-37).



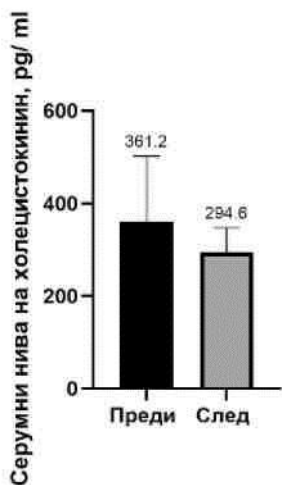
Фигура 34. Серумни нива на лептин (ng/ml) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, $**p=0.001$.



Фигура 35. Серумни нива на адипонектин (pg/ml) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.



Фигура 36. Серумни нива на грелин (pg/ml) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

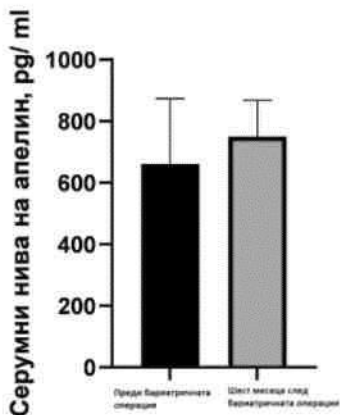


Фигура 37. Серумни нива на холецистокинин (pg/ml) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

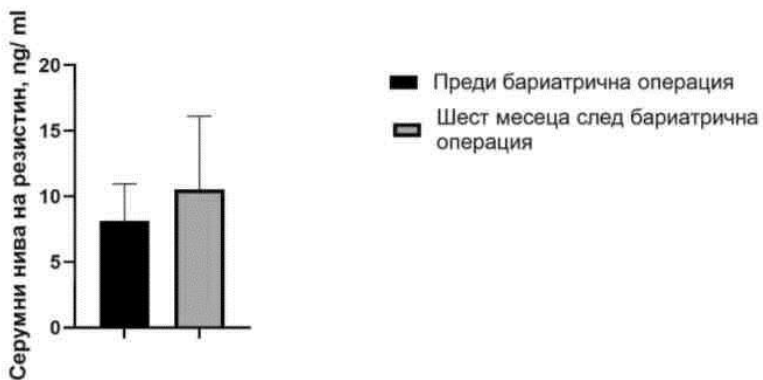
Резултатите от въздържанието от храна, оценено чрез въпросника за трифакторното хранене (TFEQ) показаха, че оценките за глад, желанието за хранене и желанието за консумация на нещо сладко са значително по-ниски след операцията в сравнение с изходното ниво ($p < 0.01$). Не се наблюдаваха промени в оценката на апетита чрез VAS (visual analogue scale) преди и след бариатричната/метаболичната операция.

VII. Ефект на бариатричната/ метаболична хирургия върху адипокиновия профил и адипокин-индуцираното възпаление

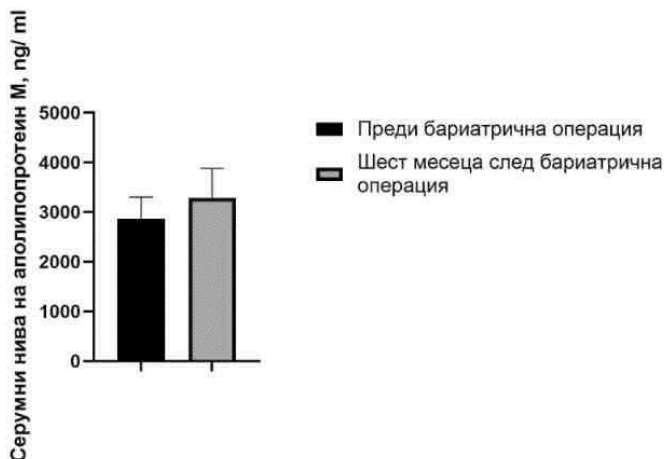
На фигури 38-40 са представени серумните нива на апелин (pg/ml), резистин (ng/ml) и аполипопротеин М (ng/ml) преди и шест месеца след бариатричната/ метаболичната операция. Не се установи ефект на бариатричната операция върху нивата на проинфламаторните адипокини в кръвта.



Фигура 38. Серумни нива на апелин (pg/ml) преди и шест месеца след бариатричната операция. Даните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.



