

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

на тема

„Фармакологични и нефармакологични подходи за повлияване на апетита и затлъстяването“

за присъждане на научна степен

„доктор на науките“

на

доц. д-р Теодора Ханджиева-Дърленска, дм

Използвани съкращения и символи:

Агути свързания пептин, AGRP

Висцерална мастна маса, ВММ

Глюкагон подобен пептид – 1, glucagon like peptide-1, GLP – 1

Глюкозозависим инсулинотропен полипептид, ГИП

Захарен диабет тип 2, ЗДТ2

Индекс на телесна маса, ИТМ

Инсулинова резистентност, ИР

Клинико-изследователски ден, clinical investigation day, CID

Мастна маса, ММ

Нарушена гликемия на гладно, НГГ

Нарушен глюкозен толеранс, НГТ

Невропептин Y, neuropeptide Y, NPY

Орално-глюкозен толерантен тест, ОГТТ

Панкреатичен полипептид, ПП

Паравентрикулярното ядро, paraventricular nucleus, PVN

Про-опиомеланокортин, проорпиомеланокортин, РОМС

Световна Здравна Организация, СЗО

Тиреостимулиращ хормон, Thyroid-stimulating hormone, TSH

Тумор некротизиращ фактор α , TNF-alfa

Холецистокинин, cholecystokinin, ССК

Централна нервна система, ЦНС

Adiposity-based chronic disease, ABCD

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

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Кратка история на затлъстяването

Артефакти, свързани със затлъстяването съществуват от повече от 30,000 години от времето на Палеолита, демонстрирайки дългата история на затлъстяването (1). Селскостопанската революция, която започва преди 10,000 години въвежда нови хранителни модели. Въпреки това, затлъстяването се развива независимо от хранителния режим или план и независимо от културата или етноса. Така се установява, че не съществува определена храна или хранителен модел, който да довежда до затлъстяване. Затлъстяването се е срещало по-често при жените в сравнение с мъжете. Също така, по-често се е срещало във времена на просперитет и сред богатите хора. Хората, живеещи със затлъстяване, както и лечението на затлъстяването е добре описано през вековете (1). Диетата в съчетание с физическа активност са били опорната точка в лечението даже 2,500 години преди гърците (1). XVI-и век е бил векът на откритията, а за затлъстяването това са били първите дисекции на човешки тела със затлъстяване. XVII-и век може да бъде кръстен века на физиката. През този период кръвните клетки са открити и изследвани с микроскоп. Везните са били използвани за измерване на приема на храна. През XVIII-и век кислородът е открит и метаболизмът е представян като горяща свещ. С откриването на нови техники в биологията, химията и физиката, те веднага са били прилагани в изучаването на затлъстяването. През XIX-и век се създават законите на термодинамиката, кислородната теория и идеята за енергийния баланс като основа за развитие на затлъстяването. През този век се въвежда индекса на телесна маса (ИТМ) като връзка между теглото и височината, както и се публикува първата популярна книга с диети. През XX-и век се диференцират типовете затлъстяване, разгадават се мозъчните центрове, които контролират апетита и приема на храна, въвежда се поведенческата терапия като един от стълбовете в терапевтичните програми, развива се фармакотерапията и се въвежда оперативната терапия на затлъстяването (2). Концепцията, че съществуват много причини и типове затлъстяване бе доразвита с откритието за нараняването на хипоталамуса като причина за затлъстяването, както и че адреналната и хипофизарна хиперфункция могат да доведат до затлъстяване като част от синдрома на Кушинг (3, 4). XX-и век

е и векът на преминаването от старото към новото познание за биологията на затлъстяването чрез откритието на лептин през 1994 година (5). През последната декада се доказва, че редукцията на телесна маса увеличава продължителността на живота. XXI век ще допринесе за разрастване на разбиранията за затлъстяването чрез генетичните и епигенетичните изследвания. За да разберем, защо някои хора никога не напълняват, докато при други се случва, е необходимо да идентифицираме дълготрайните сигнали в регулацията на апетита, за да преодолеем хедонистичната оценка на храната.

