

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

Д-р Людмил Калистратов Лазаров

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

*Дисертационен труд за придобиване на
образователна и научна степен „доктор”*

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

Научни ръководители:

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

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

София • 2017

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

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

На латиница

AMA – American Medical Association
BMI – индекс на т.м. (ИТМ)
BMR – базален метаболизъм (основна обмяна)
ССК – холецистокинин
CID - clinical investigation day
CFU – колония формиращи единици
CRP – С-реактивен протеин
DPP-4 – дипептидил пептидаза-4
ECW – екстрацелуларна вода
GLP – глюкагон-подобен пептид
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
FFA – свободни мастни киселини
FM – fat mass
FFM – fat free mass
FMT – фекален микрофлорен трансплант
FTO – Fat mass and obesity-associated protein
HbA_{1c} – гликиран хемоглобин
HDL – високоплътностен липопротеин
НОМА – homeostatic model assessment
ИЛ-1 – интерлевкин 1
iNOS – индицируема NO синтаза
LCD – low-calorie diet
NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease
NIRDIABO – nonpharmacological interventions for the reduction of risk of diabetes in obese people

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

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	2
1. ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	10
2.1. Рискови фактори за развитие на предиабет.....	10
2.2. Затлъстяване и захарен диабет тип 2.....	11
2.3. Инсулинова резистентност и предиабет.....	16
2.4. Регулиране на инсулиновата чувствителност.....	18
2.5. Концепция за инсулин индуцирания метаболитен стрес и неговото значение за сърцето.....	18
2.6. Интензивна промяна в начина на живот и кардиоваскуларни резултати	20
2.7. Други глюкозо понижавачи терапии при пациенти с наднормена т.м. и затлъстяване, с или без трудности, в контрола на ЗД тип 2.....	22
2.8. Перспектива и бъдещи насоки	23
2.9. Подходи в лечението на инсулинова резистентност и предиабет	24
2.10. Метаболитен синдром, затлъстяване, диабет и връзката им с микробиома	31
2.11. Роля на тестостерона и негови продукти в механизми на метаболизъм/предиабет.....	37
2.12. Мелатонин и инсулинова резистентност	44
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	46
3.1. Цел	46
3.2. Задачи	46
3.2.1. Фармакологично експериментални задачи.....	46

3.2.2. Клинични изследователски задачи.....	47
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	48
4.1. Материали.....	48
4.1.1. Опитни животни.....	48
4.1.2. Фармакологични средства.....	48
4.1.3. Нефармакологични средства.....	49
4.2. Методи за изследване на показатели на метаболизма и въглехидратна обмяна.....	50
4.2.1. Клинично-лабораторни методи.....	50
4.2.2. ELISA методи.....	53
4.2.3. Методи за оценка на затлъстяването.....	54
4.2.4. Метод за определяне на предиабет	55
4.2.5. Генетични методи.....	56
4.2.6. Статистически методи на анализ.....	57
5. РЕЗУЛТАТИ.....	58
5.1. Лабораторни опити с плъхове	58
5.2. Резултати от изследвания по проекта НИРДИАБО	62
6. ОБСЪЖДАНЕ.....	75
7. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ.....	82
7.1. Изводи	82
7.2. Приноси	83
8. Публикации и участия на научни форуми	84
8.1. Публикации	84
8.2. Участия в научни форуми.....	85
9. ЛИТЕРАТУРА.....	88

10. SUMMARY.....111

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет (ЗД) е хронично прогресиращо заболяване, което придобива мащабите на световна епидемия. От него страдат над 360 млн. души. В света на всеки 10 секунди двама души се разболяват от диабет, а един човек умира от това заболяване. Годишно 7 млн. души се разболяват от диабет, от тях 70 000 са деца. СЗО предвижда към 2030 г. над 500 млн. души да бъдат засегнати от диабет (Mathers CD and Loncar D. 2006). В България според статистиката от ЗД (инсулино зависим ЗД тип 1 и неинсулино зависим тип 2) страдат над 720 000 души, като 90% от тях имат ЗД тип 2 (Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1999).

Основните рискови и етиологични фактори за развитие на ЗД включват: начин на живот (нездравословно хранене, намалена физическа активност, стрес), генетични фактори, автоимунна деструкция на бета-клетките на панкреаса, ендокринопатии (акромегалия, синдром на Cushing, глюкагоном, феохромоцитом), панкреатит, вирусни (заушка, аденовирусни или цитомегаловирусни инфекции, рубеола), атеросклероза, артериална хипертония, продължителна терапия с някои лекарства (пентамидин, статини) и др.

Главните симптоми са непрестанна силна жажда, често уриниране, загуба на тегло, чувство на глад, отпадналост, чести бактериални и гъбични инфекции в устата, урогениталната област и кожата, обща слабост. При част от пациентите с диабет тип 2 често липсват признаци на заболяването и понякога то се открива случайно при провеждане на изследвания по друг повод. Последствията и усложненията от ЗД могат да бъдат много тежки и с висока цена както за отделната личност, така и за обществото (American Diabetes, Association Apr., 2013). Късните усложнения на ЗД включват: полиневропатия, ретинопатия, микро- и макроангиопатия, нефропатия,

кожни улцерации, сърдечно-съдови и инфекциозни усложнения, и др. (Aristides Veves, Rayaz A. Malik, 2007).

Антидиабетичните лекарства могат да бъдат разделени на следните основни групи:

- *осигуряващи инсулин*: инсулинови препарати, СУП, меглитиниди (меглиниди) и инкретинови миметици. Към последните се отнасят рецепторните агонисти на глюкагон-подобния пептид-1 (GLP-1 RA) и инхибитори на дипептидил пептидаза-4 (DPP-4i). СУП, меглитинидите и инкретиномиметиците стимулират ендогенната инсулинова секреция от бета-клетките на панкреаса, като GLP-1 RA и DPP-4i имат и допълнителни ефекти върху СЧТ и мозъка, свързани с увеличаване чувството за засищане (това се обяснява със загуба на т.м. при GLP-1 RA).
- *инсулинови сенсибилизатори*: метформин, глитазони (pioglitazone и др.).
- *инхибитори на глюкозната чревна абсорбция*: алфа-глюкозидазни инхибитори (действат в СЧТ) и инхибитори на натриево-глюкозния ко-транспортър – SGLT2 (действат в проксималните извити бъбречни каналчета).

Интензивното глюкозно понижаване увеличава риска от развитие на тежка хипогликемия три до четири пъти при двата типа диабет. Лекарствата, които повишават този риск са инсулин, СУП и меглитиниди. Хипогликемията на свой ред засилва риска от проява на ритъмни и други сърдечно-съдови събития, деменция и когнитивна дисфункция.

Главният проблем произтича от големия брой случаи на безсимптомно протичащ ЗД тип 2. Най-често той преминава през фаза на предиабет и впоследствие настъпва разгръщането на клиничната картина на ЗД. При *предиабет* плазмените нива на кръвната захар са по-високи от нормалните: на гладно те са > 6.1 mmol/l, а след провеждане на пероралния тест за

глюкозен толеранс те са под 11 mmol/l. Без намеса, се очаква, че предиабетът може да премине в ЗД тип 2 за период до 10 години. Прогресията от предиабет към ЗД тип 2 може да бъде спряна с рационални промени в начина на живот – като например хранене със здравословни храни, умерена ежедневна физическа активност, отстраняване на стерсогенните фактори. Поддържането на здравословно тегло е важен фактор и осигурява нормализиране на гликемията.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1. Рискови фактори за развитие и на предиабет

- *Наднормената телесна маса* е основен рисков фактор. Колкото е по-голямо количеството мастна тъкан, особено около корема и около вътрешните органи, толкова по-резистентни стават клетките към инсулин.
- *Размер на талията*. Лица с голямата обиколка на талията може да показват резистентност към инсулин. Рискът се увеличава при мъжете с талия по-голяма от 101,6 cm и за жени с талия по-голяма от 88,9 cm.
- *Хиподинамия*. Колкото е по-малко физическата активност, толкова по-голям е рискът от предиабет. Физическата активност помага да се контролира телесната маса и ефективното използване на глюкозата като енергиен източник. Това активира чувствителността на клетките към инсулин.
- *Възраст*. Въпреки че може да се развие във всяка възраст, рискът от предиабет се увеличава с напредване на възрастта, особено след 45-ата годишнина, което е обикновено свързано с понижена физическа активност и загуба на мускулна тъкан.
- *Фамилна обремененост*. Рискът от предиабет се увеличава, ако родител, брат или сестра страда от ЗД тип 2.
- *Раса*. Установено е, че афро-американците, американските индианци, азиатските американци, жителите на тихоокеанските острови и др. са по-склонни да развият предиабет. Това до голяма степен се дължи на резките промени, настъпили в начина на живот след колонизирането, респ. преселението на тези народи.

- *Гестационен диабет.* Рискът от по-късно развитие на диабет се увеличава при жени, диагностицирани с гестационен диабет.
- *Поликистозен овариален синдром.* При жени с поликистозен овариален синдром, което е често срещано състояние, характеризиращо се с неправилен менструален цикъл, затлъстяване и инсулинова резистентност, се увеличава рискът от диабет.
- *Нарушен сън.* Изследванията, свързани с проблеми със съня, като обструктивна сънна апнея и системно недоспиване доказват повишен риск от инсулинова резистентност. Сънната апнея е разстройство на съня, което причинява дихателни прекъсвания много пъти по време на сън и води до лошо качество на съня. Хората, които работят на смени е възможно да имат проблеми със съня, и също могат да имат повишен риск за развитие на предиабет и диабет.
- *Интоксикацията с химически вещества,* вкл. лекарства също може да увеличи риска от предиабет.
- *Ежедневният стрес* е една от причините, която съобщават някои пациенти с предиабет. Ролята на кортизола в механизмите на развитие на ЗД се дискутира в литературата.

2.2. Затлъстяване и захарен диабет тип 2

Затлъстяването е патологично състояние, при което натрупването на телесни мазнини е в степен, която може да има отрицателно въздействие върху здравето. При затлъстяване е отчетено намаляване продължителността на живот и риск от други здравословни проблеми. (Haslam DW, James WP, 2005). За затлъстели се считат лица, чийто BMI е над 30. То е една от водещите, (но предотвратими) причини за смърт в световен мащаб. Затова през 2013 г. АМА го класифицира като заболяване (Pollack, Andrew June 18,

2013; Weinstock, Matthew June 21, 2013). Намаляването на ТТ и поддържането му се извършва с помощта на различни методи и средства, както следва:

- Лечение с много ниско калорийна диета (VLCD; <800 ккал/ден), или нискокалорийна диета (LCD; <1200 ккал/ден) е свързано със значителна първоначална загуба на тегло, но също така и с бързото му възвръщане в сравнение с постигнатото отслабване чрез по-умерено ограничаване на приема на енергия (Tsai AG, Wadden TA, 2006; Hemmingsson E et al., 2012). Поддържането на намаленото тегло изисква силна воля и значителни усилия за промяна в поведението (Bond DS et al., 2009; Klem ML et al., 1997).
- Влияние на различни стратегии за поддържане на ТТ. VLCD са били тествани в рандомизирани проучвания. Сред тях са например лекарства против затлъстяване (Apfelbaum M et al., 1999; Wadden TA et al., 2010), хранителни добавки (Ryttig KR et al., 1997; Ryttig KR et al., 1995), високо протеинови диети (Claessens M et al., 2009; Westerterp-Plantenga MS et al., 2004), ниско гликемично индексни диети (Larsen TM et al., 2010), консумация на ниско мазининни хранителни продукти (Due A et al., 2008), ежедневно пиене на екстракти от зелен чай (Kovacs EM et al., 2004), носене на талийни корсети (Wikstrand I, Torgerson J, Bostrom KB. 2010), физически упражнения (Borg P et al., 2002; Fogelholm M et al., 2000). Ефектите на тези профилактични стратегии за поддържане на телесната маса около нормата остават неясни, а предишните мета-анализи, които изследват дългосрочните ефекти на VLCD само сравняват ефектите на VLCD с LCD (Anderson JW et al., 2001).

След метанализ (направен от Kari Johansson), M. Neovius и E. Hemmingsson (2014) те стигат до следните изводи: антиобезните лекарства orlistat и sibutramine в комбинация с нискокалорийни заместители допринасят за поддържане на ТТ след отслабване. Физическите упражнения и диетичните

добавки (зелен чай, храни с високо съдържание на фибри, конюгирана линолова киселина) обаче не водят до поддържане на намаленото тегло.

Откриването на механизмите, които предизвикват затлъстяване и инсулинова резистентност, е от решаващо значение да се спре нарастващата вълна от метаболитни заболявания. Развитието на терапиите на затлъстяване и ЗД тип 2 изисква по-добро разбиране на биохимичните пътища, които регулират метаболизма на човека. Ефективното лечение на затлъстяването налага да бъде намален приема на енергия и увеличен разходът на енергия или и двете едновременно.

Водещи фактори в патогенезата на затлъстяването са:

- *Ситост и глад.* Централната нервна система регулира приема на калории и чувството на удовлетвореност и ситост. Те са зависими от нервни и ендокринни въздействия, които могат да се разделят на краткосрочна и дългосрочна системи за контрол. Освобождаване на холецистокинин (ССК) в комбинация с невронална сигнализация, резултат от раздуване на червата, са мощни сигнали за ситост и задействат края на храненето (Spiegelman VM et al., 2001). Произведеният в адипоцитите хормон лептин е от решаващо значение за интегрирането на меланокортиновата невронална верига от хипоталамуса към енергийните депа на тялото (Spiegelman VM et al., 2001; Schwartz MW et al., 2000). В допълнение, невропептид Y (NPY) засяга пряко поведението при хранене, метаболизма и телесният състав (Stanley BG et al., 1986; Billington CJ et al., 1994). Представените в мозъка кортикотропин-освобождаващ и растежен хормон и грелинът (секретиран в стомаха), участват в сигнализацията за глад и ситост (Beck V et al., 2013). Невротрансмитери, като адреналин, допамин и серотонин също са важни за поддържане на енергийния баланс (Spiegelman VM et al., 2001; Schwartz MW et al., 2000). Например анорексигенната активност на сибутрамина се дължи на инхибирането на обратното захващане на серотонин. За съжаление поради значими

нежелани реакции като повишаване на кръвното налягане и сърдечната честота (Bray GA et al., 2000), този препарат беше забранен за употреба.

➤ *Интестинална абсорбция на храната.* Сигналите от освободените от червата пептиди след хранене са важни не само за регулиране на приема на храна, но също така за правилното храносмилане и усвояването на хранителните вещества. Грелинът, ССК, пептид YY, глюкагон-подобните пептиди 1 и 2, стомашният инхибиторен пептид и кортикотропин-освобождаващият фактор също участват в регулацията на храносмилането (Suzuki K et al., 2010; Delzenne NM et al., 2007). Инхибирането на стомашните и панкреатичните липази чрез *орлистат* намалява хидролизата на триглицериди и е в състояние да инхибира абсорбцията на мазнини до 30%, допринасяйки за калориен дефицит от около 200 калории на ден (Guerciolini R et al., 1997). Ежедневният орален прием на орлистат води до намаляване на т.м. с $\geq 10\%$, но НЛР, причинени от прекратяване на този прием от някои пациенти, ограничават в голяма степен неговото използване (Bray GA et al., 2000).

➤ *Енергиен разход.* Най-голям принос за определяне разхода на енергия има нивото на базалния метаболизъм (BMR), който се определя като енергиен разход в покой при нормална температура и на гладно (Harper ME, Green K, Brand MD, 2008). Базалният метаболизъм включва клетъчния цикъл, поддържане на основни функции (например на йонни градиенти, трансмембранен трансфер на метаболити), основни синтетазни реакции (синтеза на протеини и др.), митохондриално протонно движение и термогенеза (Harper ME, Green K, Brand MD, 2008). Митохондриите са централно място за регулиране на разхода на енергия и влиянието върху тяхната дейност е перспектива за терапия на затлъстяването в продължение на десетилетия (Cutting WC et al., 1934; Tainter ML et al., 1934; Colman E., 2007). Терапии, които имитират физиологични ефекти, може да се окажат най-ефективни. Например, свръхекспресия на

протеина UCP1 (митохондриален ензим), който увеличава използването на субстрат и увеличава електронния транспорт в митохондрии на бяла мастна тъкан (Korecky J et al., 1996) или в скелетната мускулатура (Li B et al., 2000), може да попречи на индуцираното от храната затлъстяване при мишки.

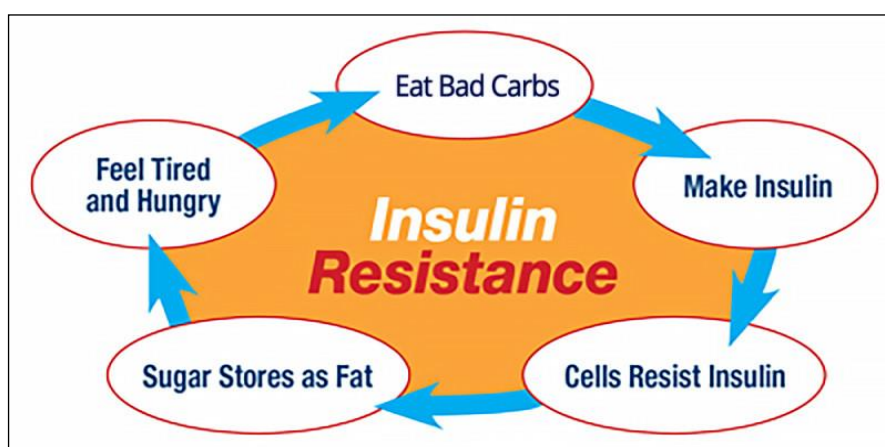
- *Кафявата мастна тъкан*, в която има относително високи нива на UCP1, участва в патогенезата на затлъстяване и е таргет за терапия. Въпреки ниското количество на кафявата мастна тъкан при възрастни хора, 50 g от нея се очаква да използва повече от 20% от базовите енергийни нужди (Rothwell NJ et al., 1983). Мишки с генетично намалена кафява мастна тъкан са предразположени към затлъстяване (Lowell BB et al., 1997). Последни данни сочат, че възрастните хора поддържат активни депа на кафява мастна тъкан (Cypess AM et al., 2009; Virtanen KA et al., 2009). Във връзка с определянето на UCP-2 и UCP-3 в скелетните мускули и други тъкани (Kozak LP et al., 2000; Vidal-Puig A et al., 1997), се съобщава, че увеличаването на митохондриалната активност може да е обещаващо в борбата със затлъстяването. Доказателствата, че адипоцити в някои депа на бяла мастната тъкан могат да бъдат програмирани да се диференцират в клетки на кафявата мастна тъкан допълнително активизират научните изследвания в посока на разбиране ролята на тази тъкан в системния метаболизъм. Обща идея е да се увеличат митохондриите и UCP1 в бялата мастна тъкан, което може да насърчи по-висок базален метаболизъм. В допълнение, последни проучвания са установили секретирани се протеини, които стимулират термогенезата в кафявите адипоцити и тяхното превръщане в бяла мастна тъкан (Serra D et al., 2013; Bostrom P et al., 2012).
- *Промени в съдовата функция*. Нови данни показват, че промени в съдовата функция могат да регулират метаболитната хомеостаза. Азотният оксид (NO), може да играе ключова роля в регулирането на

системния метаболизъм и инсулиновата чувствителност. Бионаличността на NO намалява при животински модели на затлъстяване и ЗД (Bender SB et al., 2007; Kim F et al., 2008). Тя намалява също при затлъстяване и ЗД при хора (Higashi Y et al., 2001; Gruber HJ et al., 2008). Бионаличността на NO зависи от баланса между синтезирания и разградения продукт. Анализът на публикуваните факти показва, че намалените нива на NO в затлъстели индивиди се дължат на намалена експресия на ензима азот-оксид синтаза (NOS), нарушения в NOS дейността или от реакцията на NO с реактивни молекули като например супероксид.

*Прекалено високото телесно тегло се свързва с някои сърдечно съдови заболявания, ЗД2, някои видове рак и др. То води до увеличаване на инсулиновата резистентност, а от там до промяна на нормалният метаболизъм.

2.3. Инсулинова резистентност и предиабет

Инсулиновата резистентност е състояние, при което клетките намаляват своята чувствителност към действието на инсулина. Рецепторите за инсулин понижават своята активност, по-малко глюкоза се усвоява от клетките на тялото и много глюкоза се натрупва в кръвта. Диагностицира се хипергликемия. Отчитат се и повишени концентрации на инсулин в кръвта. Производството на инсулин от бета-клетките на Лангерхансовите острови на панкреаса се увеличава.