Фигура 39. Серумни нива на резистин (ng/ml) преди и шест месеца след бариатричната операция. Даните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.



Фигура 40. Серумни нива на аполипопротеин М (ng/ml) преди и шест месеца след бариатричната операция. Даните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

На таблица 8 са представени средните стойности на телесната маса (кг), мастната маса (%), индекса на телесна маса (kg/m^2) и показателя за натрупване на висцерални мазнини. Не се установи статистическа разлика в посочените параметри преди и след проведената бариатрична операция.

Таблица 8. Статистически анализ на антропометричните данни и качествения анализ на тъканите

	Група	Брой	Средна стойност	Стандартно отклонение	Стандартна грешка	Статистическа значимост, $p < 0.05$
Телесна маса, кг	Преди	9	82.367	63.1226	21.0409	Няма $P=0.5$
	След	9	61.756	49.0430	16.3477	
Мастна маса, %	Преди	9	34.544	26.0382	8.6794	Няма $P=0.5$
	След	9	26.167	20.7788	6.9263	
Индекс на телесна маса	Преди	9	28.57	21.549	7.183	Няма $P=0.4$
	След	9	21.29	16.458	5.486	
Показател за висцерално натрупване на мазнини	Преди	9	9	7.246	2.415	Няма $P=0.2$
	След	9	5	4.528	1.509	

5. ОБСЪЖДАНЕ

Моделите на експериментално индуцираните хипофункция и хиперфункции на щитовидната жлеза са подходящи за изследване на метаболитните промени, които са резултат от патологията на щитовидната жлеза. Посочените резултати от настоящите експериментални изследвания утвърждават ролята на хормона лептин в регулацията на функциите на щитовидната жлеза. Изследванията с две фармакологични средства документират промените, които могат да се очакват в регулационните механизми на лептин и тиреоидната функция. Резултатите документират, че двете фармакологични средства повлияват, както тиреоидния статус, така и нивата на лептин, адипонектин и грелин. За първи път се документира ролята на баланса между посочените три хормона като маркер за ефективно лечение на тиреоидна патология при затлъстяване.

Проучванията върху грелин са задачи на настоящите експериментални и клинични изследвания. Резултатите от изследвания на ацетилиран грелин в кръв на мъжки плъхове с експериментален модел на хипертиреозидизъм демонстрират повишени нива на грелин. Няма статистически значими промени в ацетилиран грелин при плъховете с експериментален модел на хипотиреозидизъм. Третирането с Метформин и Емпаглифлозин предизвика повишаване на грелин и достигане на стойностите за контролната група плъхове. Клиничните изследвания върху грелин документират промени при пациенти със затлъстяване. За първи път нашите резултати документират ролята на баланс между лептин и грелин в механизмите на затлъстяване и нарушена тиреоидна функция.

При провеждане на изследванията за възможни фармакогенетични ефекти при терапия с Метформин и Лираглутид (GLPR агонист) при плъхове Вистар, бяха специално подбрани кодиращи екзони в гените *OCT1*, *MATE1*, *MATE2* и *GLP1R*, поради наличието на висока хомоложност между гените на човек и плъх. При човешките гени, спомнатите региони съдържат варианти, определящи индивидуален отговор към терапия с Метформин. На базата на тези познания, съответните региони бяха секвенирани в извадка от плъховете, състояща се от контролни и лекувани с Метформин плъхове. В цялата извадка не бяха открити варианти в изследваните екзони на изброените по-горе гени; нито на позициите в кодиращата последователност, еквивалентни на фармакогенетични варианти при човек, нито в останалата част от протеин-кодиращата ДНК последователност. Заключениеето от проведеният анализ е, че плъховете са „див тип“, тоест не се наблюдават изменения в съответните гени. Следователно, ако се наблюдават различ-

ни изходи по време на и след терапия между самите пльхове, то това не се дължи на изследваните гени. Тъй като пльховете са приемали еднакво количество Метформин, дозата също може да бъде изключена като причина за различен резултат от терапията. Като логично обяснение би следвало да има други гени отговорни за разликата, а също е възможно да има и други фактори (напр. околна среда, диета и стрес).