Дефиниция и фактори за развитието на затлъстяването

Затлъстяването се характеризира с прекомерно натрупване на мастна тъкан, която се свързва с редица нарушения на здравето (6). Според Световната здравна организация (СЗО) затлъстяването е хронично заболяване, с висока заболеваемост както в развитите, така и в развиващите се страни и засяга както възрастни, така и деца (7). Европейската агенция по лекарствата определя затлъстяването като хронично клинично състояние, резултат от взаимодействие на генетични, метаболитни, поведенчески и фактори на средата, което се асоциира с повишена заболеваемост и смъртност (8). Други две международни институции - Световната федерация по затлъстяване и Европейската асоциация за изследване на затлъстяването дават следните определения: затлъстяването е хронично рецидивиращо заболяване, с прогресиращ ход; необходими са спешни мерки за превенция и контрола на тази глобална епидемия (6) и прогресивно заболяване, което влияе значимо върху индивида и обществото, тъй като е универсално прието, че затлъстяването отваря врата за множество други заболявания (9). Американската асоциация на клиничните ендокринолози и Европейската асоциация за изследване на затлъстяването въведоха прецизен клиничен и диагностичен термин за затлъстяването - адипоцитно-базирано хронично заболяване (от англ. Adiposity-based chronic disease, ABCD) (10, 11).

Затлъстяването е мултифакторно заболяване, което се свързва с генетични, епигенетични, физиологични, поведенчески, социално-културни и фактори на околната среда, които водят до нарушение в баланса между енергийния прием и енергийния разход в продължение на дълъг период от време. Значението на по-

малката продължителност на съня, ендокринните нарушители като някои химически съединения в опаковките за храни и в храните, спирането на тютюнопушенето, повишаването на теглото, свързано с приема на медикаменти, които го повишават, по-напредналата възраст за майчинство, вътреутробните и между поколенията фактори допринасят за епидемията от затлъстяване (12, 13).

Данните от изследванията сред семейства и близнаци демонстрират ключовата роля на генетичните фактори в предразположеността към затлъстяване. Скоросен мета-анализ на резултати от 88 независими изследвания сред близнаци и 27 изследвания сред семейства, установява, че генетичните фактори обясняват между 24% и 90% в интра-индивидуалните вариации в ИТМ (14). Въпреки голямата хетерогенност на резултатите от тези проучвания, те дават точни доказателства за приноса на гените за предразположението към затлъстяване. В последните години се проучват голям брой кандидат гени за предразположеност към затлъстяване в големи кохорти ($n > 5000$), понякога последвани от мета-анализ на всички съществуващи данни. Проучванията показаха ясна връзка между характеристики на затлъстяването и следните гени и варианти в меланокортин 4 рецептора (MC4R), бета-3 адренергичния рецептор (ADRB3), про-протеин конвертаза субтилизин/кексин тип 1 (PCSK1), мозъчния невротропен фактор (BDNF), лактазата (LCT), мелатонин нуклеотид пирофосфатаза/ фосфодиестераза 1 (ENPP1), фибробластен растежен фактор рецептор 1 (FGFR1) и лептиновия рецептор (LEPR) (15-24).

Затлъстяването намалява продължителността на живота (25) и повлиява функцията на много органи и системи (25-27). Установено е, че с увеличаване на индекса на телесна маса (ИТМ) се увеличава смъртността от заболявания като диабет, хронично бъбречно заболяване, стомашно-чревни заболявания и сърдечно-съдови заболявания (27). Често поддържането на първоначалната редукция на теглото е трудно или неуспешно (28). Физиологичните отговори, които се задействат след редукцията на теглото, отключват механизми за обратния процес на покачване на теглото (29-32). Загубата на тегло при хора със затлъстяване води до промени в хормоните, които регулират апетита (30). Наблюдава се намаляване на плазмените нива на лептин, холецистокинин, пептид YY, глюкагон подобния пептид 1, инсулин и увеличени нива на грелин, панкреатичния полипептид и