Фиг. 1. Роля на въглехидрати в развитие на инсулинова резистентност

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

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

При емпирични наблюдения е наблюдавано развитие на инсулинова резистентност при септични пациенти (Clowes et al., 1978; Йошида и сътр., 1989; Реймънд и сътр., 1981; Shangraw et al., 1989) с по-късното хронично повишаване на цитокини при затлъстяване и диабет (Bunout et al., 1996; Pickup и Crook, 1998; Visser et al., 1999; Yudkin et al., 2000). На тази база се допуска, че патологичното активиране на имунната система може да предизвика резистентност към инсулин например у индивиди с атеросклероза. Изследвания върху гризачи с модели с инсулинова резистентност показват увеличаване на TNF α в мастната тъкан (Hotamisligil et al., 1993). При затлъстяване и инсулинова резистентност експресията на TNF α в адиоцитите се повишава и намалява с намаляване на т.м. (Hotamisligil et al., 1995; Kern et al., 1995).

Съществуват още много хипотетични механизми за развитие на инсулинова резистентност, но клетъчните механизми, обсъдени по-горе, показват как системи, които са фино настроени да се адаптират към променящата се околна среда, могат да станат патогенни при условия на излишък от хранителни вещества. Ектопичното отлагане на липиди може да бъде главната причина за развитие на чернодробна и мускулна инсулинова резистентност. Нови терапии, насочени към намаляване на липидите в тези органи могат да бъдат ефикасни за лечение на инсулинова резистентност и свързаните с нея съпътстващи заболявания. Съгласувани усилия за

възстановяване на рационален баланс в диетата и поведението могат да предотвратят затлъстяването и ектопичното отлагане на липиди и да предпазят от развитие на инсулинова резистентност.

2.4. Регулиране на инсулиновата чувствителност

Инсулиновата резистентност почти винаги се счита за патологичен процес и е в основата на захарния диабет тип 2. Регулирането на тази чувствителност, е част от метаболитната физиология. Денонощните, сезонните, свързаните с възрастта, с бременността и др. колебания в приема на хранителни вещества изискват хомеостатична гъвкавост, включително и промяна в чувствителността към инсулин, така че да се оптимизира доставката на хранителни вещества в различните тъкани. Например при краткотрайно прехранване скелетната и сърдечната мускулатура стават преходно инсулино резистентни (Schenk S et al., 2008). Това е физиологична адаптация, която благоприятства отклоняването на излишни хранителни вещества към мастната тъкан за съхранение.

Допуска се, че тази индуцирана инсулинова резистентност особено при хронична доставка на излишни количества хранителни вещества, предпазва важни тъкани от хранително-индуцирана дисфункция.

2.5. Концепция за инсулин индуцирания метаболитен стрес и неговото значение за сърцето

У здрави индивиди съществува реципрочна връзка между плазмените нива на свободните мастни киселини и глюкозните нива в кръвта. На гладно, кръвната глюкоза е ниска, а нивото на свободните мастни киселини е увеличено, поради освобождаването им от мастната тъкан. След нахранване,

плазмените нивата на кръвната захар и инсулин се увеличават, докато тези на свободните мастни киселини се понижават, защото се потискат от инсулина. Миокардът, с неговите високи енергийни нужди, се адаптира към постъпващите хранителни вещества чрез взаимодействие между глюкозния метаболизъм и метаболизма на свободни мастни киселини (Randle PJ et al., 1963; Stanley WC et al., 2005). Високите нива на FFA на гладно намаляват абсорбцията и окислението на глюкоза от миокарда, за да я запазят за нуждите на мозъка (Schenk S et al., 2008; Randle PJ et al., 1963), чиято маса е 50 пъти по-малка от тази на организма, а при активна дейност изразходва до 25% от всички енергийни нужди. При слабо контролираните пациенти с диабет тип 2 тази реципрочна връзка се загубва, съответно плазмените концентрации на глюкозата и FFA се повишават едновременно (Schenk S et al., 2008). Това поставя миокарда в повишен риск от хранително претоварване и миокардна глюколипотоксичност (Chess DJ et al., 2008; Labbé SM et al., 2012). В тъканите, използващи инсулин независимия транспортер GLUT-2, настъпва бързо изравняване на екстра- и интрацелуларните глюкозни нива, което прави β -клетката особено силно уязвима от проява на глюколипотоксичност (Nolan CJ, Prentki M 2008; Prentki M, Corkey BE 1996). От друга страна тъкани като сърце и скелетни мускули, които използват инсулин зависимия GLUT-4 транспортер за глюкоза, се предпазват от глюколипотоксичност чрез развитие на инсулинова резистентност.

Изследвания, върху пациенти със захарен диабет тип 2, направени наскоро в Канада, Великобритания и Швеция, след корекция на множество фактори, показаха повишен риск от смъртност при болните на инсулинова терапия (Currie CJ et al., 2013; Saleh N et al., 2012). Продължаващите метаанализи от мултицентричното изследване DIGAMI 2, използващи общата кохорта на базата данни от епидемиологични база данни, също показва повишен риск от смъртност, респ. развитие на повторен инфаркт или инсулт (Mellbin LG et al., 2011).

2.6. Интензивна промяна в начина на живот и кардиоваскуларни резултати

Водещ подход в преодоляването на инсулиновата резистентност при лечение на захарен диабет тип 2 е насочен към интензивна промяна в начина на живот, свързана с намаляването на т.м. След редуция на прием на хранителни вещества, се намалява метаболитния стрес върху тъканите и се подобряват кардиоваскуларните резултати. The Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) е проучване целящо намаляване на т.м. чрез намаляване на калорийния прием и повишаване на физическата активност в сравнение със стандартната терапия на пациенти със захарен диабет тип 2 (Wing RR et al., 2013). Резултатите показват, че само промяната в начина на живот не води до намаляване на смъртността от кардиоваскуларни инциденти (Wing RR et al., 2013). В допълнение на това, данните от клиничното изследване ACCORD показват, че при ранно постигане на гликемичен контрол леталитет се понижава незначително с 15%, в сравнение с контролната група. Освен това, интензивна интервенция върху начина на живот показва тенденции за намаление до 16% на миокардния инфаркт ($p = 0.11$), 56% намаление на фаталния миокарден инфаркт ($p = 0.13$) и 20% намаление на случаите със сърдечна недостатъчност ($p = 0.10$). Не се наблюдава тенденции за промяна на честотата на хоспитализация при стенокардия ($p = 0.79$) и инсулт ($p = 0.78$).

Анализът на резултатите от проучването Look AHEAD при пациенти с кардиоваскуларни заболявания, при които е приложена промяна в начина на живот в началото на изследването, показва влошаване на първоначалните резултати. Тези данни демонстрират, че всяка интензивна намеса в гликемията или поддържането на т.м. при пациенти със захарен диабет тип 2,

не винаги показва подобрене при пациенти с вече съществуващи сърдечно-съдови заболявания.

Като цяло, получените от Look AHEAD изводи, до голяма степен подкрепят настоящата разработка. Става ясно, че промяната в начина на живот няма пагубен ефект върху всички случаи на смърт, каквато се наблюдава при интензивна глюкозо-понижаваща терапия в проучването ACCORD. Важно е също така да се отбележи, че при пациенти без кардиоваскуларни заболявания, интензивната промяна в начина на живот в програмата Look AHEAD, дава множество ползи за здравето, включително подобряване контрола на глюкозата, намаляване на артериалното налягане и цялостен липиден контрол, при това с използването на по-малко лекарства. Според тези изследвания, при пациентите със захарен диабет тип 2, които са с наднормено ТТ, затлъстяване и липса на мотивация за промяна на начина на живот, се наблюдава най-често *инсулиново индуциран метаболитен стрес*. Понижаването на гликемията чрез понижаването на инсулиновата резистентност и повишаване на приема на хранителни вещества във вече хранително натоварени тъкани, води до парадоксалното им метаболитно увреждане, причинено от инсулиново индуцирания метаболитен стрес. Трябва да се отбележи, че при умерено интензивна инсулинова терапия при пациенти с наднормено тегло и затлъстяване и лошо контролиран захарен диабет тип 2, се наблюдава драматично нарастване на триглицеридите в миокарда при двама от осем участника в клиничното изпитване (Zib I et al., 2007).

Ключово тук е, че механизмите на преодоляване на инсулиновата резистентност се различават от тези при намаляване или подобряване на инсулиновата резистентност чрез намален хранителен внос. Всъщност, може да се обсъжда, че инсулиновата резистентност предпазва от метаболитен стрес, причинен от прекомерен хранителен внос. Ако терапиите водят до

намалено хранително натоварване, това ще намали и нуждата от протекцията на инсулиновата резистентност.

Има много пациенти, които се нуждаят от инсулин-заместваща терапия и други, при които тя може да бъде вредна. За пациенти с тежък дефицит в ендогенната секреция на инсулин, инсулиновото заместване става необходимо, тъй като то се явява единствен ефективен подход за понижаване на гликемията. Също така пациенти, които са с нормално тегло, включително и такива с латентен автоимунен диабет при възрастни (Tuomi T et al., 2014) и са в състояние да постигнат здравословен енергиен баланс, инсулиновата терапия е вероятно по-безопасен вариант. Кратък курс на инсулин може да бъде от полза, за да се постигне бързо гликемичен контрол и подобряване на β -клетъчната функция у пациенти с новооткрит захарен диабет тип 2 (Weng J et al., 2008). Въпреки това, трябва да се внимава с използването на много високи дози инсулин при пациенти с наднормено тегло и/или затлъстяване, ако те не са в състояние да променят начина си на живот и да преодолеят положителния енергиен баланс.

2.7. Други глюкозо понижавачи терапии при пациенти с наднормена т.м. и затлъстяване, със или без трудности, в контрола на ЗД тип 2

Изследванията показват, че намаляването на хранителния прием от критичните тъкани е полезно. Промяната в начина на живот, свързана с повишаване на физическата активност и намален калориен прием, се препоръчва, но често това е недостатъчно при пациенти с наднормено тегло и затлъстяване. Бариатричната хирургия е един от най-ефективните методи за преодоляване на позитивния енергиен баланс и подобряване на гликемичния контрол. Използването на новите глюкозо понижавачи агенти, които подобряват негативния енергиен баланс, като GLP-1 рецепторни агонисти и SGLT-2 инхибитори, води до намаляване на метаболитния стрес (Kahn SE et

al., 2014). В бъдеще са необходими данни от дългосрочната им употреба относно тяхната кардиоваскуларна безопасност и развитие на уроинфекции при терапия с SGLT-2 инхибитори.

Безопасността на инсулиновите сензитайзери при употребата им върху високо рискови пациенти със диабет тип 2, трябва прецизно да бъде оценена, в зависимост от техния механизъм на действие и потенциалното им взаимодействие с други лекарствени средства. Така например, дори при пациенти с ниски резултати в контрола на гликемията е полезно комбинирането на тиазолидиндиони (TZD) с инсулин (Riddle MC et al., 2010). Би могло да се обсъжда, че при лошо контролирани пациенти TZDs имат синергично действие с инсулина, водещо до повишаване на глюкозното всмукване в кардиомиоцитите и увеличаване на инсулин индуцирания метаболитен стрес в сърцето (метаболитна кардиомиопатия). Ясно е, че комбинацията от TZDs и инсулин трябва да се използва с повишено внимание при пациенти с положителен енергиен баланс. В допълнение метформин, макар често споменаван като инсулинов сензитайзер, има основен глюкозо понижаващ ефект, който се дължи на намаляване на хепаталната глюкозна продукция (Inzucchi SE et al., 2012). *Неясно остава неочакваното увеличение на общата смъртност, когато метформин се комбинира със сулфонилурейни лекарствени препарати* (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998).

2.8. Перспектива и бъдещи насоки

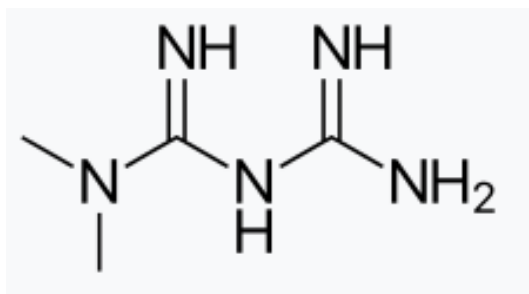
Концепцията за инсулин индуцирания метаболитен стрес има нужда да бъде изследвана в бъдеще, при инсулиновата терапия на пациенти с наднормено тегло и затлъстяване със захарен диабет тип 2. Вниманието трябва да бъде насочено към това как инсулинът взаимодейства с други глюкозо понижаващи агенти. По-доброто разбиране на този

патофизиологичен процес може да бъде полезно за клиницистите при консултиране и мотивиране на пациентите с диабет тип 2 за подобряване начина им на живот.

2.9. Подходи в лечението на инсулинова резистентност и предиабет

Подходите в лечението на инсулинова резистентност и предиабет се свеждат до използването на фармакологични и нефармакологични средства.

Метформинът (фиг. 2) е лекарство на първи избор в лечението на новооткрит диабет тип 2. Той е бигванидиново производно (Nathan et al., 2006). За първи път е описан в научната литература през 1922 г. от Werner и Bell. Приблизително по същото време е открит и инсулинът, което изтласква на заден план проучванията върху бигванидите.



Фиг. 2. Структура на метформин

В края на 40-те и началото 50-те години на миналия век интересът към бигванидите се възвръща, за да се стигне до 1957 г., когато Жан Стерн за първи път използва метформин за лечение на диабет (Campbell, 2007). Поради някои НЛР и особено – лактатна ацидоза, метформин е бил изтеглен от употреба в Европа и САЩ. През 1995 г. след преразглеждане на профила

му за безопасност той е въведен отново в САЩ, а после и в много други държави (Glucophage Label and Approval History 2007).

Към днешна дата у нас са регистрирани 14 търговски наименования на метформина и голям брой комбинирани препарати с други перорални антидиабетични лекарства (Ламбев, 2105).

Метформинът не повлиява нивото на кръвната захар у нормални индивиди. Неговият антихипергликемичен ефект е свързан с *намаляване чревната резорбция на глюкоза, улесняване навлизането ѝ в тъканите и инхибиране на чернодробната глюконеогенеза* (Stumvoll M, et al., 1995). Лекарството се прилага в комплексното лечение на затлъстяване с риск от инсулинова резистентност. Има данни, според които метформин намалява *така също и канцерогенния* риск (Zakikhani M et al., 2006). Очаква се провеждането на широкомащабни клинични проучвания за изследване на възможните антинеопластични ефекти на метформин (Malek, M; Aghili, R; Emami, Z; Khamseh, ME 2013). Анализът в литературата показва, че метформин има по-добър профил на ефективност и безопасност в сравнение с другите перорални антидиабетични средства (Johnson JA et al., 2002). Лекарството намалява значимо сърдечно-съдовите инциденти и с него се постига *понижение на т.м.* При лечение с него рискът от развитие на хипогликемия е малък. Документиран е и кардиопротективен ефект на препарата (El Messaoudi S et al., 2011).

Най-честите дозо-зависими НЛР при приложение на метформин са от СЧТ: диарични изхождания, подуване и газове в корема. При постепенно понижаване на денонощната доза, приемане на метформин по време на хранене и подходящ диетичен режим, тези нежелани ефекти се овладяват и отзвучават.

Има данни, че в резултат на продължително приложение на метформин във високи дози може да се повишат плазмените нива на лактат (Lalau JD et al., 1995) и пируват с риск от развитие на лактатна ацидоза с честотата 2

до 9 случая на 100 000 пациенти (Stang M, Wysowski D K and Butler-Jones D 1999), която е животозастрашаваща. Това се обяснява с потискане окислението на глюкоза и засилване на анаеробната гликолиза. Наблюдавана е при лица със съпътстващи тежки заболявания, свързани с тъканна исхемия и хипоксия (хроничен алкохолизъм, бъбречни и чернодробни увреждания, сърдечна недостатъчност), които сами по себе си биха могли да предизвикат лактацидоза. Затова тези заболявания са противопоказания за приложение на метформин. Лактацидозата може да бъде избегната, ако се спазват стриктно показанията за лечение с метформин, вкл. неизползването на на йод-съдържащи рентгеноконтрастни средства.

В последните години бяха публикувани оптимистични данни от метаанализи на клинични изпитвания в САЩ, доказващи, че случаите на повишение на плазмените лактатни нива дори при пациенти с увредена бъбречна функция, предизвикани от метформин, са статистически незначими спрямо плацебо (1.13 ± 0.25 спрямо 1.24 ± 0.31 mmol/l). Това говори, че лактатната ацидоза има идиосинкратичен характер. Осъзнаването на изтъкнатия факт трябва да позволи по-широкото използване на това ценно лекарство (Ламбев, 2105).

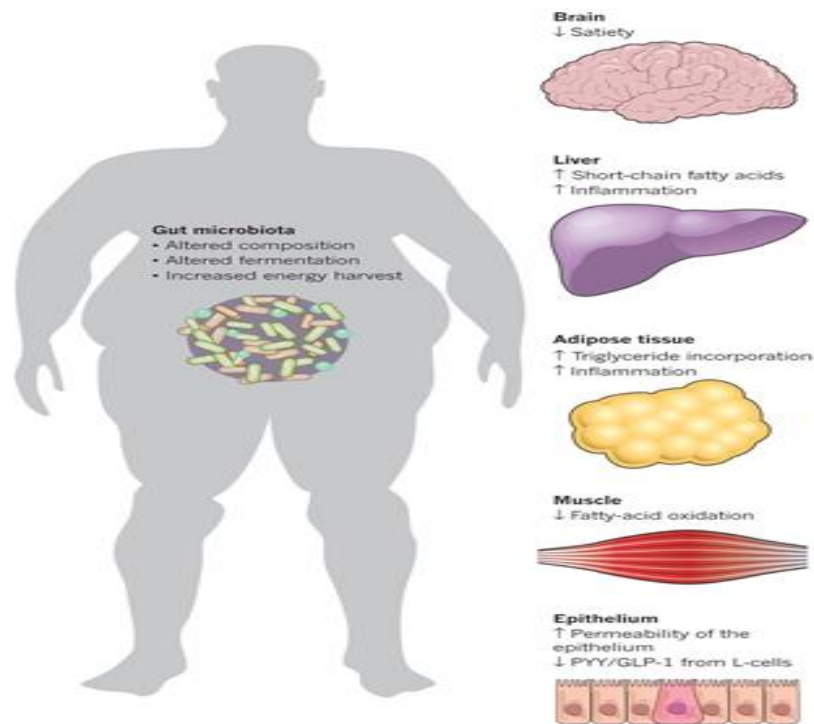
Страничен ефект от продължителното използване на метформин е **малабсорбцията на витамин В₁₂ (цианокобаламин)**. Тя е описана преди много години и обхваща около 30% от диабетично болните (Tomkin 1973). Въпреки, че запасите от витамин В₁₂ в черния дроб могат да компенсират неговата малабсорбция години наред с оглед на дългосрочната му употреба могат да се очакват симптоми на витаминен дефицит. Този дефицит се дължи на *неправилен синтез на миелин*, което води до *демиелинизация в гръбначния мозък*. Симптомите включват парестезия на долните крайници, нарушено равновесие и загуба на вибрационното усещане (Nemmer et al., 1998). Те са симетрични, по-често засягат долните крайници и могат да увеличат травматичния риск. Други неврологични симптоми на дефицит на витамин

V_{12} включват загуба на памет, раздразнителност и деменция, причинена от аксонална дегенерация в ЦНС (Green et Kinsella 1995). Тези симптоми често се приемат за признаци на прогресиращото развитие на ЗД.

В заключение, малабсорбцията на витамин V_{12} е хронично усложнение на лечението с метформин, което може да се прояви с необратимо увреждане на невроните. Мониторирането на плазмените нива на витамин V_{12} и евентуално на хомоцистеин може да отграничи двете причини за невропатията. При установяване на дефицит на витамин V_{12} , той трябва да бъде компенсиран с допълнителното му внасяне например инжекционно с цел да се попълнят чернодробните запаси.

Пробиотици

От нефармакологичните средства подобряващи чувствителността на клетките към инсулин в последно време интерес има към използването на пробиотици, които възстановяват баланса на чревната микрофлора и впоследствие намаляват нивата на проинфламаторните цитокини, имащи отношение в патогенезата на инсулиновата резистентност. Пробиотиците представляват живи микроорганизми с много висока концентрация – минимум 10^9 колония, образуващи единици (CFU) на грам вещество, които попадайки в макроорганизма, оказват благоприятно влияние върху него. Най-често използваните пробиотици са от видовете *Lactobacillus* и *Bifidubacterium*.