Диета, която е богата на фруктоза увеличава плазмените нива на грелин вечер при пациенти със затлъстяван и високи дневни изходни нива на грелин. Това корелира с промени на апетита, които пациентите съобщават по-често вечерно време. Това може да обясни повишения апетит при някои пациенти. Високи нива на грелин вечер са причина за повишен апетит, прием на повече храна вечер/нощем, съответно невъзможност нощем да се метаболизира напълно приетата храна и следва процес на натрупване като мастна тъкан. Това е нежелан ефект на богата на фруктоза диета при хора със затлъстяване. Реално, настоящето проучване, извършено върху диагностицирани със затлъстяване пациенти показва новост свързан с риск от употреба на богата на фруктоза диета при пациенти с високи плазмени нива на грелин. Диета, която е богата на фруктоза не променя статистически значимо плазменият грелин при пациенти с изходни ниски дневно/вечерни нива на хормона. Тези пациенти са в групата на по-малко рискови за употребата на фруктоза. Всеки пациент в настоящето проучване има индивидуалната характеристика на денонощно плазмено ниво на грелин при постъпването. Всички пациентите нямат денонощен ритъм на секреция на грелин на база на 4-те определяние-сутрин, след обяд и вечер. Това е важен резултат както при тези с високи сутрешни нива, така и при тези с ниски сутрешни нива, така и при контролните. Този резултат ни дава основание да предположим, че промени в денонощната секреция на грелин са възможна причина за затлъстяването.

Основният извод от интервенционното проучване PREVIEW е, че честотата на ЗДГ2, проследена по време на 3-годишна интервенция на начина на живот, не се различава между двете хранителни интервенции, свързани с различен гликемичен индекс и различен прием на белтъчини. Въпреки, че основната ни хипотеза (че диетата с по-високо съдържание на белтъчини и по-нисък гликемичен индекс ще бъде по-добра от сегашната най-добра практика с по-ниско съдържание на белтъчини и по-високо съдържание на въглехидрати) не можа да бъде потвърдена, честотата на ЗДГ2 сред завършилите е значително по-ниска от прогнозираната от предишни проучвания за превенция на диабета. На второ място, нямаше разлики в честотата на ЗДГ2 между двете групи с различна по интензитет физическа активност или при сравняването на четирите групи с диета и упражнения. Тези "негативни" резултати може да са

свързани с голямото намаление на телесното тегло (-11 % от изходното тегло) след периода на отслабване и стандартно с 5% по-ниско тегло след 3 години интервенция (анализи на завършилите). В сравнение с изходното ниво, повечето вторични резултати, включително тези, свързани с риска от ЗДТ2, също са се подобрили на 3 години, без да има основни разлики между групите на интервенция.

Основна силна страна на PREVIEW е използването на нискоенергийна диета в преддиабетна кохорта, което е довело до голяма първоначална бърза загуба на тегло. Тази степен на загуба на тегло се оказва силно мотивираща за участниците в проучването, като им даде вдъхновение и желание да променят начина си на живот към по-здравословен модел на хранене и физическа активност. Това се отрази в по-високи намерения за здравословно хранене, физически упражнения и самооценка, както и в по-позитивно възприемане на очакваните резултати от проучването при участниците, които са постигнали целевата загуба на тегло, в сравнение с тези, които не са постигнали тази загуба на тегло (162). Интересно е, че данните от проучването DioGenes показват, че след подобен период на нискоенергийна диета субективните усещания за апетит са значително променени в сравнение с изходните усещания (163). Така, след стандартизирано тестово хранене е отчетено 14% увеличение на усещането за ситост и 18-20% намаление на усещането за глад и желание за хранене в сравнение с изходното ниво ($p < 0,05$). Очаква се подобни промени в усещанията за апетит да улеснят участниците в проучването да приемат и поддържат диета с по-малко енергия по време на периода на поддържане на теглото, поне в началните етапи.

Разработването и използването на специфичен психологически подход за промяна на поведението (PREMIT) за целите на проучването може да се счита за още една силна страна в проекта (164). Този подход беше използван при всички групови посещения, за да обучи и мотивира участниците в проучването как да променят хранителните и двигателните си навици и как да се придържат към тях в дългосрочен план. Възможно е това наистина да е било толкова ефикасно за промяна на навиците на участниците във всичките 4 групи за интервенция, че поне отчасти да обяснява липсата на разлики между групите за лечение. Присъствието в групите, а не като индивидуални лица, също би могло да мотивира и помогне на участниците да се придържат към предписанията на интервенцията.