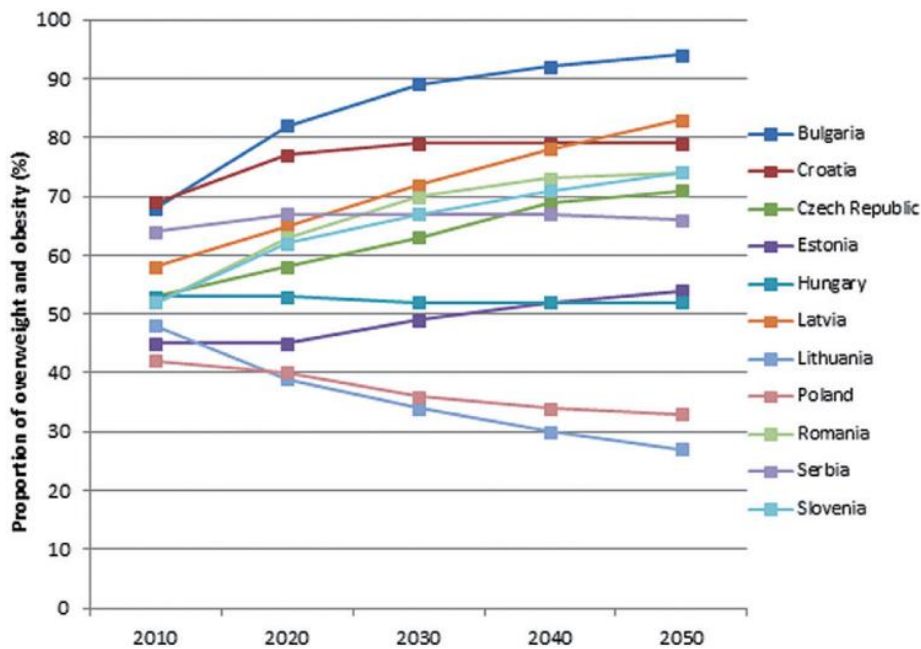
увеличено чувство на глад и желание за прием на храна дори и една година след първоначалната редукция (30).

Разпространение на затлъстяването

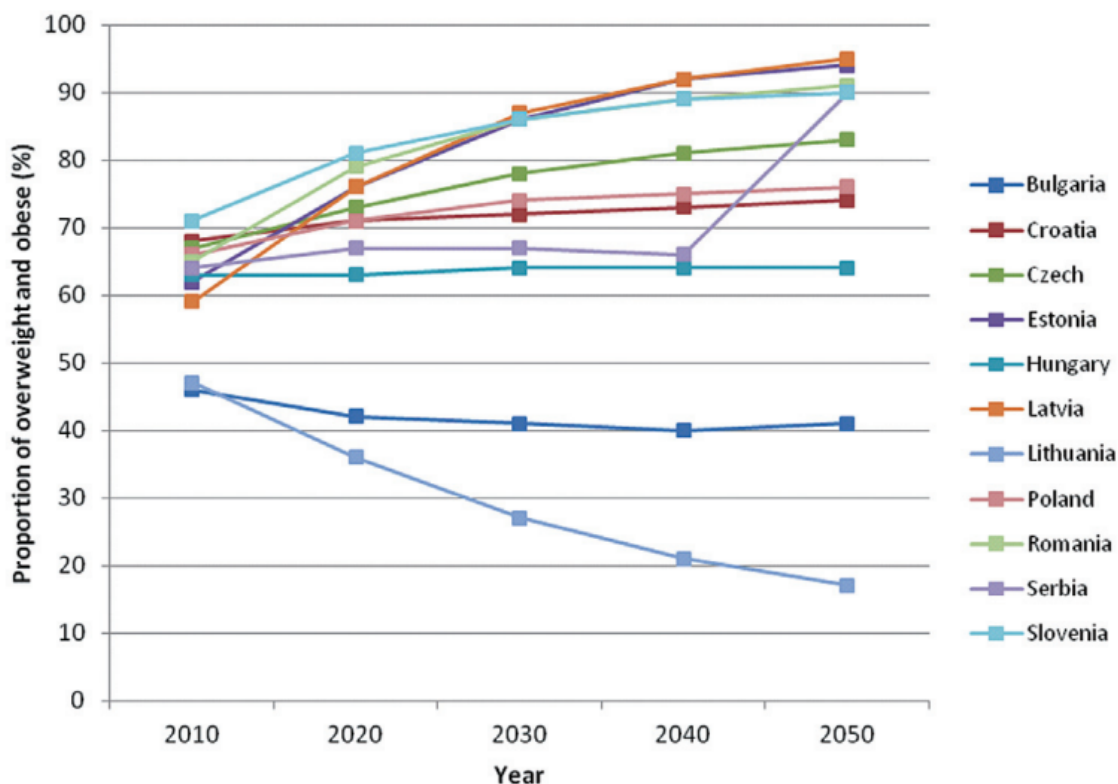
През последните две-три десетилетия прехранването и затлъстяването се превърнаха от малък обществен проблем, засягащ най-заможните общества до сериозна заплаха за общественото здраве по света. Тежката ситуация в Северна Америка, Австралия и Европа е добре документирана в литературата. Въпреки това, нарастващото разпространение на затлъстяването в други части на света все още е не добре описано. Преди 25 години затлъстяването в развиващите се страни се считаше състояние, свързано с социално-икономическия елит. Monteiro и сътрудници (33) показват, че затлъстяването е свързано с ниския социално-икономически статус, особено при жените от страните с нисък-среден доход.