Фиг. 3. Роля на стомашно-чревния микробиом в механизми на инсулинова резистентност и затлъстяване

Концепцията за използване на пробиотици при стомашно-чревни нарушения се подкрепя не само от убедителни експериментални изследвания, но и от клинични проучвания, сочат данните на Quigley EM (2011). Ефектите на пробиотици са доказани в комплексното лечение на инфекциозна диария, възпалителни заболявания на жлъчката и др. Установено е, че използването на пробиотици повлиява благоприятно микрофлората на дебелото черво (Shanahan F. 2011). Редица факти подкрепят становището, че затлъстяването и метаболитният синдром се съпровождат често от развитието на дисбиоза в СЧТ. Има прогрес в използването на пробиотици в комплексната терапия на рак на дебелото черво. Опитът на много колективи е анализиран от Zhu Y et al. (2011). В допълнение, пробиотиците показват ефективност в лечението на улцерозния колит, болестта на Крон и други тежки заболявания. Анализът на публикувания клиничен опит показва, че пробиотиците модулират храносмилателните функции. Тяхното регулярно приемане води до по-

доброто усвояване на храната и подобрене на метаболизма. Именно затова може да се допусне полезният ефект от използването на пробиотици при метаболитни заболявания, затлъстяване и инсулинова резистентност.

Както посочихме по-горе, пробиотиците са проучвани за влияние при затлъстяване и инсулинова резистентност. Резултати от клинични изследвания доказват значението, както на диетата, така и на чревната флора при все по-често срещаното се затлъстяване и свързаната с него инсулинова резистентност. Експерименталните изследвания също подкрепят (Ma X и сътр., 2008) и оценяват ефекта и механизмите на действие от приложението на пробиотик при мишки с диетично-предизвикани стеатоза и инсулинова резистентност, като се измерват теглото на животното, чернодробната стеатоза, инсулиновата резистентност и тяхната връзка с броя на Т-лимфоцитите килърни клетки (NKT), както и възпалителната сигнализация. Резултатите показват, че наситената с мазнини диета води до понижаване на NKT и по този начин до инсулинова резистентност и стеатоза, като в същото време оралното приложение на пробиотик увеличава броя на NKT и подобрява състоянието. Ефектът вероятно се дължи на намаление на туморо некротичния фактор алфа и на възпалителното сигнализиране (Ma X, Hua J, Li Z 2008).

Изследвания, свързани с Lactobacillus bulgaricus. В началото на миналия век българският лекар д-р Стамен Григоров, тогава студент в Женева, открива специален вид *лактобацил* в проби от българско кисело мляко и го нарича *Lactobacillus bulgaricus*. През 1951 г. д-р Иван Богданов изолира от българското кисело мляко щам *Lactobacillus bulgaricus* – „I. Bogdanov patent strain tumornecroticance B-51“ - „LB510“ Вече петдесет години този щам се култивира върху специална течна хранителна среда, което повлиява морфологията и биологичните му свойства. Д-р Иван Богданов е положил много усилия в изолирането на антибиотично вещество от стената на бактерията, което проявява не само противомикробна, но и противотуморна

активност. Първите публикации за противораковата активност на веществото, произведено от „LB510“ срещу Sarcoma 180 са направени през 1958 г. Оттогава екстракти от *Lactobacillus Bulgaricus* „LB510“ са тествани върху различни експериментални и спонтанни тумори в редица институти и лаборатории.

Направени са много експерименти и тестове върху животни (мишки). Венозното му въвеждане, обаче води до многа бърза туморонекроза с последващи токсични ефекти върху организма, вследствие на бърз туморен разпад. Поради това продължаването на клиничните изпитвания върху хора е било отложено. През 1967 г. д-р Иван Богданов започва приложението на перорален препарат с по-слаба противотуморна активност и без странични ефекти. Резултатите от прилагането му върху онкоболни показват подобрене на общото състояние на пациента и нормализиране на кръвната картина поради регенериращи процеси в костният мозък. Това е причината да се потърси лабораторно потвърждение и обяснение на клетъчно равнище на механизма на стимулация на имунитета. Изследванията на екипа на д-р Иван Богданов показват индуциране на ендогенното производство на някои цитокини (TNF-alpha, И-1 и др.) от макрофагите (Davidkova G et al. 1992), с което обяснява противотуморното и имуномодулиращото действие на препарата. Въпреки противоречивите съвременни разбирания за действието на цитокините, изследванията в тази посока трябва да продължат, предвид широкото използване на пробиотици в съвременното.

В заключение пробиотиците са продукти от живи микроорганизми, основно получавани от *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Убедителни факти сочат, че те подобряват храносмилането, усвояването на хранителните вещества, имунната система. Пробиотиците са обект на изследвания при пациенти с инсулинова резистентност и затлъстяване.

Човешката микрофлора включва бактерии, гъбички и археи, като техните геноми са в постоянна връзка с човешкият геном (Sherwood, Linda et al.,

2013). Човешкият организъм е колонизиран от много микроорганизми. В тялото на човек се съдържат трилиони клетки, като се смята, че 90% от тях не са човешки. По-новите оценки занижават тази пропорция до 3:1. (American Academy of Microbiology 2014 ; Judah L. Rosner for Microbe Magazine 2014; Alison Abbott for Nature News. Jan 8 2016; Sender, R; Fuchs, S; Milo, R Jan 2016) . Независимо от точния брой, микрофлората, която колонизира човешкия организъм, не е просто сътрапезник, а тя по-скоро е в постоянни метаболитни и симбиозни взаимоотношения с човешките клетки. (Sherwood, Linda et al., 2013; Quigley, EM Sep 2013) Някои от тези микроорганизми изпълняват функции, които са полезни за човешкия организъм, но за повечето ролята им не е достатъчно изяснена. Тези, които присъстват в организма и при нормални обстоятелства, не причиняват заболяване се считат за нормална микрофлора (Sherwood, Linda et al., 2013).

Human Microbiome Project дефинира нормалната бактериална микрофлора, секвенирайки генома на човешката микрофлора, като се фокусира върху микроорганизмите, които обитават кожата, устата, носа, СЧТ и влагалището (Sherwood, Linda et al., 2013) и през 2012 г. публикува първите резултати (NIH News. 13 June 2012).

Пробиотиците повлияват човешкия микробиом.

2.10. Метаболитен синдром, затлъстяване, диабет и връзката им с микробиома

Дългогодишни проучвания са били насочени към изясняване на предполагаемата връзка на човешкият микробиом с различни патологични състояния като например метаболитен синдром, затлъстяване, ЗД. Наскоро беше идентифицирана потенциалната роля на чревната микрофлора в тези метаболитни нарушения. Затлъстяването е свързано с промяна в състава на чревната микрофлора, насочена към по-ефективно използване и складиране

на получената с храната енергия. *Прилагането на фекален микрофлорен трансплант (FMT) от слаби мъжки донори на мъже с метаболитен синдром води до значително подобрене на инсулиновата чувствителност, увеличаване на чревното микробно разнообразие, включително увеличаване бутират-продуциращи бактериални щамове.* Такива разлики в чревния микрофлорен състав могат да служат като ранни диагностични маркери за развитието на захарен диабет тип 2 при пациенти с висок риск. Продукти от микробният метаболизъм като бутират могат да окажат благоприятни метаболитни ефекти чрез повишаване на митохондриалната активност, превенция на метаболитната ендотоксемия и активиране на чревната глюконеогенеза по различни начини на генната експресия и регулация на хормони.

Нарастващото разпространение на захарен диабет тип 2 продължава да бъде повод за безпокойство в целия свят. От 1980 до 2008 г. броят на хората, диагностицирани с диабет, от които 90% тип 2, се е увеличил от 153 милиона до 347 млн. (Danaei G et al., 2011), и наскоро открит съучастник в този процес е именно чревната микрофлора (Palermo A et al., 2014). При проведено двойно-сляпо рандомизирано проучване при инсулин-резистентни мъже с метаболитен синдром, които са получавали фекална инфузия от слаби донори (Vrieze A et al., 2012), са наблюдавани благоприятни метаболитни ефекти, включително значително подобряване на периферната (мускулна) инсулинова чувствителност и повишаване нивата на бутират-продуциращи бактерии, като *Roseburia* в изпражненията и *Eubacterium halii* в тънките черва.

Karlsson et al. (2013) и Qin et al. (2012) независимо един от друг са наблюдавали намаление на бутират-продуциращи бактерии – *Roseburia* и *Faecalibacterium prauznitzii*, в чревната микрофлора на пациенти с T2DM сравнение със здравите индивиди. Въпреки, че бактериите обикновено се считат за патогенни, последни проучвания показват съществена симбиоза

между човешкия организъм и чревните бактерии в поддържане на имунната система. Първото доказателство за това дойде от констатацията, че в стерилни (GF) мишки се наблюдават дефекти в развитието и функционирането на имунната им система (Lee YK, Mazmanian SK, 2010) Друго важно взаимодействие с чревната микрофлора е тяхната ендогенна метаболитна функция, която позволява усвояването на хранителни съставки като растителни полизахариди, които иначе не се резорбират от храносмилателната система (Flint NJ et al., 2008). В тази връзка, интересно е, че изследванията върху мишки и хора показват, че чревната микрофлора се различава по състав между затлъстели и слаби индивиди (Ley RE et al., 2005; Turnbaugh PJ et al., 2006). При лептин-дефицитен миши модел Ley и сътр. (Ley RE et al. 2005) намират разлика в съотношението на *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, двата доминиращи типа в чревната бактериална микрофлора. В сравнение със слабите индивиди, затлъстелите мишки показват намаление на *Bacteroidetes* и съответно увеличаване на *Firmicutes* (Ley RE et al., 2005). Изследователите са наблюдавали подобно съотношение и при хора (Ley RE et al., 2006). Други проучвания при мишки са потвърдили тези резултати (Turnbaugh PJ et al., 2008; Duncan SH et al., 2007). Въпреки това, при други изследвания върху хора са открити противоречащи данни (Bäckhed F et al., 2004; Duncan SH et al., 2007). Предполага се, че тези разлики са резултат от вариации в диетата, както и различни методи за определяне микрофлорния състав.

Освен това е отчетено, че при прехвърляне на чревни бактерии от нормални мишки на стерилни, се увеличават мазнините в тялото с 60% в рамките на 10–14 дни, въпреки, че консумацията на храна е намалена. (Bäckhed F et al., 2004). Тези резултати водят до заключението, че микробиомът на индивиди с наднормено тегло по-ефективно преработва и складира енергията, получена с храната (Turnbaugh PJ et al., 2006; Schwiertz A et al., 2010).

Фекален микрофлорен трансплантант (FMT). В последно време все повече навлиза използването на т. нар. FMT. Първото му клинично приложение е успешното лечение на пациенти с *псевдомембранозен колит* – *Clostridium difficile* инфекция, развиваща се след употреба на широкоспектърни антибактериални средства (van Nood E et al., 2013). Установено е, че FMT е ефективен и при други хронични стомашно-чревни инфекции и възпалителни заболявания на червата. Неговият терапевтичен потенциал се дължи на способността за възстановяване на чревният микробен баланс, замествайки патогенните с полезни бактериални щамове (Smits LP et al., 2013; Kootte RS et al., 2012). Предвид обещаващите резултати на въздействието на FMT върху обмяната на веществата при мишки, нараства интересът към клиничната употреба на FMT при хора с фокус върху метаболизма и сърдечно-съдовите заболявания.

Голям интерес представляват проучванията в търсене на връзка между мозъчната дейност и промените в чревната микрофлора. Пропускливостта е от съществено значение за поддържането на защитната функция на кръвно-мозъчната бариера. При стерилни мишки, колонизирането от *Clostridium tyrobutyricum* или *Bacteroides thetaiotaomicron* и прилагане натриев бутират намалява пропускливостта на кръвно-мозъчната бариера в сравнение с контролната група (Braniste V et al., 2014). Тези резултати предполагат, че чревната микрофлора или микробни продукти могат да бъдат от съществено значение за създаване на нормална кръвно-мозъчна бариерна пропускливост. Други проучвания насочват към съществуването на ос, свързваща *микрофлора–чревна стена–мозък*. Например чревната микрофлора също така регулира апетита, като повлиява производството на чревни хормони. Апетитът се модулира в голяма степен от чревно–мозъчна ос, чиято основна функция е да контролира енергийната хомеостаза чрез балансиране на приема на енергия и разхода на енергия, така че да се поддържат енергийни резерви (Abizaid A. et al., 2006; Morton G. et al., 2006). Известно е, че

чревните хормони могат да регулират апетита (Murphy K. G., Bloom S. R. 2006). Те се произвеждат от ентероендокринни клетки, които съществуват в чревната лигавица и представляват около 1% от мукозните клетки на червата (Vrieze A et al., 2010). Такива хормони са пептид тирозин-тирозин (PYY) и глюкагон-подобен пептид 1 (GLP-1), които се произвеждат в чревните L клетки и проявяват анорексични функции (Murphy et al., 2006). PYY и GLP-1 се свързват с рецептори в нервните окончания и предават сигнали към хипоталамуса (където са локализирани центъра на глада и този на насищането) по блуждаещия нерв, като по този начин регулират апетита (Rasoamanana R et al., 2012). Микробните продукти от разграждането и ферментацията на фибри, като ацетат, пропионат и бутират, засягат производството на PYY и GLP-1. При здрави хора, получавания от дебелото черво пропионат повишава нивото на PYY и GLP-1 в плазмата, и по този начин намалява апетита.

Бутиратът, ацетатът и пропионатът са късоверижни мастни киселини (SCFAs), получени при ферментацията на фибри от чревните бактерии, които играят важна роля в енергийния метаболизъм (Cummins JH 1981). Тези SCFAs се абсорбират в червата, където особено бутировата киселина осигурява енергия за епителните клетки на дебелото черво. Данни от проучвания върху животни показват, че пропионовата киселина засяга чревната липогенезата и глюконеогенезата, докато оцетната киселина служи като субстрат за синтез на холестерол (Schwiertz A et al., 2010). Лигавицата на дебелото черво разчита главно на присъствието на бутират като източник на енергия, както и липсата на тези късоверижни мастни киселини (SCFAs) се смята, че играе важна роля в патогенезата на възпалителни заболявания на червата (Scheppach W, 1994).

Друга функция на бутирата, която може да допринесе за неговата евентуално полезна роля в метаболизма на човека, е да поддържа цялостта на червата. Това допринася за предотвратяването на ендотоксемия, процес,

който се дължи на преместване на ендотоксични съединения (липополизахариди – LPS), получени от метаболизма на някои Грам-отрицателни чревни бактерии. През последното десетилетие, се смята за ясно, че инсулиновата резистентност и T2DM се свързват с нискостепенно възпаление (Wellen KE, Hotamisligil GS 2005). В това отношение, ендотоксични съединения (напр. LPS), задействат ниска степен на възпалителен отговор и процесът на ендотоксемия може да доведе до развитието на инсулинова резистентност и други метаболитни нарушения (Tremaroli V, Bäckhed F 2012; Cani PD, et al., 2007).

Микробиом и хормони. При животински модели, бутиратът повлиява нивата на чревния серотонин (Gill RK, Kumar A et al., 2013) и увеличава количеството на серотониновите транспортери (SERTs) в хипоталамуса (Zhu H et al., 2009). Освен това, той засяга пряко симпатиковия тонус и чревните транзитни времена (Won Y-J, et al., 2013; Basterfield L, Mathers JC., 2010). Известно е, че серотонинът може да регулира чревната пропускливост (Yamada T et al., 2003). Освен това е важен сигнален невротрансмитер в червата и мозъка, участващ в регулацията на телесното тегло, поемането на храна и повишаване на чувството за ситост (Simansky KJ., 1996). Намаляването на церебралните серотонинови транспортери (SERTs), регулатори на серотонергичната трансмисия, се свързва със затлъстяването (Ratner C et al., 2012). В изпитвания при хора, когато здрави нормални индивиди са получавали високо калорична закуска в продължение на 6 седмици, е наблюдавано значително до 30% намаление на хипоталамичните серотонинови транспортери (Koortman KE et al., 2013). Във връзка с това, е интересно да се отбележи, че проучванията сочат регулиращото влияние на чревните бактерии върху серотонина (Haub S et al. 2010; Wikoff WR et al., 2009). Даказано е, че бариатричната хирургия (Roux-ен-Y стомашен байпас-RYGB) оказва съществено влияние върху серотониновия метаболизъм при животни (Ratner C et al., 2012; Romanova IV, et al., 2004) и при хора

(DeFrancesco M, et al., 2013). Нещо повече, RYGB се разглежда като крайна мярка, но е много успешно лечение за пациентите със значително затлъстяване, тъй като намалява също и риска от T2DM и сърдечно-съдови патологии (Sjöström L et al., 2007; Sjöström L et al., 2004). RYGB може да промени състава на чревната микрофлора и при мишки (Liou AP et al., 2013) и при хора (Furet J-P, et al., 2010; Zhang H et al., 2009). Когато диабетични мишки са били колонизирани с чревна микрофлора на пост-бариатрични RYGB мишки, те са започнали да губят тегло и са показали подобрене в глюкозният и липиден метаболизъм с конкретни промени в разнообразието от бутират-продуциращите бактерии (Liou AP et al., 2013). Тези резултати показват, че промяната в бутират-продуциращата микрофлора след бариатрична хирургия, може да играе важна роля за регулирането на глад и ситост, както и регулиране на глюкозния и липидния метаболизъм.

Въпреки това, най-простото решение за възстановяване на патологичните нарушения в състава на чревната микрофлора остава промяната в хранителните навици. Начинът на хранене и вида на храната влияе силно върху състава на чревната микрофлора (Wu GD, et al., 2011). Когато затлъстели хора са били поставени на нискокалорийна диета, ограничаваща мазнините и въглехидратите, се отчита ръст в изобилието на *Bacteroidetes* и намаляване на *Firmicutes* (Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI 2006).

2.11. Роля на тестостерона и негови продукти в механизми на метаболизъм/предиабет

Интерес представляват и проучванията върху използването на тестостерон при хипогонадни мъжки индивиди, което води до увеличаване на чувствителността на клетките към инсулин и намаляване на затлъстяването. Съществуват значителен брой доказателства предполагащи връзка между намалените плазмени нива на тестостерон и диабет тип 2 и инсулинова

резистентност. Хипогонадните мъже са в по-голям риск за развитие на диабет. Ниските нива на тестостерон предхождат повишаването на стойностите на глюкоза, инсулин, HbA_{1C}, на гладно и могат да бъдат използвани за предвиждане появата на диабет. Лечението на пациенти с рак на простатата чрез хирургическа или медицинска кастрация влошава инсулиновия и гликемичния контрол, показвайки връзка между тестостероновия дефицит, появата на инсулинова резистентност и диабет тип 2. Андроген субституиращата терапия при хипогонадни мъже подобрява инсулиновата чувствителност, глюкозата на гладно и нивата HbA_{1C}. Предполага се, че андрогенният недостиг е свързан и с повишаване отлагането на висцерална мастна тъкан, която играе роля на ендокринен орган, продуциращ провъзпалителни цитокини, което може да доведе до ендотелна дисфункция и съдово заболяване. Андрогенният дефицит отново е таргет за научни изследвания в медицината.

Оказва се, че разпространението на хипогонадизма е много по-голямо отколкото се смяташе преди. В литературата се публикуват повече факти през последните години за връзка между андрогенен дефицит и метаболитни нарушения (Simon et al., 1997; Stellato et al., 2000; Oh et al., 2002; Dhindsa et al., 2004; Pitteloud et al., 2005; Rhoden et al., 2005; Rhoden et al., 2005b; Corona et al., 2006; Kapoor et al., 2006, 2007; Fukui et al., 2007, 2008; Selvin et al., 2007).

Поради епидемията от затлъстяване, нарастващият брой на болели с диабет тип 2, със или без съдови последствия, както и на база на увеличаващите се доказателства, свързващи тази патология с андрогенен дефицит, се утвърждават изследванията в това направление. Няколко проучвания показват, че у хора с ниски плазмени нива на тестостерон съществува по-голям риск от развитие на ЗД тип 2. Индивиди с ниски тестостеронов нива могат да са предиктор на появата на диабет (Haffner et al., 1997; Stellato et al., 2000; Oh et al., 2002; Rhoden et al., 2005; Shores et al., 2006; Selvin et al., 2007). Систематичен преглед на Ding et al. (2006) от 43

проучвания, включващи 6427 мъже, предполагат, че по-високите плазмени нива на тестостерон са свързани с по-нисък риск от развитие диабет тип 2 и обратно. Haffner et al. (1996) показват, че ниски нива на полов хормон-свързващ глобулин (SHBG) и тестостерон прогнозира по-високи нива на глюкоза и инсулин и повишена склонност към затлъстяване. Ниските нива на плазмен тестостерон обикновено се наблюдават при мъже със ЗД тип 2 и инсулинова резистентност.