Проучването PREVIEW е първото, което изследва ефекта на два различни режима на хранене, с акцент върху белтъчините и гликемичния индекс, върху поддържането на теглото след бърза загуба на тегло и по този начин върху превенцията на ЗДТ2 при лица с предиабет. Това е нов подход, тъй като различните диети не са били сравнявани в предишни

проучвания за превенция на диабета (165). Спазването на диетите, оценено по приема на белтъчини (от анализите на урината), е било сравнително високо през първите 12-18 месеца. Въпреки това диетата умерено съдържание на белтъчини е била с по-високо съдържание на белтъчини от целевото (стандартно 0,84 g/kg спрямо 0,95 g/kg) (166) и вероятно с достатъчно високо съдържание на белтъчини, за да се насърчи поддържането на телесното тегло, независимо от съдържанието на въглехидрати (166). В сравнение с финландското проучване за превенция на диабета (n = 522) и американската програма за превенция на диабета (n=1079) в групата с интензивен начин на живот в проучването PREVIEW има особени предимства. PREVIEW включва много голяма извадка от >2 300 участници с предиабет и използва многоцентрови, многонационални и мултиетнически подходи, което прави резултатите по-обобщени за други популации в Европа и по света. По време на 3-годишната интервенция се наблюдава сравнително голям процент на отпадане, като само 43% остават в проучването в края на 3-годишния период. Това трябва да се счита за слабост, тъй като намалява статистическата сила и възможността за интерпретиране на резултатите. За съжаление, не е необичайно за дългосрочни, интензивни проучвания с голяма тежест за участниците да се наблюдава висок процент на отпадане. Интересно е, че намаляването в мотивацията е било по-голямо през първите 6-12 месеца, отколкото през втората половина на проучването. Така 19,5 % са напуснали проучването между 2 и 6 месец, докато 15,1 % са го напуснали между 6 и 12 месец, а 10-12 % - между 12 и 36 месец.

Както бе споменато по-горе, спазването на двата различни режима на хранене е било сравнително добро през първата част на проучването. Обратно, при 2-те режима на физическа активност групите МИ и ХИ не можеха да бъдат разграничени една от друга в групите МИ и ХИ. Поради това не можем да заключим дали интензивността на физическата активност е оказала влияние върху нашите резултати въз основа на данните, разделени по 2 групи физическа активност.

Целта за по-висок прием на белтъчини (т.е. 25 % от енергията) в диетата на НР може да се счита за потенциално вредна при рискова популация, каквато са участниците в PREVIEW, особено с напредване на възрастта (167). Поради това още в началото на проекта се взе предвид мониторирането на бъбречната функция в подгрупата от участници с напреднала възраст (≥ 55 години). Въз основа на проби от урина и кръв (креатининов клирънс, оценена скорост на гломерулна филтрация, съотношение албумин/креатинин в урината, съотношение урея/креатинин в урината, серумен креатинин и серумна урея) установихме, че по-високият прием на белтъчини не е свързан с намаляване на бъбречната функция след 1 година на диетите.

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

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

Нашето изследване демонстрира статистически значимо повишение в серумните концентрации на лептин шест месеца след бариатрична операция. Всяко явление, водещо до повишение на циркулиращите нива на хормона, както и на сигналните пътища, свързани с хипоталамичната регулация, намалява експресията на гена за AgRP/ NPY и увеличава тази за PONS. Ефектите върху тази невронална активност водят до проява на ситост и увеличен разход на енергия. Редукцията на телесна маса води до сенсibiliзиране на лептиновите рецептори. Този феномен също играе роля в индуцираната от бариатричната хирургия редукция на теглото. Също така, серумните нива на адипонектин се повишават, което най-вероятно е свързано с подобряването на общия метаболитен профил и

намаляването на мастната тъкан шест месеца след бариатрична/ метаболитна интервенция. Редица проучвания установяват, че при подобряване на инсулиновата чувствителност на тъканите вследствие редукцията на тегло, се увеличават плазмените нива на адипонектин. Нашето изследване доказва и промени в ентералните хормони шест месеца след операция за лечение на високостепенно затлъстяване. Резултатите потвърждават данните в литературата за намаление на циркулиращите нива на грелин и холецистокинин, което се свързва с намаляване на апетита и последваща редукция на теглото.