Изследванията през последното десетилетие установиха, че за оценка на разпространението на затлъстяването не е достатъчно точно да се използва само златният стандарт ИТМ, а е необходимо и да се оцени и абдоминалното разпределение на мастната тъкан. През 1998 година Американските национални здравни институти въведоха класификацията на ИТМ в комбинация с референтните стойности за обиколка на талията (34). Според тези препоръки комбинацията наднормено тегло (ИТМ между 25 и 30 кг/м²) и умерено затлъстяване (ИТМ между 30 и 35 кг/м²) с голяма обиколка на талията (≥ 102 см при мъжете и ≥ 88 см при жените) носи допълнителен здравен риск (34). Около 1.5 милиарда хора по света страдат от наднормено тегло, като 1/3 от тях са със затлъстяване (35). Според последните данни над 74% от мъжете и 65% от жените в САЩ страдат от наднормено тегло или затлъстяване (36). При жените по-често се среща затлъстяване, отколкото наднормено тегло. Doak и сътрудници (37) описват честотата на наднормено тегло и затлъстяване в Европа. Според данните по-възрастните хора между 60-64 годишна възраст показват постоянно по-висока честота на наднормено тегло/затлъстяване в сравнение с лицата на възраст между 25-49 години. Най-голямото разпространение се наблюдава във Великобритания, Източна Европа и Средиземноморския регион. В своето изследване Howel (38) демонстрира, че през 2006 година 30% от възрастното население на Великобритания страда от затлъстя-

ване. Webber и сътрудници (39) показват експоненциално нарастващата честота на затлъстяването в страните от Източна Европа. В своя анализ авторите представят очакваното разпространение на наднорменото тегло и затлъстяването ($\text{ИТМ} > 25 \text{ кг/ м}^2$) да надмине 80% при жените над 18 годишна възраст в България, Хърватска и Чехия до 2050 година (Фигура 1). При мъжете изключително висока честота ($>90\%$) се очаква в Латвия, Естония, Румъния и Сърбия (Фигура 2).



Фигура 1. Настояща и прогнозирана честота на разпространение на наднорменото тегло и затлъстяването ($\text{ИТМ} > 25 \text{ кг/ м}^2$) сред жените в Източна Европа до 2050 година.



Фигура. 2. Настояща и прогнозирана честота на разпространение на наднорменото тегло и затлъстяването (ИТМ >25 кг/ м²) сред мъжете в Източна Европа до 2050 година.

Колапсът на Съветския съюз и преминаването към свободна икономика в края на 80-те и началото на 90-те години в страните от Източна Европа доведе до чужди инвестиции, които са стимулиращи за икономиката, но и допринесе за въвеждането на Западния модел на хранене, характеризиращ се с диета, богата на мазнини и захар (40). Промяната в хранителните навици в съчетание с обездвижен начин на живот, психосоциални и фактори на околната среда доведоха до експоненциално нарастване на затлъстяването последващ бум на сърдечно-съдовите заболявания, захарния диабет тип 2 и други (41, 42).