Grossman et al. (2008) и Stellato et al. (2000) съобщават данни от Масачузетс Aging Male изследване, в което посочват, че ниските плазмени нива на тестостерон и SHBG играят някаква роля в развитието на инсулинова резистентност и впоследствие диабет тип 2. Fukui et al. (2007) показват, че серумните нива на тестостерон са по-ниски в по-голям брой японски пациенти със ЗД тип 2 в сравнение със здрави мъже и предполагат, че тестостероновите добавки в хипогонадални мъже може да намалят риска от инсулиновата резистентност и атеросклерозата. Тези наблюдения показват, че андрогенният дефицит играе централна роля в различните патологии, обхващащи компоненти на метаболитния синдром, включително при диабет тип 2, инсулинова резистентност, затлъстяване и еректилна дисфункция.

Други проучвания са потвърдили значима обратна връзка между общия тестостерон и инсулиновата резистентност у мъже (Андершон и сътр., 1994; Simon et al., 1997; Pitteloud сътр, 2005; Osuna et al., 2006 г.) с по-силна корелация със свободен тестостерон, отколкото с общ тестостерон (Rhoden et al., 2005; Basaria et al., 2006). Grossman, et al.,(2008) установиха, че 43% от мъжете с диабет тип 2 са с намален общ тестостерон, докато 57% са с намален свободен тестостерон. При ЗД тип 1, 7% са намалили общия тестостерон, но 20% са с нисък свободен тестостерон, с подобни и в двата случая възрастови корекции. Simon et al. (1997) съобщават, че общата концентрация на тестостерон е пряко свързана с инсулин на гладно, след 2 h,

както и с нивата на глюкозата. Ниският общ тестостерон води до повишени стойности на инсулин и авторите предполагат, че разпределението на мазнините в тялото може да повлияят на тези отношения. Osuna et al., (2006) изследват връзката между обиколката на талията, ВМІ и инсулина. Те правят хомеостатичната оценка на инсулинова резистентност с нивата на тестостерона. Установили са значителна отрицателна корелация. Взети заедно, тези резултати показват повишена възможност тестостеронът да има защитна функция срещу развитие на ЗД у мъжете.

Подобно на другите стероидни хормони, тестостерон се биосинтезира от холестерол (Waterman MR, Keeney DS 1992.) Най-големи количества на тестостерон (> 95%) се произвеждат от тестисите при мъжете. Той също се синтезира в далеч по-малки количества и при жени от текалните клетки от яйчниците, от плацентата, както и *zona reticularis* на кората на надбъбречната жлеза, и дори от кожата и при двата пола (Zouboulis CC, Degitz K (2004). В тестисите тестостерон се произвежда от Лайдиговите клетки (Brooks RV, 1975). Мъжките полови жлези съдържат Сертолиевите клетки, които изискват тестостерон за сперматогенезата. Подобно на повечето хормони, тестостеронът се доставя в кръвта, където голяма част от него се транспортира, свързан с конкретен плазмен протеин (SHBG). Нивото на тестостеронония биосинтез се регулира от хипоталамо-хипофизо-тестикуларната ос (Swerdlow RS, Wang C, Bhasin S Apr 1992). Когато нивата на тестостерон са ниски, гонадотропин-рилизинг хормонът (GnRH) се освобождава от хипоталамуса, който от своя страна стимулира хипофизата да секретира FSH и LH.

Загубата на тегло може да доведе до повишаване на нивата на тестостерон. Масните клетки синтезират ензима ароматаза, който превръща тестостерона в естрадиол. Това е още една причина за ниски нива на тестостерон при затлъстели индивиди (Håkonsen LB, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Olsen J, Bonde JP, Andersen CY, Bungum M, Ernst EH, Hansen

ML, Ernst EH, Ramlau-Hansen CH 2011). Промени в плазмените концентрации на инсулина също положително корелират с промени в мастната тъкан. Тестостероновото потискане води до хиперинсулинемия (Dockery et al., 2003) и андроген отнемащата терапия (ADT), още позната като андроген потискаща терапия, предизвиква повишени нива на глюкоза на гладно (Nishiyama et al., 2005). Пациентите, лекувани с ADT повишават гликемията и инсулиновата резистентност (IR), измерена чрез индекса НОМА. Тези находки не зависят от възрастта и BMI.

Basaria et al., (2006) съобщават, че дори и след отчитане на възрастта и BMI пациентите, получаващи ADT са имали значително по-високи нива на инсулин на гладно, отколкото пациенти с рак на простатата, които не получават ADT и здрави контроли. Тези резултати показват, че ADT-терапия в много по-голяма степен в сравнение с възрастта или BMI е пряко отговорна за повишените нива на инсулина на гладно. Освен това, Basaria et al. (2006) са установили значителна отрицателна корелация между глюкозата на гладно, инсулин на гладно и НОМА-индекса по отношение на общия и свободен тестостерон в изследваните три групи мъже. Третирането с тестостерон на мъже с хипогонадизъм намалява инсулина на гладно, инсулиновата резистентност и НОМА-индекса.

Повишената чувствителност към инсулина е в значителна отрицателна корелация с базовите нива на тестостерона (Marin et al., 1992, 1993, 1996; Marin et al., 1995; Pagotto et al., 2003). Boyanov et al., (2003) също показват, че мъжете с диабет тип 2, получавали 3 месеца тестостерон, са намалили глюкозата на гладно и постпрандиалната и HbA_{1c} стойности в сравнение с началото. Необходими са още изследвания, които да обяснят потенциалните биохимични и физиологични механизми, участващи в намаляване на тестостероновия биосинтез поради промени в нивата на инсулин/глюкоза при ЗД, и как това може да промени функцията на тестисите и хипофизо/тестикуларната ос. Няколко наблюдения предполагат, че

съществува връзка между инсулиновите и глюкозните нива и тези на LH и FSH. Диабетично болните мъже често са с понижени серумни нива на FSH, LH, пролактин и растежен хормон, което е свързано с вторичен хипогонадизъм (Hutson и др., 1983). Терапията с тестостерон може да осигури защитно действие срещу появата на ЗД или може поне да облекчи патологията при диабетични усложнения.

Тестостеронавата терапия трябва да се обсъжда само при случаите с доказан андрогенен дефицит. Противопоказание за прилагането на хормона е анамнеза за простатен аденокарцином или висок риск за развитието на този вид малигном. При здрави мъже прилагането на екзогенен тестостерон ще намали продукцията на ендогенния, чрез обратно потискане на LH секрецията. Високи дози екзогенен тестостерон ще потиснат сперматогенезата чрез обратно инхибиране на FSH. Затова ние се насочихме към средства, повлияващи нивото на половите хормони по други механизми.

Tribulus terrestris L. (бабини зъби) е едногодишно растение от сем. Zygophyllaceae, широко разпространено в целия свят (фиг. 4), приспособено да расте в сухи места (Nancy Dale, 2000). Неговите екстракти са често използвани от така наречените боди билдери (фитнес).

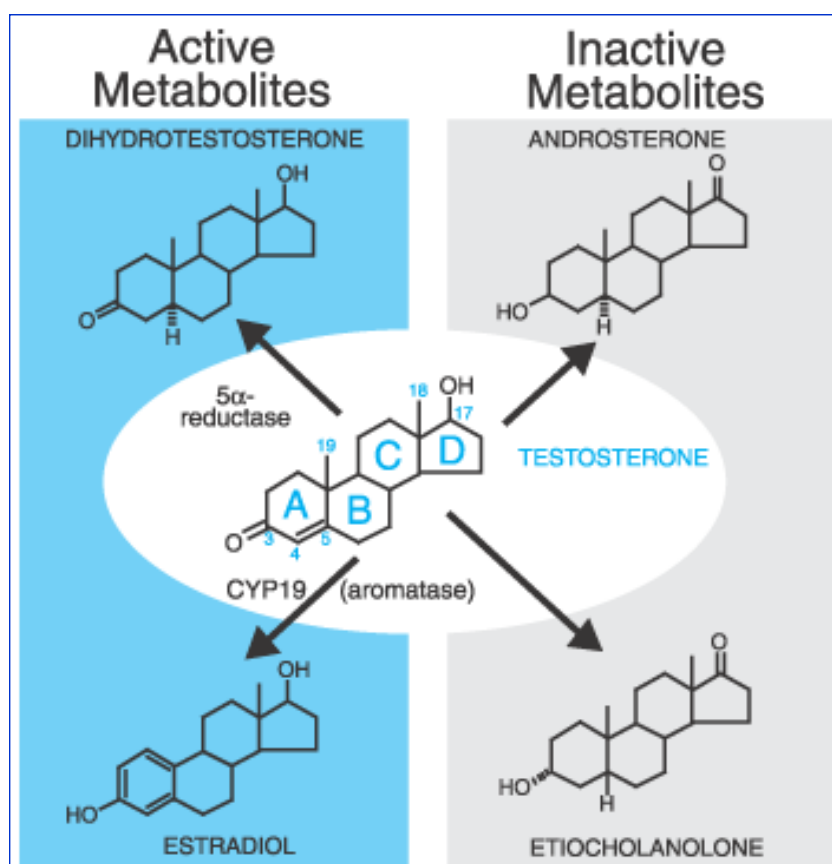


Фиг. 4. *Tribulus terrestris* L.

Билката има диуретично действие и слабо изразен тонизиращ ефект и се употребява при камъни в бъбреците. Основното действие е стимулирането на половата система. Има противоречиви данни за това, че тези екстракти повишават продукцията на ендогенен тестостерон при млади мъже (Neuchev VK, Mitev VI, 2005).

Смята се, че стимулиращите ефекти на *Tribulus terrestris* се дължат и на неговата съставка протодиосцин, който е стероиден сапунин. (Gauthaman K, Ganesan AP, Prasad RN, 2003). Протодиосцинът се метаболизира в организма до дехидроепиандростерон (DHEA), който оказва благоприятен ефект върху интегритета на клетъчната мембрана, метаболизма на холестерол и имунитета. Другите активни сапунини вероятно модулират ефекта на протодиосцин.

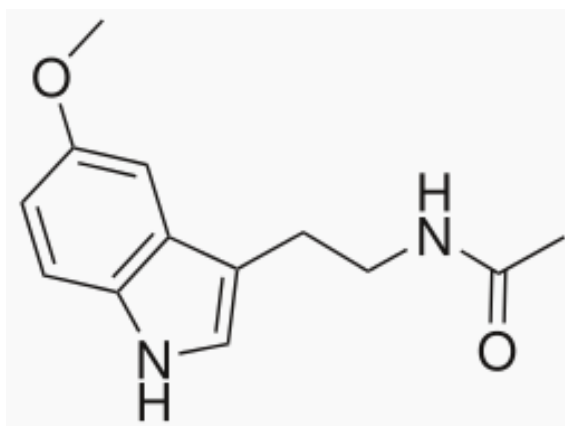
Бъдещи проучвания ще покажат дали и използването на средства, повишаващи ендогенния синтез на тестостерон, например *Tribulus terrestris* L., ще бъдат включени в лечението на тези заболявания.



Фиг. 5. Метаболизъм на тестостерон (Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics, 2011)

2.12. Мелатонин и инсулинова резистентност

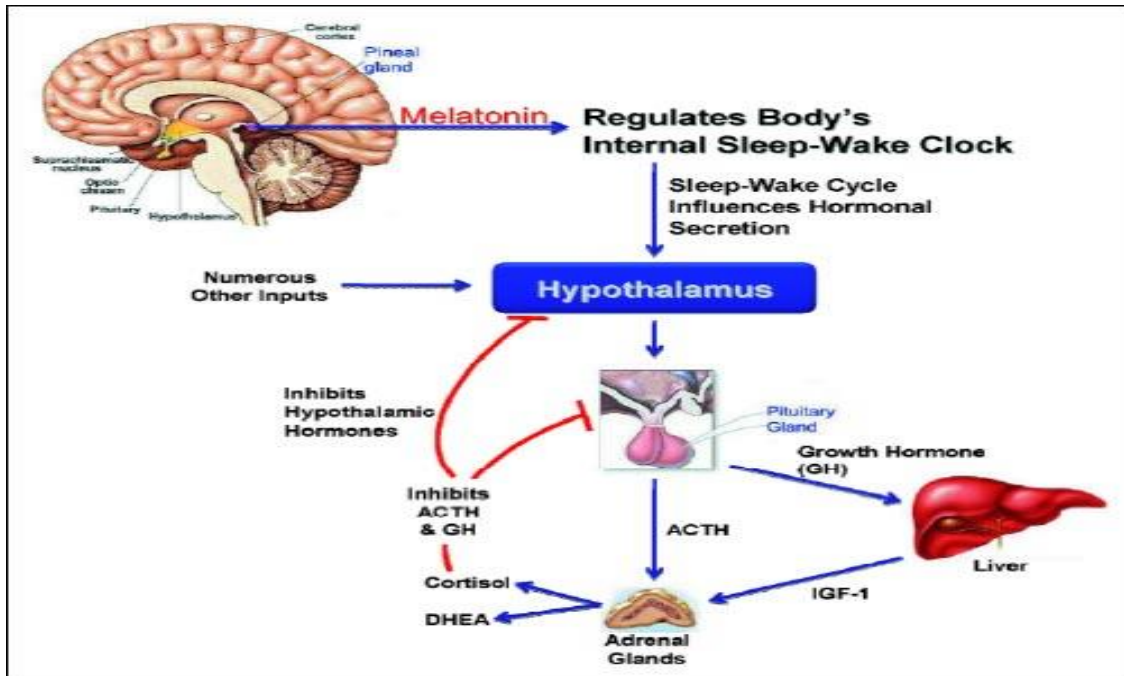
Съобщения за връзката между нивата на **мелатонин** (фиг.6) и инсулиновата чувствителност и съответно развитие на ЗД тип 2 бяха публикувани през последните години (Peschke E, Mühlbauer E. 2010). Ниски нива на мелатонин, който е епифизен хормон, свързан със съня се предполага, че има връзка със ЗД тип 2 (McMullan CJ. et al., 2013). Изследователите разглеждат връзката в група от 740 жени, половината от които са имали ЗД2. Тези, които са имали най-ниските нива на мелатонин, са имали повече от два пъти по-голям риск от развитие на диабет тип 2 в сравнение с жените с най-високи нива на хормона. Изследователите са взели под внимание и другите рискови фактори, като фамилна анамнеза и наднормена т.м. Причината за тази връзка е неясна, а проучването не определя дали мелатонинови хранителни добавки могат да попречат на развитието на болестта (The Journal of the American Medical Association, April 3, 2013).



Фиг. 6. Структура на мелатонин

Ролята на мелатонин в регулация на функции на ЦНС е документирана. Няма данни за ролята на мелатонин в механизми на предиабет.

Анализирайки фактите, че хора с проблеми в съня показват често хипергликемия, може да се допусне необходимостта от проучване в тази насока.



Фиг.7. Мелатонин и регулация на различни функции

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

3.2. Задачи

3.2.1. Фармакологично експериментални задачи

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

3.2.2. Клинични изследователски задачи¹

1. Да се определят ефектите на нискокалорийна диета, съчетана с приемане на пробиотика ЕЛБИВИТ, върху разпределението на мазнини в организма, общи масти и тяхното натрупване (показатели от биоимпеданс), антропометрични показатели на участници-доброволци в научно-изследователския проект НИРДИАБО от двата пола на възраст от 20 до 70 години с предиабет и затлъстяване.
2. Да се определят ефектите на нискокалорийна диета, съчетана с приемане на пробиотика ЕЛБИВИТ, върху показатели на въглехидратна и мастна обмяна на участници-доброволци в проекта НИРДИАБО от двата пола на възраст от 20 до 70 години с предиабет и затлъстяване.
3. Да се определят ефектите на нискокалорийна диета и пробиотика ЕЛБИВИТ върху НОМА индекса и серумните нива на цитокини в кръв на участници-доброволци в проекта НИРДИАБО от двата пола на възраст от 20 до 70 години с предиабет и затлъстяване.
4. Да се изследват основни параметри на генетичния статус на доброволци чрез определяне на три гена, имащи връзка със затлъстяване и предиабет.

¹ Клиничната част от настоящия дисертационен труд е свързана с проекта НИРДИАБО.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1 Материали

4.1.1. Опитни животни

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

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

4.1.2. Фармакологични средства

Пробиотикът ЕЛБИВИТ (ЕлБи Булгарикум) представлява *обезмаслен лиофилизиран млечнокисел продукт*. Той съдържа жизнеспособни клетки на селектиран щам *Lactobacillus bulgaricus* с пробиотично действие. *Lactobacillus bulgaricus* се отличава с висока степен на преживяемост и изключителна жизнеспособност в СЧТ. *Lactobacillus bulgaricus* в обезмаслен вид поддържа баланса на чревната микрофлора и помага за пълноценното

усвояване на лактоза (млечна захар), млечни белтъци, витамини и минерали. Съхранява се на сухо място при температура от 2 до 6 °C.

Таблица 1. Състав на ЕЛБИВИТ в 100 g сух продукт

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

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

Мелатонин (Адифарма АД) – таблетки по 1 mg (оп. 60 бр.), регистриран като хранителна добавка.

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

4.1.3. Нефармакологични средства

Нискокалорична храна. Диетата, с която започваме, без да увеличаваме физическата натовареност или да включваме определена физкултура, е нискокалорична. Тя е определена на конкурсен принцип на база на хранителност, качество, безвредност и запазени хранителни вещества. В продължение на 2 месеца (8 седмици) утвърдените участници в проекта се подложиха на ниско-енергийна диета (1000 до 1200 ккал/дневно). Диетата

включва 5 храненияя, разпределени през деня, като едно от тези храненияя ще бъде заместено с пробиотика ЕЛБИВИТ.

Останалите храненияя са извършени с храни с ниско съдържание на мазнини, умерено количество белтъчини и ниско съдържание на въглехидрати. Целта е през този 8-седмичен период участниците да намалят с $\geq 5\%$ от първоначалното си тегло. Тези, които успеят да достигнат желаната редукция на теглото, да продължат с балканска диета, умерена физическа активност и психологическа работа. Този период продължава и през останалите месеци на 2-годишния период на проучването. Това е период на поддържане на първоначалната редукция на теглото с последващо значително намаление на телесната маса.

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

4.2.1. Клинично-лабораторни методи

❶ Определяне на глюкозата

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

❷ Орален глюкозо толерантен тест (ОГТТ)

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

По-долу представяме всички методи клинично-лабораторни изследвания, проведени при лицата участници в проекта НИРДИАБО.

③ Хематология, коагулация, биохимия, хормони и туморни маркери

Пример на файл на участник в НИРДИАБО, демонстриращ проведените хематологични, биохимични и клинично-лабораторни изследвания

Хематология и коагулация

Test (profile) name	Result	Measurement	Reference values
ПКК -12 показатели	*	Профил	Виж по-долу
<i>HGB(хемоглобин)</i>	146	g/l	м.135-180, ж.120-160
<i>WBC (левкоцити)</i>	5.5	$\times 10^9/L$	3,5 – 10,5
<i>RBC (еритроцити – бр.)</i>	4.75	$10^{12}/L$	м. 4.4 – 5.9; ж. 3.7 – 5.3
<i>Hct (хематокрит)</i>	0.41		м.0.40 – 0.53; ж.0.36 – 0.48
<i>Plt (тромбоцити)</i>	272	$10^9/L$	130 – 360
<i>MCV (ср. обем на еритроцита)</i>	85.70	fl	82 – 96
<i>MCH (ср. Hgb съдърж. в еритроц.)</i>	30.70	pg	27 – 33
<i>MCHC (ср. Hgb конц. в еритроц.)</i>	358.00	g/l	300 – 360
<i>RDW(ширина еритроц.разпределение)</i>	на 13.10	%	11.5 – 14.5
<i>MPV (ср обем на тромбоцита)</i>	8.20	fl	6.9 – 10.8
<i>Pct (тр обем/ общ обем)</i>	\$		0.1 – 0.5
<i>PDW (ширина на</i>	\$	%	10 – 18

Хематология и коагулация

Test (profile) name	Result	Measurement	Reference values
---------------------	--------	-------------	------------------

тромб.разпределение)

Биохимия

Test (profile) name	Result	Measurement	Reference values
---------------------	--------	-------------	------------------

АлАТ (GPT)

32

U/l

5 – 40

АсАТ (GOT)

30

U/l

5 – 40

Гама – GT

26

U/l

м.5 – 50 ж. 5 – 30

Креатинин

59.0

mkmol/l

м.до 50г.74 – 110 м.над
50г. 74-127 ж.58 – 96

Холестерол – общ

5.42

mmol/l

3.4 – 5.2

Холестерол – HDL

0.77

mmol/l

над 1.0

Холестерол – LDL

3.20

mmol/l

2.6 – 3.2

Триглицериди

3.12

mmol/l

от 0,6 до 1,7

ОГТТ-0 и 120 мин

*

Профил

Виж по-долу

ОГТТ – 0 мин.