Нашите резултати демонстрират значително по-ниски оценките за глад, желанието за хранене и желанието за консумация на нещо сладко шест месеца след операцията в сравнение с изходното ниво ($p < 0.01$). Витег и сътрудници заключават, че промените в чувствителността към вкуса не повлиява хедоничното възприемане на захарозата, докато Перино и колеги откриват, че пациентите с RYGB са променили отговорите си към повтаряща се експозиция на захароза от приятно към неприятно усещане към бързите въглехидрати по време на следоперативните изпитвания на вкусовите възприятия. Интерес представляват установените от Перино и сътрудници промени в трикратно намаляване на размера на езиковите папили (papillae linguales) и на секрецията на алфа-густудуцин, с което може да се обясни намалената чувствителност и усещане за нуждата от прием на сладки храни, особено такива, съдържащи захароза.

Психо-емоционалната регулация на възприятието на храната като „възнаграждение“ е сложна невро-ендокринна система, която може да бъде разделена анатомично и оперативна на няколко компонента. Но докато „харесването“ на храната се организира главно по сензорни пътища, които се влияят от очистеност, вкус и визия на храната и невроналните механизми се контролират на ниво кортико-лимбична система, то желанието за храна се организира основно от мезолимбичната допаминова система, състояща се от средния мозък, базалните ганглии, кортекса и хипоталамуса. При гризачите съществува тест, който може да оцени тази компонента на възприемане на храната, наречен „тест за реактивност на вкуса“. При експериментални плъхове със затлъстяване, предизвикано от хранене на високоенергийна и богата на мазнини диета, след извършване на RYGB се наблюдава следоперативна промяна в предпочитанията към храни богати на захароза и съдържащи царевични масла.

В последните години се установи, че затлъстяването се характеризира с нискостепенно възпаление и увеличени нива на проинфламаторните цитокини и адипокини (168). Нашето проучване при лица с високостепенно затлъстяване не установи промени в апелин, резистин и

аполипротеин М след бариатрична интервенция. В литературата е описано, че хората, живеещи със затлъстяване показват значително по-високи плазмени нива на апелин в сравнение със здравите (169, 170). Soriguer и сътр. (171) демонстрира, че нивата на плазменият апелин са повишени само при пациенти със затлъстяване и диабет, но не и при такива без диабет, в сравнение с контрола група. Това показва, че затлъстяването и телесните мазнини може да не са основните фактори, променящи нивата на циркулиращия апелин и инсулиновата резистентност може да бъде по-важна от затлъстяването при повишаване на плазмените нива на апелин при хора (111). Увеличението на плазмените нива на апелин може да бъде и резултат от компенсаторен отговор на инсулиновата резистентност (111, 171). Въпреки че има е силна положителна корелация между плазмените нива на апелин и TNF- α експресия в мастната тъкан, ролята на апелин в регулирането на възпалителния отговор все още не е изяснен (111). Krist и сътр. (172) също демонстрират, че бариатричната хирургия рязко намалява експресията на апелин в мастната тъкан както и серумния апелин, което значително корелира с подобрената чувствителност към инсулин. Тази корелация не зависи от промените в ИТМ. Необходими са повече проучвания, за да се изследват тези основни механизми.

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

6. ИЗВОДИ

1. Експерименталният модел на хипофункция на щитовидната жлеза е лесен метод за изследване на метаболитните промени, свързани с намалената функция на жлезата.

2. Метформин и Емпаглифлозин намаляват серумните нива на лептин и адипонектин при плъхове с експериментален модел на хипофункция на щитовидната жлеза.

3. Кафетерийната диета води до повишение на телесното тегло и индекса на телесна маса като основни показатели за затлъстяване при експериментални животни.

4. Метформин и Лираглутид намаляват индекса на телесна маса при плъхове с експериментално индуцирано затлъстяване чрез кафетерийната диета.

5. Метформин и Лираглутид увеличават серумните концентрации HDL-холестерола, намаляват триглицеридите и кръвната захар при плъхове с експериментално индуцирано затлъстяване чрез кафетерийната диета.

6. Заключението от проведения генетичен анализ е, че плъховете са „див тип“, тоест не се наблюдават изменения в съответните гени и ефекта от терапията с Метформин и Лираглутид не се дължи на по-горе изследваните гени.