Антропометрични измервания за оценка на затлъстяването

Ръст и Телесна маса

Lohman и сътр. (43) описват измерванията на ръста и телесното тегло в стандартни оперативни протоколи. Ръстът се измерва от разстоянието от върха на черепа до пода с фиксиран или преносим стадиометър. Пациентът е изправен, без обувки и е помолен да вдиша дълбоко. Телесната маса се измерва на гладно, с празен пикочен мехур, по бельо или друго леко облекло.

Обиколка на талията и на ханша

Обиколката на талията и ханша се измерва с точност до 0.5 cm със сантиметър, ако е възможно в изправено състояние (44). Талията се измерва по средата между долното ребро и илиачния гребен в края на издишването. Мерките се вземат сутрин на гладно и с празен пикочен мехур. Обиколката на ханша се измерва като най-голямата обиколка в областта около задната част на бедрата.

Индекс на телесна маса

Антропометричните измервания често се комбинират с цел по-добра оценка на общата мастна тъкан, както и на специфични мастни депа като висцерална мастна тъкан (във вътрешните органи), подкожна мастна тъкан, интрамускулна и други. Най-честият индекс за затлъстяване е индекса на телесна маса (ИТМ), който се измерва по следната формула - телесното тегло (кг)/ ръста (m^2). ИТМ е най-често използвания параметър в клиничната практика за оценка за затлъстяването (Таблица 1).

Таблица 1. Класификация на затлъстяването според Световната здравна организация (7)

Класификация	ИТМ (кг/м²)	Свързан здравен риск
Поднормено тегло	ИТМ < 18,5	Нисък (но рискът от други клинични проблеми се увеличава)
Нормално тегло	ИТМ 18,5-24,9	Среден
Наднормено тегло	ИТМ 25-29,9	Увеличен
Затлъстяване клас I (умерено затлъстяване)	ИТМ 30-35	Умерено увеличен
Затлъстяване клас II (тежко затлъстяване)	ИТМ 35-39,9	Много увеличен
Затлъстяване клас III (високостепенно – болестно затлъстяване)	ИТМ ≥ 40	Свръх увеличен
Свръх затлъстяване	ИТМ ≥ 50	Свръх увеличен
Свръх свръхзатлъстяване	ИТМ ≥ 60	Свръх увеличен

Съотношение талия-ханш и талия-ръст

Съотношението талия-ханш е друг често използван антропометричен показател в клиничната практика. Това съотношение показва относителното натрупване на мастна тъкан. Многобройни епидемиологични проучвания демонстрират връзката на съотношението талия-ханш с риска от сърдечно-съдови заболявания и преждевременната смъртност (45, 46). Въпреки това, съотношението талия-ханш не дава добра корелация с мастната тъкан, както е характерно за други параметри като ИТМ и обиколката на талията. Съществува и друг показател, който е съотношението талия-ръст, който също се свързва с сърдечно-съдов риск и преждевременна смъртност (46, 47). Този показател е от изключително значение като предиктор на усложненията на затлъстяването при деца и юноши, тъй като включва ръста и не е необходимо да се разглеждат референтни стойности, свързани с възрастта и пола.

Други антропометрични показатели за оценка на затлъстяването

В допълнение на вече представените показатели съществуват и други антропометрични маркери за оценка на затлъстяването и мастната тъкан. Примери за такива са соматичния тип, абдоминалният сагитален диаметър, телесният адипоцитен индекс, измерване на кожна гънка, които обаче не се използват вече в клиничната практика. Други методи за измерване на мастната тъкан, на свободната мастна тъкан, водно съдържание и др. са биоимпеданс, DEXA, ехографски техники като компютърна томография, магнитен резонанс и други подвидове.