6,8

mmol/l

ОГТТ- 120 мин.

10,5

mmol/l

Хормони и туморни маркери

Note: Няма.

Test (profile) name	Result	Measurement	Reference values
---------------------	--------	-------------	------------------

IRI	23,5-0min	mU/l	3.0 – 20.0
-----	-----------	------	------------

IRI	124.1-120min	mU/l	3.0 – 20.0
-----	--------------	------	------------

Други

Test (profile) name	Result	Measurement	Reference values
---------------------	--------	-------------	------------------

4.2.2. ELISA методи

❶ Метод за определяне на човешки TNF- α ELISA Kit

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

❷ Метод за определяне на IL-1beta

ELISA kit е използван за определянето на IL-1beta в кръв на хора. Методът е сандвич-ELISA. При изследванията се спазват указанията на производителя, като накрая резултатът се определя спектрофотометрично при дължина на вълната 450 nm. Концентрацията на IL-1beta в кръв на хора се

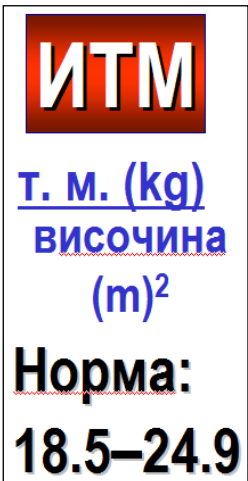
определя чрез изчисления на база на стандартна крива (стандартите са част от набора реактиви в Kit-a).

4.2.3 Методи за оценка на затлъстяване

❶ Антропометрични

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

- **Индекс на телесната маса (ИТМ)**

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

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

измереното съпротивление с ниска и висока честота се използват за изчисляване на екстрацелуларната вода (ECW) и общата вода в организма (TBW). Тези компоненти се използват за изчисляване на мастната тъкан (FM) и немастната тъкан (FFM). БИА е лесен, неинвазивен, относително евтин метод, без излагане на йонизираща радиация, който може да се прилага при здрави индивиди и хронични пациенти със стабилен воден и електролитен баланс. Използваният биоимпеданс апарат беше Tanita BC-420 MA.

4.2.4 Метод за определяне на предиабет

❶ Методи за определяне на глюкоза (описани по-горе)

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

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

$$\text{НОМА-IR} = \text{глюкоза} * \text{инсулин} / 22.5$$

Референтни стойности са следните:

Нормален НОМА-IR < 2.5

Рискова зона: 2.5-5.0

Висока инсулинова резистентност: (НОМА-IR) > 5.0

❷ Експериментални модели на инсулинова резистентност

- Чрез фруктоза (адаптиран метод по дисертацията на доц. д-р Ханджиева-Дърленска)
- Чрез експериментално затлъстяване (адаптиран метод по доц. д-р Ханджиева-Дърленска)

4.2.5. Генетични методи

- *Амплификация чрез полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction, PCR) на специфични фрагменти от геномната ДНК на избраните гени и полиморфизми. В амплификационната реакция участва термостабилна ДНК-зависима ДНК-полимераза, която в буферна среда с подходяща концентрация на Mg^{2+} йони и в присъствието на свободни нуклеотиди, извършва полимеразната реакция. Амплификационната реакция се извършва в PCR апарат, който поддържа определените температури, необходими за последователното осъществяване на всеки етап от PCR реакцията – денатурация, хибридизация на праймерите (анийлинг), синтез на ДНК.*
- *Статистическа обработка, изразяваща се в определяне на алелните и генотипни честоти за изследваните ДНК полиморфизми. Сравняване на получените алелни и генотипни честоти при изследваните пациенти с контролна извадка от здрави индивиди чрез провеждането на χ^2 тест.*

Генетичните изследвания са проведени в генетична медико-диагностична лаборатория „ГЕНИКА“, под ръководството на Таня Кадийска, д.б., член на изследователския екип на НИРДИАБО

4.2.6. Статистически методи

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

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Лабораторни опити с плъхове

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

I група (6 бр.) - контрола

(6 бр.) - третирани с фруктоза

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

II група (6 бр.) - контрола

(6 бр.) - третирани с фруктоза + пробиотик

(6 бр.) - затлъстяване + пробиотик

III група (6 бр.) - контрола

(6 бр.) - третирани с фруктоза + мелатонин

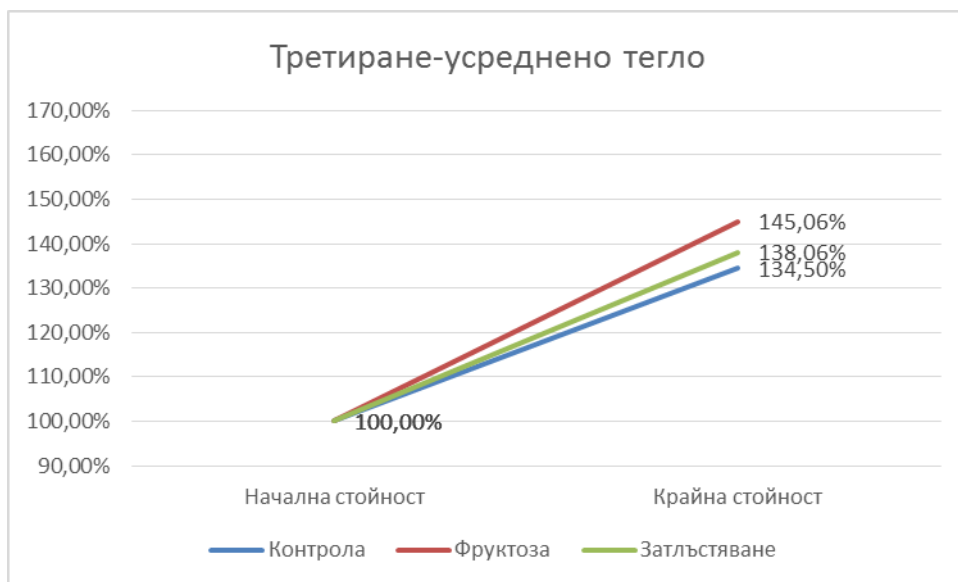
(6 бр.) - затлъстяване + мелатонин

Получените резултати са обработени статистически и са представени в следните таблици и фигури.

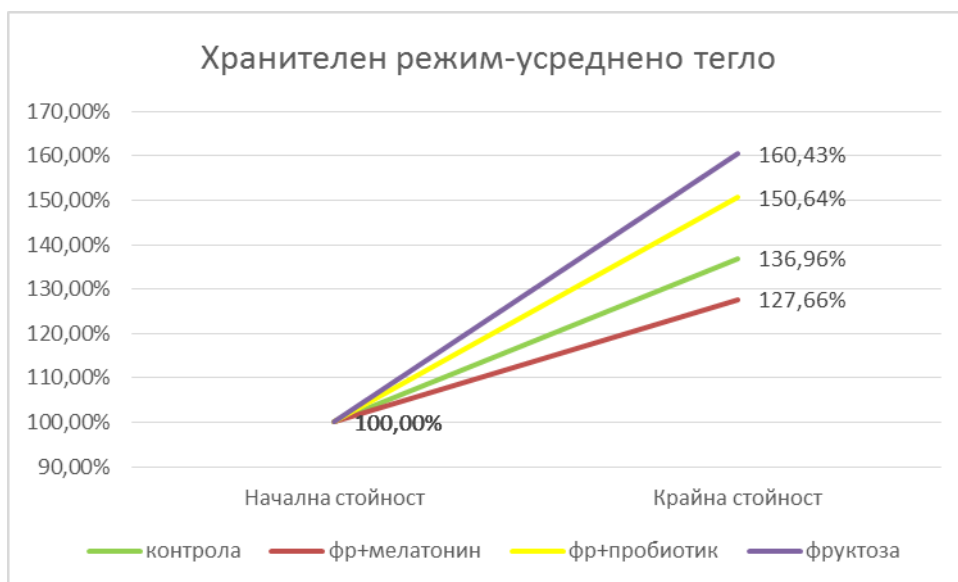
Начално тегло контроли	Начално-тегло - фруктоза	Начално-тегло - затлъстяване		Тегло след 30 дни	Тегло след 30 дни	Тегло след 30 дни	
170	160	170		220	210	240	
170	140	150		210	250	200	
200	170	170		230	210	200	
190	180	160		220	220	200	
180	140	150		210	270	220	
160	160	160		250	240	220	
210	150	150		230	220	200	
200	160	180		190	250	240	
140	160	150		250	270	240	
150	160	150		240	240	210	
170	170	140		240	220	230	

160	180	170		240	240	210	
150	150	150		250	260	200	
190	180	150		230	240	200	
160	150	130		240	200	200	
160	170	160		220	240	210	
160	170	140		230	220	210	
170	170	170		240	230	220	
171,66	162,22	155,55		230	235	213,88	
I група са контроли, II гр. са третирани с фруктоза			III гр. са със затлъстяване				

Таблица 2. Плъхове, третирани с фруктоза (модел на инсулинова резистентност) и плъхове, подложени на висококалорична диета за създаване на модел на затлъстяване



Фиг. 8. Процентна промяна в теглото на експериментални плъхове на следните групи- контроли, третирани с фруктоза и подложени на затлъстяване.



Фиг. 9. Процентна промяна в телесното тегло на експериментални плъхове от четирите групи.

Извод: Групата третирана само с фруктоза показва най-бързо покачване на теглото. Прибавянето на пробиотик или мелатонин показва забавяне в покачването на теглото, което говори за благоприятния ефект на тези субстанции върху животински модели с инсулинова резистентност.

Изследвания върху трибестан

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

I група (6 бр.) - контроли

II група (6 бр.) - третирани с фруктоза

III група (6 бр.) - третирани с трибестан

Таблица 3. Тегло на опитите животни

I гр. контрола - начално тегло	II гр., третирана с фруктоза - начално тегло	III гр., третирана с фруктоза - начално тегло
150 g	170 g	160 g
150 g	140 g	150 g
150 g	150 g	150 g
140 g	160 g	140 g
150 g	170 g	150 g
160 g	140 g	160 g
Контрола - тегло след 45 дни	II гр., третирана с фрук- тоза - тегло след 45 дни	III гр., третирана с фруктоза тегло след 45 дни
290 g	320 g	340 g
270 g	230 g	290 g
260 g	290 g	170 g
250 g	310 g	170 g
250 g	320 g	280 g
280 g	290 g	290 g
Контрола тегло след 15 дни	II гр. фруктоза тегло след 15 дни	III гр., третирана с фруктоза + трибестан- тегло сл. 15 дни
330 g	350	360
300 g	250	320
300 g	320	200
280 g	340	200
280 g	340	320
320 g	320	320
Контрола - глюкоза на гладно	II гр., третирана с фрук- тоза - глюкоза на гладно	III гр., третирана с фруктоза+трибестан-глюкоза на гладно
5,9 mmol/l	5,6 mmol/l	5,4 mmol/l
5,6 mmol/l	5 mmol/l	6,1 mmol/l
5,2 mmol/l	5,9 mmol/l	5,3 mmol/l
4,9 mmol/l	4,9 mmol/l	5,9 mmol/l
5 mmol/l	5,7 mmol/l	5,4 mmol/l
5,1 mmol/l	5,2 mmol/l	5,6 mmol/l

Извод: Резултатите не показаха статистически значима разлика в теглото и глюкозата на гладно при третираните с трибестан животни в сравнение с останалите групи плъхове. Необходими са допълнителни изследвания, свързани с адаптиране на дозата и увеличаване продължителността на експеримента.

5.2. Резултати от изследвания по проекта НИРДИАБО²

Таблица 4. Общ брой участници – мъже и жени, разпределени в три възрастови групи и утвърдени след скрининг за стартиране с първият етап на диетичен режим с пробиотик

Общ брой участници	220
Жени (общ брой)	179
• На възраст от 25 до 40 години	41
• На възраст от 41 до 60 години	95
• На възраст от 61 до 70 години	43
Мъже (общ брой)	41
• На възраст от 25 до 40 години	15
• На възраст от 41 до 60 години	17
• На възраст от 61 до 70 години	9

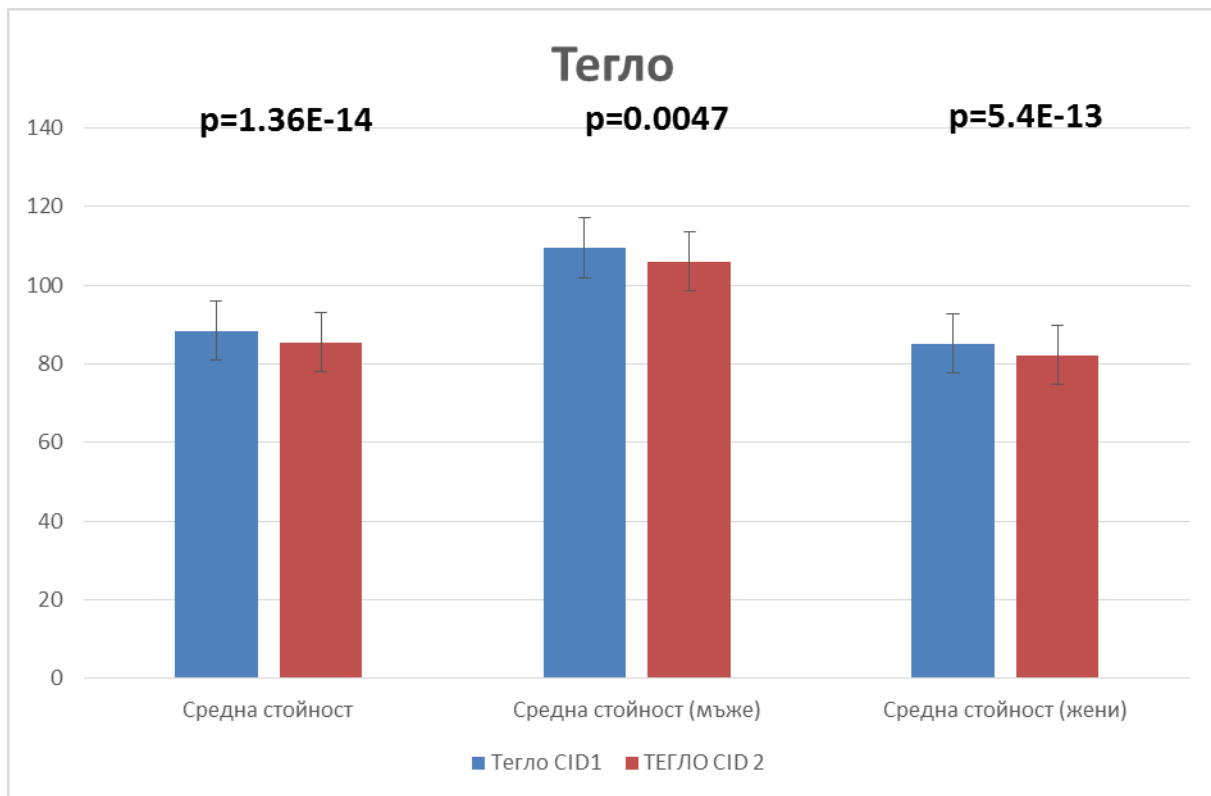
На таблицата са представени участниците в НИРДИАБО, които са утвърдени след скрининг. Те включват доброволци от София, Пловдив и Плевен.

Таблица 5. Общ брой участници от трите изследователски центъра (София, Пловдив и Плевен), разпределени са по пол и възраст

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

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

• На възраст от 61 до 70 г.	35	3	5	43
Мъже/общ брой	31	4	6	41
• На възраст от 25 до 40 г.	10	2	3	15
• На възраст от 41 до 60 г.	13	2	2	17
• На възраст от 61 до 70 г.	8	0	1	9



Фигура 10. Тегло – общо (мъже и жени) на участници в НИРДИАБО при CID 1 – преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотици и при CID 2 – след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотици. Визита 6 е визитата, когато лекарят е определил показателите на тегло, на общо здраве и е измерил участника с апарат Танита.

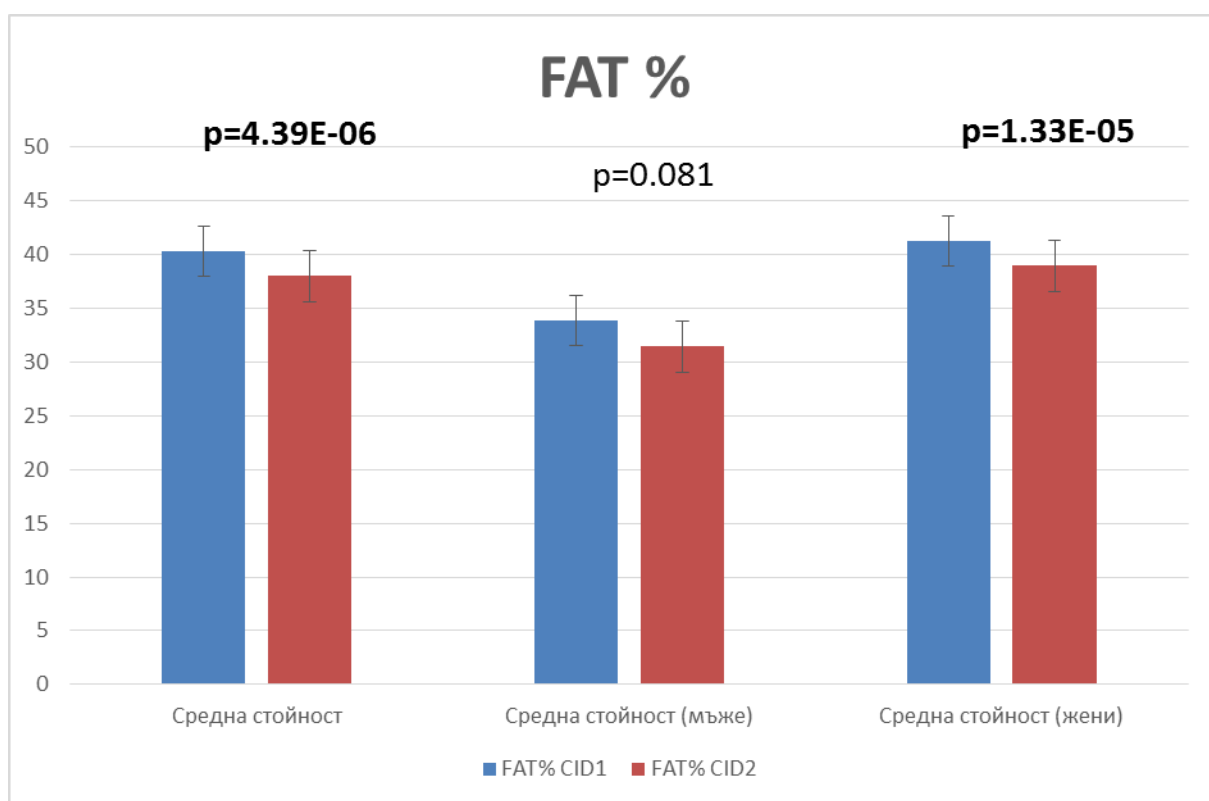
Извод: *Участниците от двата пола намалиха статистически значимо теглото си след двумесечния режим на хранене с нискокалорична диета и пробиотик. Всички постигнаха 5% намаляване на теглото, а 40% от участниците постигнаха над 5% намаляване на теглото (съответно от 8 до 14%). Анализът на резултатите показва, че по-голям процент на намаляване на теглото се наблюдава при тези участници с по-високо телесно тегло.*

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

Извод за мъжете: *Статистически значимо е намалено теглото на мъжете, участници в НИРДИАБО ($p > 0.001$). Отражено е средното тегло, но някои от мъжете намалиха теглото си с 10-12 kg за 2 месеца.*

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

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



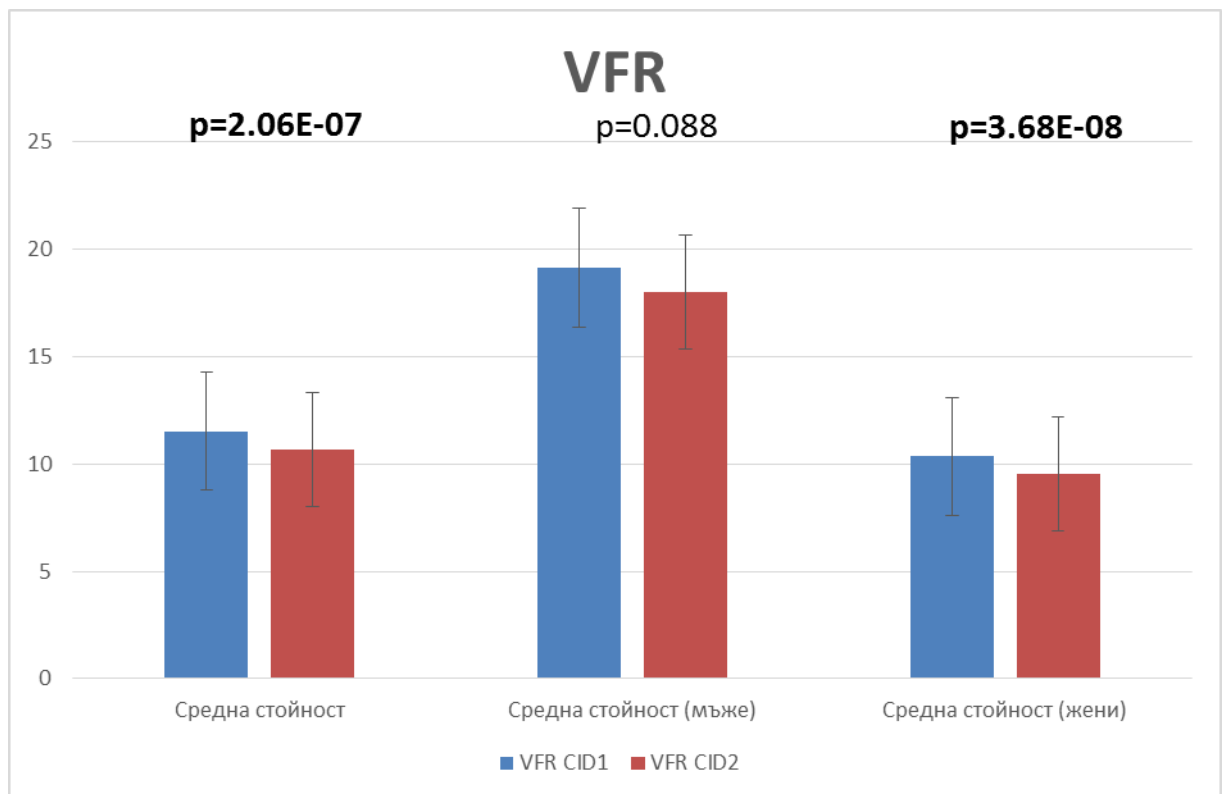
Фигура 11. Процент мазнини общо за мъже и жени - участници в НИРДИАБО при CID 1 преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик.