7. Всеки пациент в настоящето проучване има индивидуалната характеристика на денонощно плазмено ниво на грелин при постъпването.

8. Диета, която е богата на фруктоза увеличава плазмените нива на грелин вечер при пациенти със затлъстяване и високи дневни изходни нива на грелин.

9. Диета, която е богата на фруктоза не променя статистически значимо плазменият грелин при пациенти с изходни ниски дневно/вечерни нива на хормона. Тези пациенти са в групата на по-малкорискови за употребата на фруктоза.

10. Комбинацията от храни с различен гликемичен индекс и ниско до умерено съдържание на белтъчини и различната интензивност физическа активност не променят вероятността за развитие на захарен диабет тип 2 при лица с наднормено тегло/затлъстяване и предиабет.

11. Бариатричната хирургия води до редукция на телесна маса, индекс на телесна маса, промяна в мастната маса и запазване на активната мастна маса един и шест месеца след операцията.

12. Промени в телесния състав не водят до промени в регулацията на апетита в този ранен постоперативен период (на един и шест месеца след операцията).

7. ПРИНОСИ

7.1. Научно-теоретични

7.1.1. Оригинални

7.1.1.1. За първи път се проследи ефекта от третирането с Метформин и Емпаглифлозин върху параметри на въглехидратния метаболизъм и хормоните, участващи в регулацията на апетита при експериментални животни с модел на хипофункция на щитовидната жлеза.

7.1.1.2. За първи път се изследва ефекта на Метформин и Лираглутид върху антропометричните параметри при експериментални плъхове с модел на затлъстяване чрез кафетерийна диета.

7.1.1.3. За първи път се изследват генетични варианти на гените за рецепторите (OCT1, MATE 1, MATE 2), както и за GLP1R с цел търсене на връзка между ефекта от лечението (по отношение на гликемичен контрол и редукция на тегло) и генетични вариации в рецепторите.

7.1.1.4. За първи път се установи различни денонощни нива на грелин в кръвта при лица със затлъстяване и ефекта на диета, богата на фруктоза върху серумните грелинови нива.

7.1.1.5. За първи път се демонстрира влиянието на гликемичния индекс, белтъчините и различния интензитет на физическа активност върху вероятността за развитие на ЗДТ2 при лица със затлъстяване и предиабет.

7.1.1.6. За първи път се установяват ранните ефекти (на първия и шестия месец) от бариатричната хирургия върху телесното тегло и телесния състав при лица с високостепенно затлъстяване.

7.1.1.7. За първи път се проучи влиянието на бариатричната хирургия върху анорексигенните (лептин, адипонектин, пептид YY, глюкагон подобния пептид-1, холецистокинин) и орексигенния (грелин) хормони при лица с високостепенно затлъстяване.

7.1.1.8. За първи път се проследи хранителното поведение чрез промяна във вкусовете предпочитания, мотивацията и самоконтрола при хранене при лица с високостепенно затлъстяване.

7.1.1.9. За първи път се проучи влиянието на бариатричната хирургия върху проинфламаторните адипокини при лица с високостепенно затлъстяване.

7.1.2. Потвърдителни

7.1.2.1. Потвърждава се установената нарушена регулация на апетита при високостепенно затлъстяване.

7.1.2.2. Потвърждават се благоприятните ефекти на Метформин и Лираглутид върху параметрите на мастна и въглехидратна обмяна, както и върху телесното тегло и състав.

7.2. Научно-практически

7.2.1. Внедри се експериментален модел на хипо- и хиперфункция с цел изследване на промени в апетита и метаболизма и влиянието на фармакологични средства върху тях.

7.2.2. Въведе се лесен за създаване модел на затлъстяване чрез кафетерийна диета за изследване влиянието на фармакологични и нефармакологични средства, които се използват в терапията на затлъстяването.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД, НЕУЧАСТВАЩИ В ПРЕХОДНИ КОНКУРСИ ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ДЪЛЖНОСТ „ДОЦЕНТ“ И СТЕПЕН „ДОКТОР“

I. СТАТИИ С ИМПАКТ ФАКТОР

1. Zhu R, Larsen TM, Poppitt SD, Silvestre MP, Fogelholm M, Jalo E, Hätönen KA, Huttunen-Lenz M, Taylor MA, Simpson L, Mackintosh KA, McNarry MA, Navas-Carretero S, Martinez JA, Handjieva-Darlenska T, Handjiev S, Drummen M, Westerterp-Plantenga MS, Lam T, Vestentoft PS, Muirhead R, Brand-Miller J, Raben A. Associations of quantity and quality of carbohydrate sources with subjective appetite sensations during 3-year weightloss maintenance: Results from the PREVIEW intervention study. *Clin Nutr.* 2022 Jan;41(1):219-230.