Регулация на апетита и на енергийната обмяна

Енергийният баланс в организма представлява сложна хомеостична система. Въпреки че нарушенията в тази система могат да доведат до затлъстяване (48), широкото разпространение на това заболяване не е резултат от специфичен дефект, а се дължи на неспособността на тази система да се справя с повишения прием на висококалорична и вкусна храна и заседналият начин на живот. Енергийният внос се контролира от апетита и поведението при хранене, които са обект на централни и периферни механизми на регулация. Основните и най-важни мозъчни структури, които участват в регулацията на енергийната хомеостаза, са хипоталамусът и продълговатият мозък. Хипоталамусът и продълговатият мозък получават хормонални и невронални стимули, които изхождат от стомашно-чревния тракт, и носят информация за обема и състава на приетата храна на организма, както и сигнали от мастната тъкан за обема на мастната тъкан. **Nucleus arcuatus** е ключово място в хипоталамуса, където се осъществява интеграцията и обработката на сигналите от периферията за поддържане на енергийната хомеостаза. Основно два вида неврони се експресират в nucleus arcuatus:

➤ **Невропептид Y (NPY) и агути-свързания пептид (AGRP)** повишават апетита. NPY невроните се свързват с рецепторите тип 1 (Y1) и тип 5 (Y5), в следствие на което се **повишава приема на храна** ((49).

➤ **Про-опиомеланокортин (POMC)** използва **α -меланоцитния стимулиращ хормон (α MSH)**, за да осъществи ефектите си. α MSH се свързва с меланокортин 3 (MC3R) и меланокортин 4 (MC4R) рецепторите и **понижава апетита** (50).

Освен nucleus arcuatus в хипоталамуса има и други ядра, които участват в енергийната регулацията в организма. Счита се, че **паравентрикуларното ядро (PVN)** в хипоталамуса е ключово място на действие на тези пептиди. Паравентрикуларното ядро експресира меланокортин 3 (MC3R) и меланокортин 4 (MC4R) рецепторите и различни Y рецептори. Освен това в него се синтезират и секретират невропептиди, които имат ката болно действие като кортикотропин рилизинг хормона и окситоцин. Симпатиковата нервна система и мозъчната кора получават сигнали от паравентрикуларното ядро. Другата зона, която е в постоянна взаимовръзка с nucleus arcuatus и синтезира и секретира анаболни пептиди е **латералният хипоталамус**. Към него се включват меланин – концентриращият хормон (MCH) и орексините. Приложението на агонисти на рецепторите за MCH (51) или на орексините (52) причинява повишен прием на храна и напълняване. Хормоните на стомашно-чревния тракт сигнализират продълговатия мозък чрез nervus vagus. В продълговатия мозък се намират **nucleus solitarius, area postrema** и **дорзалното моторно ядро на nervus vagus**, които са свързани с регулацията на енергийната хомеостаза.

Периферна регулация на апетита и енергийната хомеостаза

Стомашно-чревният тракт е най-големият ендокринен орган в организма, който секретира повече от 20 различни регулаторни пептидни хормони, които оказват влияние върху редица физиологични процеси, тъкани и органи като жлезите с външна секреция, набраздената мускулатура и периферната нервна система. Повечето от тези хормони са чувствителни спрямо стомашното хранително съдържимо, както и изпълняват краткосрочна регулация на апетита (53). Тези хормони, както и други неврохормони, отделени от хипоталамуса са показани на таблица 2.

Таблица 2. Хипоталамични и стомашно-чревни хормони, които участват в регулацията на енергийната хомеостаза

Хормони/ пептиди с орексигенен ефект (повишават апетита)	Хормони/ пептиди с анорексигенен ефект (понижаващ апетита)
Грелин	Холецистокинин (ССК)
Орексин А и Б	Панкреатичен полипептид (PP)
Невропептид Y(NPY)	Пептид YY (PYY)
Агути-свързан пептид (AgRP)	Оксинтомодулин (ОХМ)
Меланин-концентриращ пептид (MCH)	Глюкагон подобен пептид-1 (GLP-1)
Галанин	Амилин
Норадреналин	Ентеростатин
Бета-ендорфин	Соматостатин
Динорфин	Бомбесин/ бомбесин-свързани пептиди (BNRP)
Растежен освобождаващ хормон	Апо А-IV
	Тиротропин освобождаващ хормон
	Калцитонин-ген-свързан пептид
	Serotonin
	α -меланоцит стимулиращ хормон (α -MSH)
	Кокаин- и апфетамин-регулиращ транскрипт (CART)
	Про-опиомеланокортин (POMC)
	Кортикотропин-свързан фактор (CFF)