Чрез апарат Танита се измерват, както теглото, така и мазнините в организма на всеки участник. Танита определя и процента на мазнини спрямо теглото, което е важен показател за степента на затлъстяване. Намалването на процента на мазнини беше отчетено при всички участници след 2-месечен период на диета + пробиотик. Няма статистически значими различия в процента на мазнини между жени и мъже, въпреки че при жените процентът мазнини е малко по-висок.

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

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

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



Фигура 12. Рейтинг на висцералното затлъстяване при мъжете и жените, участници в проекта НИРДИАБО, при CID 1 преди двумесечния

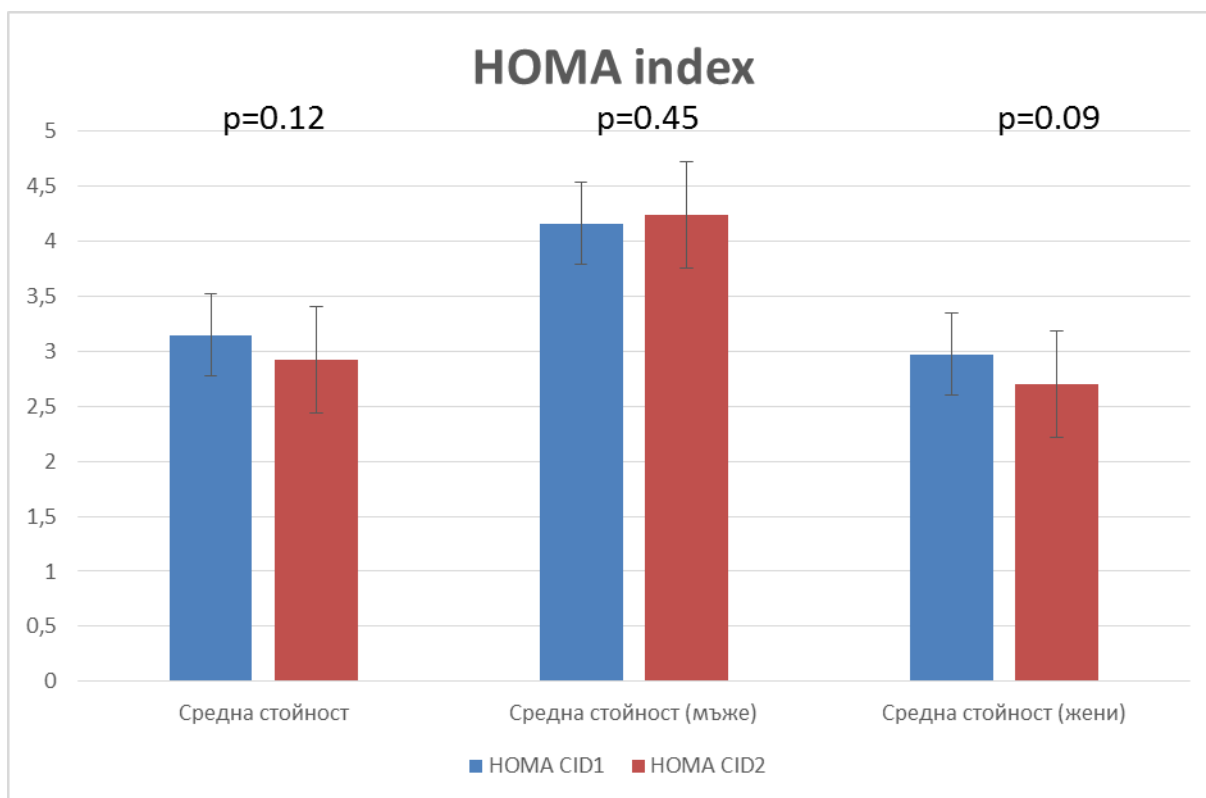
нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик.

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

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

Изследван е рейтингът на висцералното затлъстяване при мъжете - участници в НИРДИАБО при CID 1 преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. Установено е, че висцералното затлъстяване намалява при мъже след двумесечен период на ниско калорична диета + пробиотик.

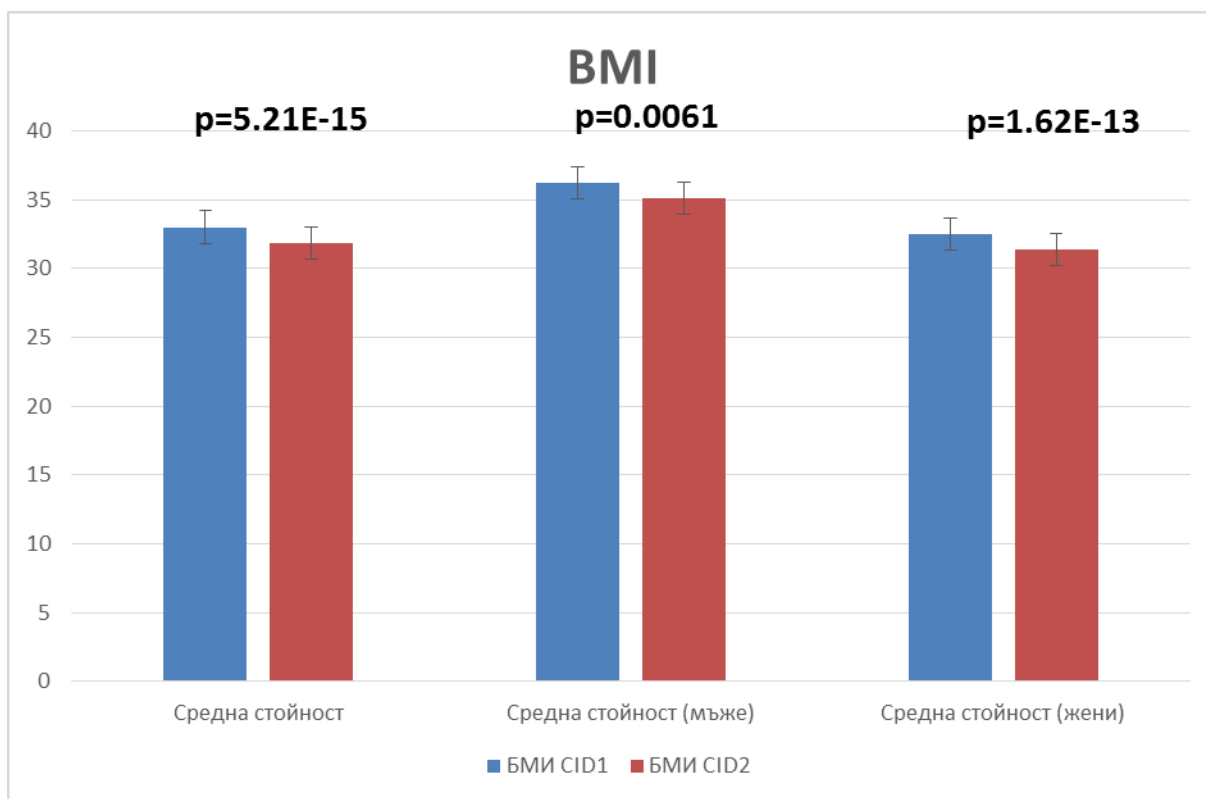
Изследван е рейтингът на висцералното затлъстяване при жените участници в НИРДИАБО при CID 1 преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. Висцералното затлъстяване намалява сигнификантно при жени след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



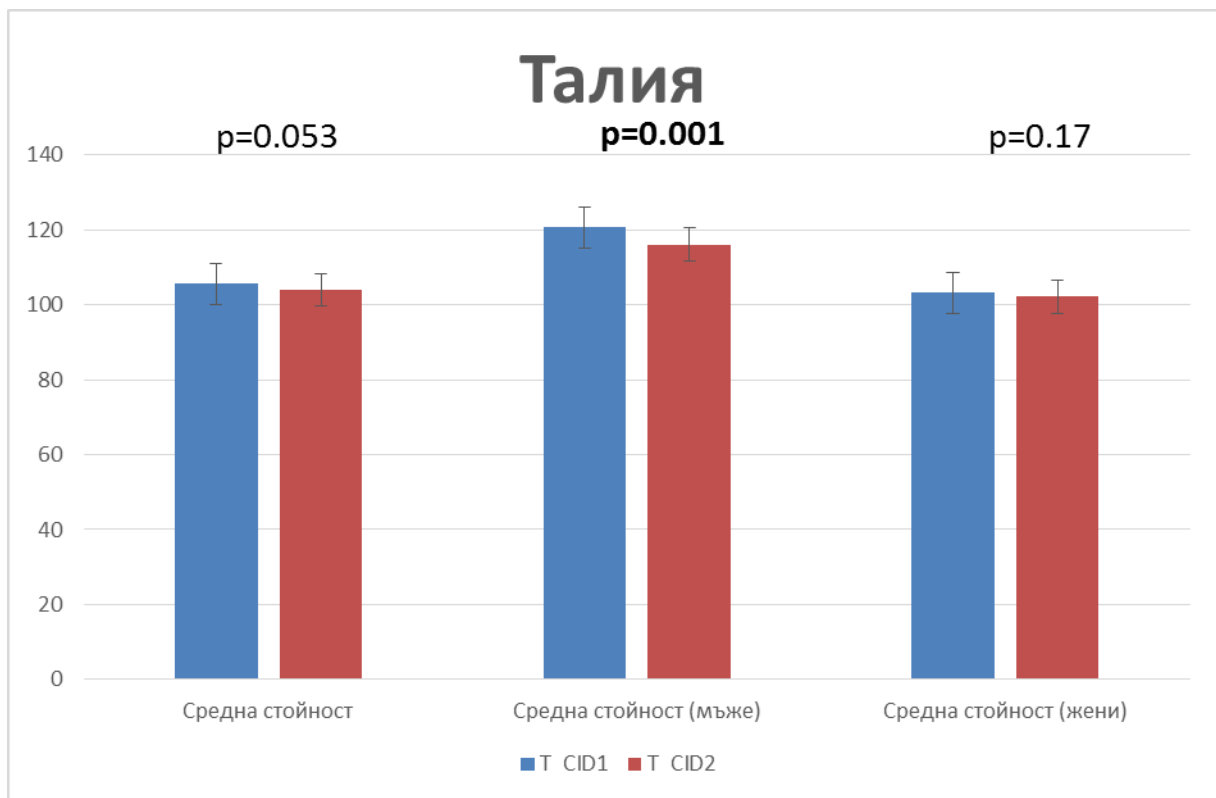
Фигура 13. НОМА – общ (мъже и жени) участници в НИРДИАБО при CID 1 – преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик.

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

Извод: Двумесечният период на нискокалорична диета с пробиотик намали НОМА индекс при жени - участници в проект НИРДИАБО. Намалява се и риска за развитие на ЗД тип 2.



Фигура 14. BMI при мъже и жени - участници в НИРДИАБО при CID 1 – преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик. BMI е намален, както при жени, така и при мъже под влияние на нискокалоричния режим на хранене с пробиотик. Данните са за групата BMI над 30.



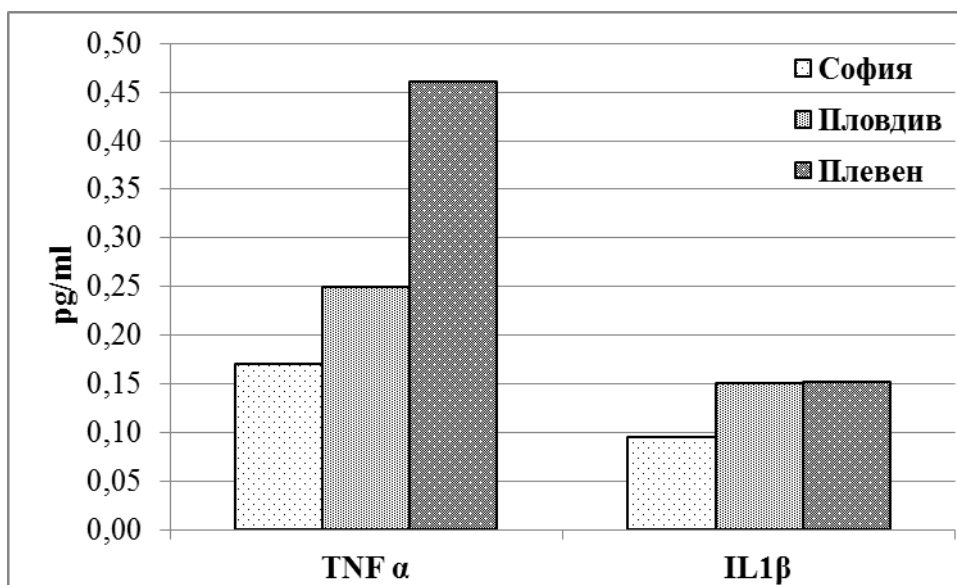
Фигура 15. Талия при мъже и жени - участници в НИРДИАБО при CID 1 – преди двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик и при CID 2 – след завършване на двумесечния нискокалоричен диетичен режим + пробиотик.

Извод: *Талията е намалена, както при жени, така и при мъже под влияние на нискокалоричния режим на хранене с пробиотик.*

Резултати от определяне на цитокини TNF α и IL-1 β в кръв на участници в НИРДИАБО преди стартиране на нефармакологичните интервенции с диети, физическа активност и психологическа помощ

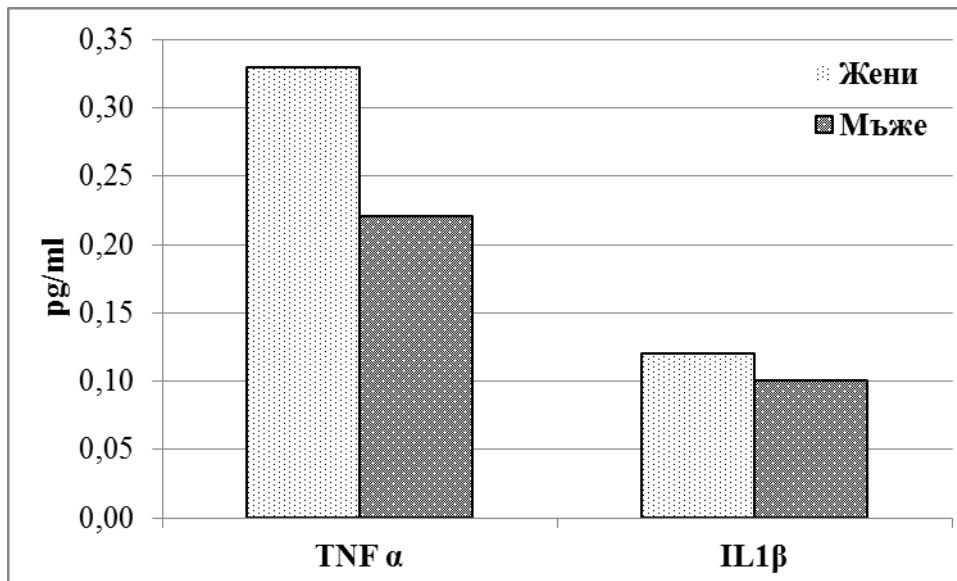
На фиг. 16. и 17. са представени резултатите от определяне на серумните нива на TNF α и IL-1 β в кръв на мъже и жени, участници в НИРДИАБО. Цитокините са изследвани с ELAISA метод.

На фиг. 16 са представени серумните нива на TNF α и IL-1 β на 220 мъже и жени със затлъстяване и предиабет от три географски района на България – София, Пловдив и Плевен. Има статистически значима разлика ($p < 0.05$) в нивата на TNF α в серума на доброволците на трите научно-изследователски центъра. Статистически значима разлика се наблюдава и в нивата на IL-1 β при доброволците от Пловдив и Плевен в сравнение със София.

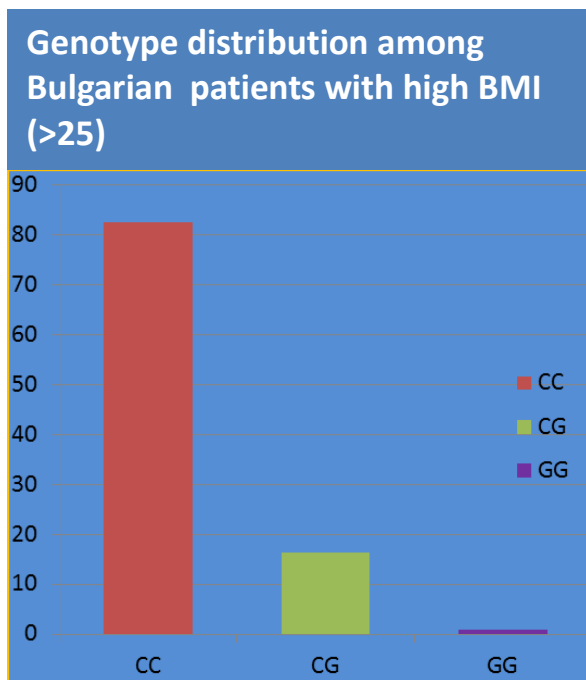


Фиг. 16. Серумни нива на TNF α и IL-1 β при доброволци от трите научно-изследователски центъра – София, Пловдив и Плевен ($p < 0.05$).