2. Zhu R, Fogelholm M, Poppitt SD, Silvestre MP, Møller G, Huttunen-Lenz M, Stratton G, Sundvall J, Råman L, Jalo E, Taylor MA, Macdonald IA, Handjiev S, Handjieva-Darlenska T, Martinez JA, Muirhead R, Brand-Miller J, Raben A. Adherence to a Plant-Based Diet and Consumption of Specific Plant Foods-Associations with 3-Year Weight-Loss Maintenance and Cardiometabolic Risk Factors: A Secondary Analysis of the PREVIEW Intervention Study. *Nutrients.* 2021 Nov 1;13(11):3916.

3. Tremblay A, Fogelholm M, Jalo E, Westerterp-Plantenga MS, Adam TC, Huttunen-Lenz M, Stratton G, Lam T, Handjieva-Darlenska T, Handjiev S, Martinez JA, Macdonald IA, Simpson EJ, Brand-Miller J, Muirhead R, Poppitt SD, Silvestre MP, Larsen TM, Vestentoft PS, Schlicht W, Drapeau V, Raben A. What Is the Profile of Overweight Individuals Who Are Unsuccessful Responders to a Low-Energy Diet? A PREVIEW Substudy. *Front Nutr.* 2021 Nov 2;8:707682.

4. Desimira Mironova. Teodora Handjieva-Darlenska. Effect of metformin and empagliflozin on adiponectin and leptin levels in rat model of hypo- and hyperthyroidism. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* Volume 35, 2021 - Issue 1

5. Razvigor Darlenski, Vesselina Mihaylova, Teodora Handjieva-Darlenska. The Link Between Obesity and the Skin. *Front Nutr* 2022 Mar 10;9:855573

6. Navas-Carretero S, San-Cristobal R, Siig Vestentoft P, Brand-Miller JC, Jalo E, Westerterp-Plantenga M, Simpson EJ, Handjieva-Darlenska T, Stratton G, Huttunen-Lenz M, Lam T, Muirhead R, Poppitt S, Pietiläinen KH, Adam T, Taylor MA, Handjiev S, McNarry MA, Hansen S, Brodie S, Silvestre

MP, Macdonald IA, Boyadjieva N, Mackintosh KA, Schlicht W, Liu A, Larsen TM, Fogelholm M, Raben A, Martinez JA. Appraisal of Triglyceride-Related Markers as Early Predictors of Metabolic Outcomes in the PREVIEW Lifestyle Intervention: A Controlled Front Nutr. 2021 Nov 1;8:733697

7. Zhu R, Fogelholm M, Larsen TM, Poppitt SD, Silvestre MP, Vestentoft PS, Jalo E, Navas-Carretero S, Huttunen-Lenz M, Taylor MA, Stratton G, Swindell N, Kaartinen NE, Lam T, Handjieva-Darlenska T, Handjiev S, Schlicht W, Martinez JA, Seimon RV, Sainsbury A, Macdonald IA, Westerterp-Plantenga MS, Brand-Miller J, Raben A. Corrigendum: A High-Protein, Low Glycemic Index Diet Suppresses Hunger but Not Weight Regain After Weight Loss: Results From a Large, 3-Years Randomized Trial (PREVIEW). Front Nutr. 2021 Jul 23;8:736531

8. Raben A, Vestentoft PS, Brand-Miller J, Jalo E, Drummen M, Simpson L, Martinez JA, Handjieva-Darlenska T, Stratton G, Huttunen-Lenz M, Lam T, Sundvall J, Muirhead R, Poppitt S, Ritz C, Pietiläinen KH, WesterterpPlantenga M, Taylor MA, Navas-Carretero S, Handjiev S, McNarry MA, Hansen S, Råman L, Brodie S, Silvestre MP, Adam TC, Macdonald IA, SanCristobal R, Boyadjieva N, Mackintosh KA, Schlicht W, Liu A, Larsen TM, Fogelholm M. The PREVIEW intervention study: Results from a 3-year randomized 2 x 2 factorial multinational trial investigating the role of protein, glycaemic index and physical activity for prevention of type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab. 2021 Feb;23(2):324-337.