Стомашно-чревният тракт, освен с екзокринна секреция, се описва и като най-големия ендокринен орган, чийто хормони участват също в редица метаболитни процеси. Най-добре изучен представител на групата е **грелинът**. Грелинът представлява пептиден хормон, който първоначално се е разглеждал като фактор, стимулиращ секрецията на растежния хормон от предния дял на хипофизата (54). Продължителните проучвания върху грелина, показват, че той се

синтезира като препрохормон, който под въздействието на протеолитични ензими се разгражда до пептид с 28 аминокиселини със серинова група в структурата си. Тази структура определя и основните му биологични активности (54). Синтезата му се реализира предимно в пристенните клетки на стомашния фундус. Много малък процент от грелина се синтезира от плацентата, бъбреците, хипофизата и хипоталамуса.

Преди да бъде открит грелинът, редица проучвания потвърждават наличието на грелинови рецептори (55). Клетки, разположени в предната част на хипофизата, съдържат рецептори, при чието свързване се потенцира синтезът на растежен хормон (56). Тези рецептори първоначално се определят като Growth hormone secretagogue receptor (57). Естественият им лиганд е открит през 1999 година и се нарича грелин, име, което получава заради ефекта, който оказва на растежния хормон (представката “ghre”, означаваща расте). Грелинови рецептори се откриват по клетките в предния дял на хипофизата, в хипоталамуса, сърцето и мастната тъкан (58). Свързването на грелина с GHS-Rs, разположени по хипофизата върху невроните в хипоталамуса, отговорни за секрецията на соматолиберини, с което стимулират секрецията на растежен хормон. Активирането от грелина на неврони, разположени върху паравентрикуларното ядро на хипоталамуса, съдържащи невротрансмитерите невропептин Y (NPY) и агути свързания пептин (AGRP), стимулира апетита и чрез това активира приема на храна.

Грелинът води до увеличаване на мастната тъкан като намалява окислението на мазнините (54). Той има отношение към стимулирането на чревния мотилитет и стомашното изпразване, което определя освен наличието на централни механизми на действие, така и на локални ефекти на хормона. Освен като секретagog по отношение на растежния хормон, грелинът има и други интересни ефекти, които предстоят да бъдат подробно изучени. Повлиява гастроентеропанкреатичните функции и има орексигенен, метаболитен, кардиоваскуларен и антипролиферативен ефект. При възрастни хора, плазмените нива на грелина се покачват двойно преди хранене и намаляват до базални стойности 1 час след нахранване. В случаи на отрицателен енергиен баланс, типично наблюдаван при нискокалорична диета, извънредно повишена физическа активност, анорексия, се отчитат високи плазмени

концентрации на грелин. При обезни пациенти, които имат повишен хранителен прием, синтезът му е намален.

Ендокринният сигнален механизъм към хипоталамуса и пътищата, по които хормонът достига до мозъка и преминава хематоенцефалната бариера, не са напълно изяснени. Съществуват анатомични данни за наличие на капилярна мрежа в нуклеус аркуатус, по която до част от паренхимата му достигат невроактивни вещества, което определя модулиращото влияние на грелина върху хипоталамичната пластичност и вероятната му стимулация върху хипокампалната невронална тъкан.

Малко са данните в литературата за ефектите на грелина по отношение на инсулиновата секреция. Данните сочат, че концентрацията на грелин е обратно пропорционална на инсулиновите нива на гладно. Грелинът е с по-ниски нива у болни с неморбидно затлъстяване в сравнение с тези с морбидно и се повишава (при вторите) след хирургическа интервенция (стомашен байпас) с последваща масивна загуба на тегло (54).