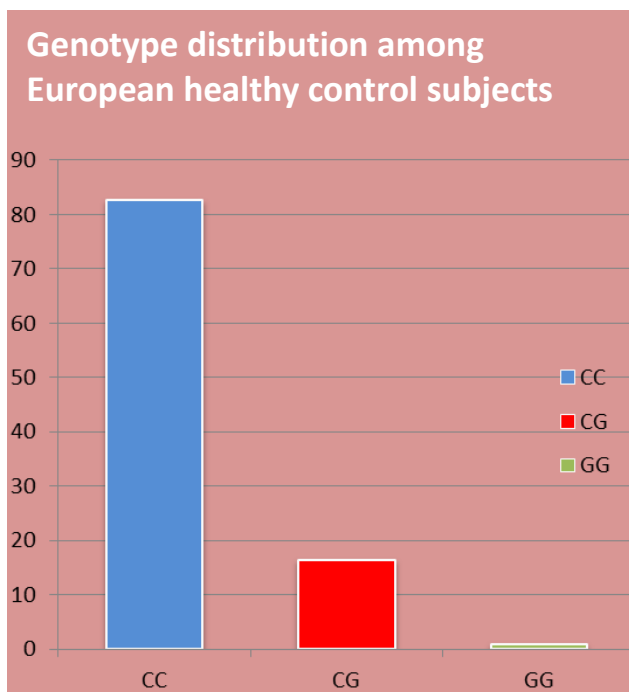
На фиг. 17. са представени резултатите от определянето на серумните нива на $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IL}1\beta$ на доброволците, като е направено сравнение по пол. Статистически значима разлика се установява в нивата на $\text{TNF}\alpha$ между двете групи ($p < 0.05$). По-високо серумно съдържание се наблюдава при жените в сравнение с мъжете. Нивото на $\text{IL}-1\beta$ при жените е по-високо отколкото при мъжете, но няма статистически значима разлика между тях.



Фиг. 17. Серумни нива на $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IL}-1\beta$ при доброволци от трите научно-изследователски центъра, разделени по полов признак



Фиг.18. Генотипно разпределение на Proliferator Activated Receptor Gamma (*PPARG*) сред български пациенти с висок BMI (>25) (CC: 82,6%, CG: 16,4%, GG: 1%)



Фиг.19. Генотипно разпределение на Proliferator Activated Receptor Gamma (*PPARG*) сред здрави европейци (CC: 86%, CG: 13%, GG: 1%)

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

Таблица 6. Резултати от статистически тестове за асоциация на редките алели на разглежданите варианти и техни комбинации.

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

Наблюдава се значима асоциация на комбинацията на двата гена (TCF7L2/FTO) с високи стойности на НОМА-индекс. Тези резултати могат да се използват с голяма точност за предвиждане на развитие на инсулинова резистентност у предразположени пациенти.

6. ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от проведените изследвания върху доброволци мъже и жени с предиабет и затлъстяване документират, че ежедневното прилагане на комбинацията от ниско калорична диета с пробиотик в продължение на два месеца подобрява общото състояние, както на мъже, така и на жени. По-изразено намалява теглото и НОМА индекса при жени, а ВМІ се понижава при двата пола. Посочените ефекти корелират с намаляване процента на масти в организма при двата пола. Намалява обиколката на талията, което е по-отчетливо изразено при мъже. Факторът VFR намалява при двата пола. Резултатите също показват намаление на провъзпалителните цитокини в серума на жени и мъже, като по-изразен е ефектът при мъжете. *За първи път се документират факти от генома на участниците с промени на гени, отговорни, както за предиабет, така и за затлъстяване.*

ЗД е широко разпространено заболяване, което през последното десетилетие се развива като епидемия в целия свят. Ежегодно се увеличава броят на новодиагностицираните пациенти с диабет тип 2 (Mathers CD and Loncar D., 2006). Анализът на литературните данни подсказва връзка между затлъстяването и развитието на ЗД тип 2 (Haslam DW, James WP 2005). При затлъстяване се увеличава производството на про-възпалителни цитокини (TNFalfa, Il-1beta и др.), както и концентрацията на адипокини в кръвта на мъже и жени.

Има данни, че тези цитокини повлияват рецепторите за инсулин и водят до развитие на *инсулинова рецепторна резистентност*. При пациенти със затлъстяване, установявахме високи нива на инсулин. Различни са механизмите на развитие на инсулинова резистентност. Резултатите от настоящите изследвания показват, че експерименталното затлъстяване,

предизвикано с продължително хранене с фруктоза на пльхове, може да доведе до нарушаване на въглехидратната обмяна, включително допускаме и промяна в чувствителността на рецепторите за инсулин.

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

Важен елемент на профилактика на ЗД е да се осигури хранителен правилен режим в съчетание с физическа активност, за да се потисне развитието на това социално значимо заболяване още във фаза на предиабет. Такава е и целта на настоящото проучване, при което се извършиха изследвания върху доброволци с предиабет и различна степен на затлъстяване. Ниско калоричната диета беше определена от диетолози в размер на 1200 ккал/дневно, като храната включваше рационални комбинации на белтъци, мазнини и въглехидрати, повече зеленчуци и плодове, богати на витамини. Важен елемент на хранителния подход е разпределение на храните в пет хранения през деня (закуска, предобедна закуска, обяд, следобедна закуска, вечеря). Този хранителен режим беше съчетан с ежедневна употреба на пробиотик и прилаган в продължение на два месеца на 220 доброволци (41 мъже и 179 жени).

Пробиотиците са класифицирани като хранителни добавки. Те представляват сухи прахообразни вещества, съдържащи най-често лактобацилус булгарикус. В литературния анализ са посочени много факти от изследвания върху пробиотици. За първи път у нас е експериментирано с

пробиотичен продукт, изолиран от проф. д-р Ив. Богданов през миналия век, е установено, че той е богат на лактобацилус булгарикус. Този микробен агент е сред т.нар. положителни микроорганизми, които балансират с отрицателните за поддържане на нормалната чревна флора. Различни ефекти са доказани при изследвания през последните 20 години - стомашно-чревни, противовъзпалителни, имуноактивиращи и др.

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

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

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

калориен хранителен режим + пробиотик с намаляване на антропометричните и клинично-лабораторни показатели.

В настоящото проучване са документирани нови факти относно ролята на индивидуалния геном в развитието на предиабет при хора със затлъстяване. *За първи път се установяват промени*, както при мъже, така и при жени в гени, които са отговорни за развитие на ЗД или за затлъстяване. При настоящото проучване се документира полиморфизъм в *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPARG)* при доброволци. Анализираните 224 пациенти от три области на България (София, Пловдив и Плевен) показаха генотип и алелно разпределение в пациентите с висок BMI Genotype and allelic distributions in patients with high BMI (CC: 82,6% CG: 16,4%, GG: 1%) и при пациентите с нормален BMI (CC:86%, CG:13%, GG:1%). Анализът на тези резултати показва липса на статистическа значимост между двете проучвани групи. Отчитайки *ролята на PPARG гена*, който има роля при ЗД тип 2, може да се заключи, че *този ген не се асоциира с развитието на предиабет в популация българи със затлъстяване, което отличава българската популация от други европейски популации*.

При настоящите проучвания бяха изследвани още два гена - Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) и Fat mass and obesity-associated protein (FTO). Резултатите показаха различия и индивидуален геном на пациентите с полиморфизъм в тези гени. За първи път се съобщават резултати от изследвания върху българи със затлъстяване и ЗД и промени в алели на посочените гени. В литературата е осветлена ролята на FTO и TCF7L2 в развитието на затлъстяване (Ali O. 2013). За първи път са документирани промени в тези гени при някои пациенти и от двата пола със затлъстяване и предиабет.

Анализирането на НОМА индекса и степента на затлъстяване на резултатите на генетичните изследвания показва роля на индивидуалния геном на участниците в научния проект, при техния отговор към двумесечния

ниско калоричен хранителен режим и приемането на пробиотик. Анализът на отделните генотипи и намерените промени в генома на част от участниците внася новост в литературата и обяснява защо част от участниците се повлияват по-значимо от хранителния режим с пробиотик, а друга част отговаря по-слабо на двумесечното третиране.

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

В настоящото проучване бяха проведени фармакологични експерименти и е създаден модел на инсулинова резистентност чрез фруктоза с определяне ефекти на мелатонин и на пробиотик върху показатели на теглото и въглехидратната обмяна. Резултатите показват, че животните третирани с фруктоза за двумесечен период от време увеличават теглото и развиват инсулинова резистентност. Хроничното третиране с пробиотик намалява теглото, което корелира с посочените по-горе резултати от изследвания при хора. Получените резултати с пробиотик се подкрепят от изследванията в дисертационен труд на д-р Г. Богданов (2016). Други автори съобщават също за развитие на инсулинова резистентност след продължително третиране с фруктоза (Basciano, H., Federico, L. & Adeli, Khosrow, 2005). Изследванията с

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

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

Водещи провъзпалителни цитокини като TNF α и IL-1 β са представени от други автори като отговорни в патогенезата на затлъстяването и ЗД тип 2. Нашата хипотеза е, че при затлъстяване двата цитокина TNF α и IL-1 β се включват в механизмите на развитие на инсулинова резистентност на ниво инсулинови рецептори. В подкрепа на тази хипотеза са и данни на други автори в литературата. Новост в проучването за България са различията между участниците от трите областни центъра (София, Пловдив и Плевен).

Концентрациите на TNF α в кръв на участниците от Плевен са най-значимо повишени в сравнение с тези от София и Пловдив. При част от тях BMI е висок – над 27.5 и над 30, което може да е един фактор, определящ по-високите нива на TNF α . На база на тези резултати ни предстои да проучим участниците с високи концентрации на провъзпалителни цитокини за прекарани възпалителни заболявания или хронични артрити и други хронични възпаления.

Резултатите също демонстрират различия между жени и мъже в концентрациите на TNF α . Ние имаме данни, че част от жените в проучването съобщаваха за ставни изменения, вследствие увеличеното тегло. Възможно е хронично ставно възпаление да е отговорно при част от жените с висок BMI за по-големите концентрации на TNF α . Това допускане се подкрепя и от данни в литературата за ролята на този цитокин в механизмите на хроничните ставни възпаления. То се подкрепя и от резултатите на настоящето изследване, при които не се намират статистически значими промени в концентрациите на IL-1 β между мъже и жени.

7. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

7.1. Изводи

1. Разработени са два модела за изследване на фармакологични и нефармакологични средства върху предиабет с инсулинова резистентност.
2. Установено е, че мелатонинът оказва влияние върху телло и показатели на въглехидратна обмяна на плъхове със затлъстяване.
3. Ефектът на пробиотика ЕЛБИВИТ се проучи върху два модела на инсулинова резистентност- натоварване с фруктоза и чрез затлъстяване. Установи се намаляване на теллото на животните и подобрене на показателите на въглехидратна обмяна.
4. Прилагането на двумесечна ниско калорийна диета плюс пробиотик води до намаляване на теллото на мъже и жени със затлъстяване и предиабет.
5. За първи път е установено, че комбинацията от пробиотик и ниско калорийна диета, прилагани върху хора със затлъстяване и предиабет, намалява НОМА-индексите, подобрява кръвно-захарния профил и показателите на мастната и въглехидратната обмяна.
6. Установени са статистически значими разлики в кръвните нива на TNF-alpha и IL-1beta при участниците в проекта „НИРДИАБО“ разпределени по пол и региони.
7. За първи път се документират изследвания върху три гена на българимъже и жени с предиабет и затлъстяване. *За първи път се установяват промени*, както при мъже, така и при жени в гени, които са отговорни за развитие на ЗД или на затлъстяване.

7.2 Приноси

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

8. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ

8.1. Публикации

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

³ Изследванията са по проекта НИРДИАБО (2015)

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

8.2. Участия в научни форуми

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

18. Pavlina Gateva, **Ludmil Lasarov**. The role of microbiome in diabetes, metabolic syndrome and obesity. 2017 International Workshop on “Metabolic diseases: genetics, epigenetics and proteomics” 16-20 May 2017 Sofia

9.ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов, Г. Повлияване на инсулинова резистентност с фармакологични и нефармакологични средства (дисертация) (2015)
2. Богданов, Ив. (1951). „I. Bogdanov patent strain tumoronecroticance B-51“ – АТСС 21815.
3. Бояджиева, Н. Влияние на нехормонални фармакологични средства върху ендокринни функции (дисертация, дмн) София, 1988.
4. Ламбев, Ив. Метформин в кн. *Selecta medicamentorum* – 2^{po} акт. изд., Сдружение "ПНР", София, 2015, 85-86, 421, 833.
5. Ханджиева - Дърленска, Т. Грелин и затлъстяване: Механизми на фармакологична регулация (дисертация 2009).
6. Ханджиева - Дърленска, Т., Н. Бояджиева. *Затлъстяване: фармакотерапия и фармакогенетика*. Изд. РИК "Симел", София, 2007.
7. Abizaid A., Gao Q., Horvath T. L. (2006). Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. *Neuron* 51 691–702.
8. Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World J. Diabetes*. 2013;4:114–123.
9. Alison Abbott for Nature News. Scientists bust myth that our bodies have more bacteria than human cells. Jan 8 2016.
10. American Academy of Microbiology FAQ: Human Microbiome January 2014.
11. American Diabetes, Association, Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012, *Diabetes Care* 36 2013.
12. Anderson JW, Konz EC, Frederich RC, Wood CL. Long-term weight-loss maintenance: a meta-analysis of US studies. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:579–84

13. Andersson B., Marin P., Lissner L., Vermeulen A., Bjorntorp P Testosterone concentrations in women and men with NIDDM. *Diabetes Care*. 1994; 17: 405–411.
14. Apfelbaum M, Vague P, Ziegler O, Hanotin C, Thomas F, Leutenegger E. Long-term maintenance of weight loss after a very-low-calorie diet: a randomized blinded trial of the efficacy and tolerability of sibutramine. *Am J Med* 1999; 106:179–84.
15. Aristides V, Rayaz A M , *Diabetic Neuropathy, Clinical Management* 2007.
16. Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:15718–15723
17. Basaria S., Muller DC, Carducci MA, Egan J., Dobs AS. Hyperglycemia and insulin resistance in men with prostate carcinoma who receive androgen-deprivation therapy. *Cancer*. 2006; 106: 581–588.
18. Basciano, H., Federico, L. & Adeli, Khosrow, 2005. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism*, 2(1), p.5.
19. Basterfield L, Mathers JC. Intestinal tumours, colonic butyrate and sleep in exercised Min mice. *Br J Nutr* 2010; 104:355–363.
20. Beck B, Pourie G. Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the hippocampus: role in learning and memory. *Nutr Rev*. 2013; 71:541–561.
21. Bender SB, Herrick EK, Lott ND, Klabunde RE. Diet-induced obesity and diabetes reduce coronary responses to nitric oxide due to reduced bioavailability in isolated mouse hearts. *Diabetes Obes Metab*. 2007; 9:688–696.

22. Benitez A., Diaz J Perez. Effect of streptozotocin-diabetes and insulin treatment on regulation of Leydig cell function in the rat. *Horm Metab Res.* 1985; 17: 5–7.
23. Billington CJ, Briggs JE, Harker S, Grace M, Levine AS. Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol.* 1994; 266:R1765–1770.
24. Bond DS, Phelan S, Leahey TM, Hill JO, Wing RR. Weight-loss maintenance in successful weight losers: surgical vs non-surgical methods. *Int J Obes (Lond)* 2009; 33:173–80.
25. Borg P, Kukkonen-Harjula K, Fogelholm M, Pasanen M. Effects of walking or resistance training on weight loss maintenance in obese, middle-aged men: a randomized trial. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; 26(5):676–83
26. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Bostrom EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Hojlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012; 481:463–468.
27. Boyanov MA, Boneva Z., Christov VG. Testosterone supplementation in men with type 2 diabetes, visceral obesity and partial androgen deficiency. *Aging Male.* 2003;6: 1–7.
28. Braniste V., Al-Asmakh M., Kowal C., Anuar F., Abbaspour A., Toth M., et al. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci. Transl. Med.* 6:263ra158
29. Bray GA, Tartaglia LA. Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature.* 2000; 404:672–677.
30. Brooks RV. "Androgens". *Clinics in Endocrinology and Metabolism* (Nov 1975) 4 (3): 503–20.

31. Campbell IW. Metformin – life begins at 50: A symposium held on the occasion of the 43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Amsterdam, The Netherlands, September 2007, The British Journal of Diabetes & Vascular Disease (2007) 7 (247–252).
32. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1761–1772.
33. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ (July 2005). "A review of the multiple actions of melatonin on the immune system". *Endocrine*. **27** (2): 189–200.
34. Chess DJ, Stanley WC. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovasc Res* 2008; 79:269–278.
35. Claessens M, van Baak MA, Monsheimer S, Saris WH. The effect of a low-fat, high-protein or high-carbohydrate ad libitum diet on weight loss maintenance and metabolic risk factors. *Int J Obes (Lond)* 2009; 33:296–304.
36. Colman E. Dinitrophenol and obesity: an early twentieth-century regulatory dilemma. *Regul Toxicol Pharmacol: RTP*. 2007; 48:115–117.
37. Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 1981; 22:763–779.
38. Currie CJ, Poole CD, Evans M, Peters JR, Morgan CL. Mortality and other important diabetes-related outcomes with insulin vs other antihyperglycemic therapies in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 668–677.
39. Cutting WC, Rytand DA, Tainter ML. Relationship between Blood Cholesterol and Increased Metabolism from Dinitrophenol and Thyroid. *J Clin Invest*. 1934; 13:547–552.
40. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR.

- Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009; 360:1509–1517.
41. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, et al.; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 227 million participants. *Lancet* 2011; 378:31–40.
 42. Davidkova G, Popova P, Guencheva G, Bogdanov A, Pacelli E, Auteri A, Mincheva V. Endogenous production of tumor necrosis factor in normal mice orally treated with Deodan--a preparation from *Lactobacillus bulgaricus* "LB51". 1992; Nov;14(8):1355-62.
 43. DeFrancesco M, Liebaert J, Kemmler G, et al. Psychosocial state after bariatric surgery is associated with the serotonin-transporter promoter polymorphism. *Eat Weight Disord* 2013; 18:311–316.
 44. Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J Nutr.* 2007; 137:2547S–2551S.
 45. Despres JP. Potential contribution of metformin to the management of cardiovascular disease risk in patients with abdominal obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes, *Diabetes Metab* (2003) 29 (53–61).
 46. Ding EL, Song Y., Malik VS, Liu S Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2006; 295: 1288–1299.
 47. Dockery F., Bulpitt CJ, Agarwal S., Donaldson M., Rajkumar C Testosterone suppression in men with prostate cancer leads to an increase in arterial stiffness and hyperinsulinaemia. *Clin Sci.* 2003; 104: 195–201.

48. Dominguez H, et al. Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. *J Vasc Res.* 2005; 42(6):517–525.
49. Due A, Larsen TM, Mu H, Hermansen K, Stender S, Astrup A. Comparison of 3 ad libitum diets for weight-loss maintenance, risk of cardiovascular disease, and diabetes: a 6-mo randomized, controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:1232–41
50. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:1073–1078
51. Eizaguirre I, Aldazabal P, Urkia NG, Asensio A, Arenzaxana JM. *Escherichia coli* translocation in experimental short bowel syndrome: probiotic supplementation and detection by polymerase chain reaction. *Pediatr Surg Int.* 2011 Jul 12.
52. El Messaoudi S, Rongen GA, de Boer RA, Riksen NP, *Curr Opin Lipidol* 2011.
53. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:121–131
54. Flowering Plants of the Santa Monica Mountains, Nancy Dale, 2nd Ed., 2000, p. 200
55. Fogelholm M, Kukkonen-Harjula K, Nenonen A, Pasanen M. Effects of walking training on weight maintenance after a very-low-energy diet in premenopausal obese women: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2000; 160:2177–84
56. Fukui M., Soh J., Tanaka M., Kitagawa Y., Hasegawa G., Yoshikawa T., Miki T., Nakamura N Low serum testosterone concentration in middle-aged men with type 2 diabetes. *Endocr J.* 2007; 54: 871–877.

57. Furet J-P, Kong L-C, Tap J, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 2010; 59:3049–3057.
58. Gill RK, Kumar A, Malhotra P, et al. Regulation of intestinal serotonin transporter expression via epigenetic mechanisms: role of HDAC2. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304:C334–C341
59. Glucophage Label and Approval History, U.S. Food and Drug Administration 2007.
60. Green R, Kinsella LJ, Current concepts in the diagnosis of cobalamin deficiency, *Neurology* 45 1995.
61. Gripeteg L, Torgerson J, Karlsson J, Lindroos AK. Prolonged refeeding improves weight maintenance after weight loss with very-low-energy diets. *Br J Nutr* 2010; 103:141–8.
62. Grossman M., Thomas MC, Panagiotopoulos S., Sharpe K., Macisaac RJ, Clark S., Zajac JD, Jerums G Low testosterone levels are common and associated with insulin resistance in men with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(5): 1834–1840.
63. Gruber HJ, Mayer C, Mangge H, Fauler G, Grandits N, Wilders-Truschnig M. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. *Int J Obes.* 2008; 32:826–831.
64. Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics. Eds. Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Bjorn C. Knollmann). 12. ed. New York: McGraw-Hill, 2011.
65. Guerciolini R. Mode of action of orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997; 21(Suppl 3):S12–23.
66. Guo C, Zhang L. Cholesterol-lowering effects of probiotics – a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2010 Dec 4; 50(12):1590-9.