9. Christensen P, Meinert Larsen T, Westerterp-Plantenga M, Macdonald I, Martinez JA, Handjiev S, Poppitt S, Hansen S, Ritz C, Astrup A, PastorSanz L, Sandø-Pedersen F, Pietiläinen KH, Sundvall J, Drummen M, Taylor MA, Navas-Carretero S, Handjieva-Darlenska T, Brodie S, Silvestre MP, Huttunen-Lenz M, Brand-Miller J, Fogelholm M, Raben A. Men and women respond differently to rapid weight loss: Metabolic outcomes of a multi-centre intervention study after a low-energy diet in 2500 overweight, individuals with pre-diabetes (PREVIEW). Diabetes Obes Metab. 2018 Dec;20(12):2840-2851.

10. Fogelholm M, Larsen TM, Westerterp-Plantenga M, Macdonald I, Martinez JA, Boyadjieva N, Poppitt S, Schlicht W, Stratton G, Sundvall J, Lam T, Jalo E, Christensen P, Drummen M, Simpson E, Navas-Carretero S, Handjieva-Darlenska T, Muirhead R, Silvestre MP, Kahlert D, Pastor-Sanz L, Brand-Miller J, Raben A. PREVIEW: Prevention of Diabetes through Lifestyle Intervention and Population Studies in Europe and around the World. Design, Methods, and Baseline Participant Description of an Adult Cohort Enrolled into a Three-Year Randomised Clinical Trial. Nutrients. 2017 Jun 20;9(6):632.

II. РЕФЕРИРАНИ СТАТИИ

11. Теодора Ханджиева-Дърленска. Ефект на бариатричната/метаболична хирургия върху нискостепенното възпаление при затлъстяване. GP News, брой 8 (255) 2021, стр. 30-34

12. Ивана Калинкова. Теодора Ханджиева-Дърленска. Връзка между затлъстяване, имунна защита, различни хранителни фактори и COVID-19. GP News, брой 5 (252) 2021, стр. 54-57

13. Мария Калинкова, Теодора Ханджиева-Дърленска. Фармакогенетични механизми за избор на лекарство за лечение за захарен диабет тип 2. GP News, брой 8 (243) 2020, стр. 21-24

14. И. Калинкова, Е. Григоров, Т. Ханджиева-Дърленска. Съвременен подход за лечение на хиперхолестеролемия с лекарства, които са фиксирани дозови комбинации. GP News, БРОЙ 9 (230) ГОДИНА 20, 2019

15. Ханджиева-Дърленска, Теодора Св., Гроздев, Константин С., Каменов, Здравко А. Бариатрична хирургия и вкусови предпочитания: нови механизми за редукция на теглото. Ендокринология том XXIV №2/2019

SUMMARY

Obesity is a chronic metabolic disease that is characterized by an excessive accumulation of fat tissue. Obesity leads to an increased risk for insulin resistance, diabetes mellitus type 2 and cardio-vascular diseases. It is established that appetite regulation is disrupted in obese animals and humans. Based on the body mass index different therapeutic modalities (diet, increased physical activity, pharmacotherapy, and/ or bariatric surgery) are chosen for the treatment of obesity. In the scientific literature there is insufficient body of evidence for the changes or maintenance of balance between the orexigenic hormone (ghrelin) and the anorexigenic hormones (leptin, adiponectin, peptide YY, glucagon like peptide-1, cholecystokinin etc.) and the effect of the above-mentioned therapeutic tools.

The aim of our studies (experimental and clinical) is to reveal the effect of drugs (metformin, empagliflozin, liraglutide) as long as different dietary factors (glycemic index and proteins) and bariatric surgery on the hormones regulating appetite, metabolism, and obesity. We used up-to-date investigative techniques, mainly non-invasively, in vivo to show the changes in appetite-regulating hormones, and the low-systemic inflammation in experimentally induced obesity and in human obesity. The current work throws new light on appetite regulation in obesity.