67. Haffner SM, Miettinen H., Karhapä P., Mykkänen L., Laakso M Leptin concentrations, sex hormones, and cortisol in nondiabetic men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 1807–1809.
68. Håkonsen LB, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Olsen J, Bonde JP, Andersen CY, Bungum M, Ernst EH, Hansen ML, Ernst EH, Ramlau-Hansen CH. "Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men". *Reproductive Health* (2011) 8 (1): 24.
69. Harper ME, Green K, Brand MD. The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity. *Annu Rev Nutr.* 2008; 28:13–33.
70. Haslam DW, James WP. "Obesity". *Lancet (Review)* (2005) 366 (9492): 1197–209.
71. Haub S, Kanuri G, Volynets V, Brune T, Bischoff SC, Bergheim I. Serotonin reuptake transporter (SERT) plays a critical role in the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298:G335–G344.
72. Hemmer B, Glocker FX, Schumacher M, Subacute combined degeneration: clinical electrophysiological, and magnetic resonance imaging findings, *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* (1998) 65 (822-827).
73. Hemmingsson E, Johansson K, Eriksson J, Sundstrom J, Neovius M, Marcus C. Weight loss and dropout during a commercial weight-loss program including a very-low-calorie diet, a low-calorie diet, or restricted normal food: observational cohort study. *Am J Clin Nutr* 2012; 96:953–61.
74. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Chayama K, Oshima T. Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2001; 14:1038–1045.

75. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* 2009; 137:1716–1724.e1–2.
76. Hotamisligil GS, et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995; 95(5):2409–2415.
77. Hotta K, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(6):1595–1599.
78. Huang W, et al. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes.* 2010; 59(2):347–357.
79. Hutson JC, Stocco DM, Campbell GT, Wagoner J Sertoli cell function in diabetic, insulin-treated diabetic, and semi-starved rats. *Diabetes.* 1983; 32: 112–116.
80. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, et al, ; American Diabetes Association (ADA), ; European Association for the Study of Diabetes (EASD). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2012; 35:1364–1379.
81. Johnson JA, Majumdar SR, Simpson SH, Toth EL: Decreased mortality associated with the use of metformin compared with sulfonylurea monotherapy in type 2 diabetes, *Diabetes Care* (2002) 25 (2244–2248).
82. Judah L. Rosner for *Microbe Magazine*, Feb 2014. Ten Times More Microbial Cells than Body Cells in Humans?
83. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* 2014; 383:1068–1083.

84. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 2013; 498:99–103.
85. Kiessling G, Schneider J, Jahreis G. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56(9):843-9.
86. Kim F, Pham M, Maloney E, Rizzo NO, Morton GJ, Wisse BE, Kirk EA, Chait A, Schwartz MW. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:1982–1988.
87. Klem ML, Wing RR, McGuire MT, Seagle HM, Hill JO. A descriptive study of individuals successful at long-term maintenance of substantial weight loss. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:239–46.
88. Kondo S, Xiao JZ, Satoh T, et al. Antiobesity effects of *Bifidobacterium breve* strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Biosci Biotechnol Biochem*; 74(8):1656-61.
89. Koopman KE, Booij J, Fliers E, Serlie MJ, la Fleur SE. Diet-induced changes in the lean brain: hypercaloric high-fat-high-sugar snacking decreases serotonin transporters in the human hypothalamic region. *Mol Metab* 2013; 2:417–422.
90. Kootte RS, Vrieze A, Holleman F, et al. The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2012; 14:112–120.
91. Kopecky J, Rossmeisl M, Hodny Z, Syrový I, Horáková M, Kolarová P. Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: mechanism and adipose tissue morphology. *Am J Physiol.* 1996; 270:E776–786.
92. Kovacs EM, Lejeune MP, Nijs I, Westerterp-Plantenga MS. Effects of green tea on weight maintenance after body-weight loss. *Br J Nutr* 2004; 91:431–7.

93. Kozak LP, Harper ME. Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure. *Annu Rev Nutr.*2000; 20:339–363.
94. Kumar R, Grover S, Batish VK. Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague-Dawley rats. *Br J Nutr.* 2011 Feb; 105(4):561-73.
95. Kursawe R, et al. Cellularity and adipogenic profile of the abdominal subcutaneous adipose tissue from obese adolescents: association with insulin resistance and hepatic steatosis. *Diabetes.* 2010; 59(9):2288–2296.
96. Labbé SM, Grenier-Larouche T, Noll C, et al. Increased myocardial uptake of dietary fatty acids linked to cardiac dysfunction in glucose-intolerant humans. *Diabetes* 2012; 61:2701–2710.
97. Lalau JD, Lacroix C, Compagnon P, Role of metformin accumulation in metformin-associated lactic acidosis, *Diabetes Care* 1995.
98. Larsen CM, et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *New Engl J Med.* 2007; 356(15):1517–1526.
99. Larsen TM, Dalskov SM, van Baak M, Jebb SA, Papadaki A, Pfeiffer AF, Martinez JA, Handjieva-Darlenska T, Kunesova M, Pihlsgard M, et al. Diets with high or low protein content and glycemic index for weight-loss maintenance. *N Engl J Med* 2010; 363:2102–13
100. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 2010; 330:1768–1773.
101. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:11070–11075.
102. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444:1022–1023.

103. Li B, Nolte LA, Ju JS, Han DH, Coleman T, Holloszy JO, Semenkovich CF. Skeletal muscle respiratory uncoupling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Nat Med*. 2000; 6:1115–1120.
104. Liong MT SN. Acid and bile tolerance and the cholesterol removal ability of bifidobacteria strains. *Biosci Micro* 2005; 24:1-10.
105. Liou AP, Paziuk M, Luevano J-M, Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med* 2013; 5:178ra41.
106. Lowell BB, Flier JS. Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annu Rev Med*.1997; 48:307–316.
107. Lumeng CN, et al. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes*. 2008; 57(12):3239–3246.
108. Lye HS, Kuan CY, Ewe JA, Fung WY, Liong MT. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *Int J Mol Sci* 2009; 10(9):3755-75.
109. Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol* 2008; 49(5):821-30.
110. Malek M, Aghili R, Emami Z, Khamseh, Risk of Cancer in Diabetes: The Effect of Metformin. *ISRN endocrinology* 2013
111. Mann GV. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am J Clin Nutr* 1974; 27(5):464-9.
112. Marin P., Holmang S., Jonsson L., Sjostrom L., Kvist H., Holm G., Lindstedt G., Bjorntorp P The effects of testosterone treatment on body composition and metabolism in middle-aged obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1992; 16: 991–997.

113. Marin P., Lonn L., Andersson B., Oden B., Olbe L., Bengtsson BA, Bjorntorp P Assimilation of triglycerides in subcutaneous and intraabdominal adipose tissues in vivo in men: effects of testosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 1018–1022.
114. Marin P Testosterone and regional fat distribution. *Obes Res.* 1995; 3(suppl 4): S609–S612.
115. Mathers CD, Loncar D, Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030, *PLoS Med* 2006.
116. McMullan CJ, Schernhammer ES, Forman JP. *JAMA.* 2013 Aug 7;310(5)
117. Mellbin LG, Malmberg K, Norhammar A, Wedel H, Rydén L; DIGAMI 2 Investigators. Prognostic implications of glucose-lowering treatment in patients with acute myocardial infarction and diabetes: experiences from an extended follow-up of the Diabetes Mellitus Insulin-Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction (DIGAMI) 2 Study. *Diabetologia* 2011; 54:1308–1317.
118. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. "Biological actions of androgens". *Endocrine Reviews* 8 (Feb 1987) (1): 1–28.
119. Morton G. J., Cummings D. E., Baskin D. G., Barsh G. S., Schwartz M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443 289–295.
120. Murphy K. G., Bloom S. R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444 854–859.
121. Nathan D., Buse J., Davidson M, Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes, *Diabetologia* 49(2006) (1711-1721).

122. Neychev VK, Mitev VI (Oct 2005). "The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men".
123. NIH Human Microbiome Project defines normal bacterial makeup of the body". NIH News. 13 June 2012.
124. Nishiyama T., Ishizaki F., Anraku T., Shimura H., Takahashi K. The influence of androgen deprivation therapy on metabolism in patients with prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 657–660.
125. Nolan CJ, Prentki M. The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19:285–291
126. O’Connell J, et al. The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity. *PLoS One.* 2010; 5(4):e9997.
127. Oh JY, Barrett-Connor E., Wedick NM, Wingard DL, Bernardo Rancho Study. Endogenous sex hormones and the development of type 2 diabetes in older men and women; the Rancho Bernardo study. *Diabetes Care.* 2002; 25: 55–60.
128. Osuna JA, Gomez-Perez R., Arata-Bellabarba G., Villaroel V Relationship between BMI, total testosterone, sex hormone-binding-globulin, leptin, insulin and insulin resistance in obese men. *Arch Androl.* 2006; 52: 355–361.
129. Pagotto U., Gambineri A., Pelusi C., Genghini S., Cacciari M., Otto B., Castaneda T., Tschop M., Pasquali R Testosterone replacement therapy restores normal ghrelin in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 4139–4143.
130. Palermo A, Maggi D, Maurizi AR, Pozzilli P, Buzzetti R. Prevention of type 2 diabetes mellitus: is it feasible? *Diabetes Metab Res Rev* 2014; 30(Suppl. 1):4–12.

131. Peschke E, Mühlbauer E. New evidence for a role of melatonin in glucose regulation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24(5):829-841
132. Pitteloud N., Hardin M., Dwyer AA, Valassi E., Yialamas M., Elahi D., Hayes FJ. Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005a;90: 2636–2641.
133. Pollack, Andrew (June 18, 2013). "A.M.A. Recognizes Obesity as a Disease". *New York Times*. Archived from the original on June 18, 2013.
134. Prentki M, Corkey BE. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 1996;45:273–283.
135. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490:55–60.
136. Quigley EM. Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2011 Oct 11.
137. Quigley, EM (Sep 2013). "Gut bacteria in health and disease". *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 9 (9): 560–9.
138. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;1:785–789.
139. Rasoamanana R., Darcel N., Fromentin G., Tome D. (2012). Nutrient sensing and signalling by the gut. *Proc. Nutr. Soc.* 71 446–455.
140. Ratner C, Ettrup A, Bueter M, et al. Cerebral markers of the serotonergic system in rat models of obesity and after Roux-en-Y gastric bypass. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20:2133–2141.
141. Rhoden EL, Ribeiro EP, Riedner CE, Teloken C., Souto CA. Glycosylated haemoglobin levels and the severity of erectile function in diabetic men. *BJU Int.* 2005b; 95: 615–617.

142. Riddle MC, Ambrosius WT, Brillon DJ, et al. ; Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Investigators. Epidemiologic relationships between A1C and all-cause mortality during a median 3.4-year follow-up of glyceimic treatment in the ACCORD trial. *Diabetes Care* 2010;33:983–990.
143. Rodbard HW, Jellinger PS, Davidson JA, Statement by an American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology consensus panel on type 2 diabetes mellitus: an algorithm for glyceimic control, *Endocr Pract.* 15 (2009)(540-559).
144. Romanova IV, Ramos EJB, Xu Y, et al. Neurobiologic changes in the hypothalamus associated with weight loss after gastric bypass. *J Am Coll Surg* 2004; 199:887–895.
145. Rothwell NJ, Stock MJ. Luxuskonsumtion, diet-induced thermogenesis and brown fat: the case in favour. *Clin Sci (Lond)* 1983; 64:19–23.
146. Rytting KR, Flaten H, Rossner S. Long-term effects of a very low calorie diet (Nutrilett) in obesity treatment. A prospective, randomized, comparison between VLCD and a hypocaloric diet+behavior modification and their combination. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21(7):574–9.
147. Rytting KR, Rossner S. Weight maintenance after a very low calorie diet (VLCD) weight reduction period and the effects of VLCD supplementation. A prospective, randomized, comparative, controlled long-term trial. *J Intern Med* 1995; 238:299–306.
148. Saleh N, Petursson P, Lagerqvist B, et al. Long-term mortality in patients with type 2 diabetes undergoing coronary angiography: the impact of glucose-lowering treatment. *Diabetologia* 2012; 55:2109–2117.
149. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:2992–3002.

150. Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* 1994; 35(Suppl.):S35–S38.
151. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000; 404:661–671.
152. Schwiertz A, Taras D, Schäfer K, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18:190–195.
153. Selvin E., Feinleib M., Zhang L., Rohrmann S., Rifai N., Nelson W., Dobs A., Basaria S., Golden S., Platz E Androgens and diabetes in men. *Diabetes Care*. 2007; 30: 234–238.
154. Sender, R; Fuchs, S; Milo, R (Jan 2016). "Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans". *Cell*. 164 (3): 337–40.
155. Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19:269–284.
156. Shanahan F. The colonic microflora and probiotic therapy in health and disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011 Jan; 27(1):61-5.
157. Sherwood, Linda; Willey, Joanne; Woolverton, Christopher (2013). *Prescott's Microbiology (9th ed.)*. New York: McGraw Hill. 713–721.
158. Shores MM, Matsumoto AM, Sloan KL, Kivlahan DR. Low serum testosterone and mortality in male veterans. *Arch Intern Med*. 2006; 166: 1660–1665.
159. Simansky KJ. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res* 1996; 73:37–42
160. Simon D., Charles MA, Nahoul K., Orssaud G., Kremiski J., Hully V., Joubert E., Papoz L., Eschwege E Association between plasma total

- testosterone and cardiovascular risk factors in healthy adult men: the Telecom Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:682–685.
161. Sjöström L, Lindroos A-K, Peltonen M, et al.; Swedish Obese Subjects Study Scientific Group. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004; 351:2683–2693.
162. Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, et al.; Swedish Obese Subjects Study. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 2007; 357:741–752.
163. Smits LP, Bouter KEC, de Vos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology* 2013;145:946–953
164. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001; 104:531–543.
165. Stang M, Wysowski D K, Butler-Jones D, Incidence of lactic acidosis in metformin users *Diabetes Care* 22(1999) (925–927).
166. Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides.* 1986; 7:1189–1192.
167. Stanley TL, et al. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(1):E146–E150.
168. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005; 85:1093–1129.
169. Stellato RK, Feldman HA, Hamdy O., Horton ES, McKinlay JB. Testosterone, sex hormone-binding globulin, and the development of

- type 2 diabetes in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Diabetes Care*. 2000; 23:490–494.
170. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE, Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus, *N Engl J Med* (333) 1995.
171. Suzuki K, Simpson KA, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J*. 2010; 57:359–372.
172. Swerdloff RS, Wang C, Bhasin S. "Developments in the control of testicular function". *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism* 6 (Apr 1992) (2): 451–83.
173. Tainter ML, Cutting WC, Stockton AB. Use of Dinitrophenol in Nutritional Disorders : A Critical Survey of Clinical Results. *Am J Public Health Nations Health*. 1934; 24:1045–1053.
174. Thorburn, A.W. et al., Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 49(6), 1989 1155-63.
175. Tomkin GH, Malabsorption of vitamin B12 in diabetic patients treated with phenformin: a comparison with metformin, *Br Med J*. 3(1973) (673-675).
176. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012; 489:242–249
177. Tsai AG, Wadden TA. The evolution of very-low-calorie diets: an update and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14:1283–93.
178. Tuomi T, Santoro N, Caprio S, Cai M, Weng J, Groop L. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet* 2014; 383:1084–1094.

179. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2008; 3:213–223.
180. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444:1027–1031.
181. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998; 352:854–865.
182. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013; 368:407–415.
183. Varma V, et al. Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296(6):E1300–E1310.
184. Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 235:79–82.
185. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.*2009; 360:1518–1525.
186. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012; 143:913–916.e7.
187. Vrieze A., Holleman F., Zoetendal E. G., de Vos W. M., Hoekstra J. B. L., Nieuwdorp M. (2010). The environment within: how gut

- microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia* 53 606–613.
188. Wadden TA, Fujioka K, Toubro S, Gantz I, Erondy NE, Chen M, Suryawanshi S, Carofano W, Johnson-Levonas AO, Shapiro DR, et al. A randomized trial of lifestyle modification and taranabant for maintaining weight loss achieved with a low-calorie diet. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18:2301–10.
189. Waterman MR, Keeney DS. "Genes involved in androgen biosynthesis and the male phenotype". *Hormone Research* 38(1992) (5-6): 217–21.
190. Weinstock, Matthew (June 21, 2013). "The Facts About Obesity". H&HN. American Hospital Association. Retrieved June 24, 2013.
191. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115:1111–1119.
192. Weng J, Li Y, Xu W, et al. Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group trial. *Lancet* 2008; 371:1753–1760.
193. Werner E, Bell J, The preparation of methylguanidine, and of $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyanodiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively, *J Chem Soc* 121(1921) (1790-5).
194. Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP, Nijs I, van Ooijen M, Kovacs EM. High protein intake sustains weight maintenance after body weight loss in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28(1):57–64.
195. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:3698–3703.

196. Wikstrand I, Torgerson J, Bostrom KB. Very low calorie diet (VLCD) followed by a randomized trial of corset treatment for obesity in primary care. *Scand J Prim Health Care* 2010; 28:89–94.
197. Wing RR, Bolin P, Brancati FL, et al, .; Look AHEAD Research Group. Cardiovascular effects of intensive lifestyle intervention in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2013; 369:145–154.
198. Won Y-J, Lu VB, Puhl HL 3rd, Ikeda SR. b-Hydroxybutyrate modulates N-type calcium channels in rat sympathetic neurons by acting as an agonist for the G-protein-coupled receptor FFA3. *J Neurosci* 2013; 33:19314–19325.
199. World Health Organization, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus 1999.
200. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334:105–108.
201. Yamada T, Inui A, Hayashi N, Fujimura M, Fujimiya M. Serotonin stimulates endotoxin translocation via 5-HT₃ receptors in the rat ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284:G782–G788.
202. Yannucci J., Manola J., Garnick MB, Bhat G., Bublely GJ. The effect of androgen deprivation therapy on fasting serum lipid and glucose parameters. *J Urol.* 2006;176: 520–525.
203. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells, *Cancer Res* 66 (2006) 10269-10273.
204. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:2365–2370.
205. Zhu H, Huang Q, Xu H, Niu L, Zhou J-N. Antidepressant-like effects of sodium butyrate in combination with estrogen in rat forced swimming

- test: involvement of 5-HT(1A) receptors. *Behav Brain Res* 2009; 196:200–206.
206. Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C, Young HA. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett.* (2011 Oct 28); 309(2):119-27.
207. Zib I, Jacob AN, Lingvay I, et al. Effect of pioglitazone therapy on myocardial and hepatic steatosis in insulin-treated patients with type 2 diabetes. *J Investig Med* 2007; 55:230–236.
208. Zouboulis CC, Degitz K. "Androgen action on human skin -- from basic research to clinical significance". *Experimental Dermatology.* (2004) 13 Suppl 4 (s4): 5–10.

10. SUMMARY

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

Insulin resistance is a condition where cells decrease their sensitivity to insulin action. Insulin decreases its activity, less glucose is absorbed by the cells of the body and much glucose accumulates in the blood. Insulin resistance is almost always considered a pathological process and is at the heart of Type 2 diabetes mellitus. Regulation of insulin sensitivity is part of the metabolic physiology. 24-hour, seasonal, age-related, pregnancy, etc. Fluctuations in nutrient intake require homeostatic flexibility, including a change in insulin sensitivity, so as to optimize the supply of nutrients in different tissues.

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

with probiotics to reduce the risk of diabetes. Our data suggest that good nutrition components from the diet together with probiotic have beneficial effect on individuals with obesity.

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

An important element of T2DM prophylaxis is to provide a nutritionally correct regimen in combination with physical activity to suppress the development of this socially significant disease already in the pre-diabetic phase. This study has documented new facts about the role of the individual genome in the development of pre-diabetes in people with obesity. It has been documented polymorphism in Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPARG) in volunteers. Analyzed 224 patients showed genotypic and allelic distribution in patients with high BMI Genotype and allelic distributions in patients with high BMI (CC: 82,6% CG: 16,4%, GG: 1%), and in patients with normal BMI (CC: 86%, CG: 13%, GG: 1%). The analysis of these results indicates a lack of statistical significance between the two study groups. Considering the role of the PPARG gene in the development of the Type 2 diabetes, it can be concluded that this gene is not associated with the development of pre-diabetes in a population of Bulgarians with obesity, which distinguishes the Bulgarian population from other European populations.