Пептид YY₃₋₃₆

Пептид YY₃₋₃₆ е хормон, който се секретира от L-клетките на дисталните отдели на тънките черва. Принадлежи към семейството на Y рецепторите, както невропептид Y (NPY) и се свързва специфично с Y2 рецепторите. Пептид YY₃₋₃₆ се освобождава в циркулацията след хранене и плазмените му нива се редуцират при глад. Острото периферно въвеждане на **пептид YY₃₋₃₆ намалява приема на храна при хора и животни** (53). Други колективи, обаче не потвърждават аноректичния ефект на пептид YY₃₋₃₆ при изследването на гризачи, които са били подложени на стрес (59). Вероятно обяснение на тези резултати е потискащото действие на стреса върху пептид YY₃₋₃₆. Въпреки спорните резултати последващите изследвания показват, че пептид YY₃₋₃₆ потиска апетита и приема на храна при гризачи (60). Тези му ефекти са медиирани от свързването му с Y2 – рецепторите. Воуе и сътр. (2006) откриват, че пептид YY – knockout мишки се характеризират с нарушена енергийна хомеостаза, което предполага и физиологичната роля на пептид YY₃₋₃₆ в нейната регулация. Хората, живеещи със затлъстяване показват нормална чувствителност към анорексигенния ефект на пептид YY₃₋₃₆. Плазмената му

концентрация не е повишена при затлъстяване, което е характерно за лептина (53). Приложението на високи дози пептид YY_{3-36} причинява промени във вкуса при животни (59) и гадене при хора (61). Бавната интравенозна инфузия на ниски дози пептид YY_{3-36} не води до такива странични реакции при животни и хора. Ефикасността на хроничното прилагане на пептид YY_{3-36} за редукция на приема на храна е необходимо условие за използването в лечението на затлъстяването. Необходими са допълнителни проучвания с цел установяване на терапевтичната доза пептид YY_{3-36} и оптималния начин на приложение.

Холецистокинин

Добре известна е ролята на холецистокинин в екзокринния панкреас и жлъчния мехур. През 1973 за първи път се установи неговото **влияние върху приема на храна** и последващи изследвания при животни и хора потвърдиха тези резултати. Холецистокининът се освобождава постпрандиално от тънките черва и **потиска апетита**, като се свързва с холецистокинин 1 рецепторите (ССК1) върху *nervus vagus*. *Vi* и сътр. (62) наблюдават повишение на приема на храна при прилагането на антагонисти на ССК1 рецепторите на гризачи и хора. Същият колектив изследва „Otsuka Long – Evans Tokushima Fatty” (OLETF) плъхове, които се характеризират с ССК – А генетичен дефект. Счита се, че този дефект на гена е една от основните причини за хиперфагията, затлъстяването и развитието на захарен диабет тип 2 при OLETF плъховете (62). Тези данни доказват, че холецистокининът играе физиологична роля в регулацията на апетита (62). Високите дози холецистокинин причиняват гадене, докато по-ниските дози не показват такива странични реакции и намаляват приема на храна.

Панкреатичен полипептид (ПП)

Панкреатичният полипептид е част от РР семейството, към което принадлежат пептид YY и невропептид Y . Панкреатичният полипептид се синтезира и секретира от ендокринния панкреас. Свързва се избирателно с $Y4$ и $Y5$ рецепторите. Подобно на пептид YY_{3-36} панкреатичният полипептид се влияе от приема на храна. След хранене плазмената му концентрация се повишава, в резултат на което приемът на храна е преустановен. Панкреатичният полипептид е анорексигенен хормон, т.е. понижава апетита. При периферно приложение на панкреатич-

ния полипептид се наблюдава значително понижение на апетита при животни и хора (63, 64). Azakawa и сътр. (65) съобщават за редукция на теглото при хронично въвеждане на панкреатичен полипептид на *ob/ob* мишки. При изследвания на хора не се наблюдават странични реакции като гадене и други от страна на гастроинтестиналния тракт след интравенозно въвеждане на панкреатичен полипептид. В литературата са документирани данни за връзката на полипептида с изпразването на стомаха и евентуалния му аноректичен ефект като резултат на забавено освобождаване на хранителното стомашно съдържимо (63). В подкрепа на този факт са изследванията върху трансгенни мишки, които се характеризират със свръхекспресията на панкреатичен полипептид. При тях се наблюдава намален прием на храна и количество мастна тъкан, както и забавено освобождаване на стомаха (64). Въпреки обнадеждаващите резултати, все още в литературата не е изяснена физиологичната роля на панкреатичния полипептид в енергийната хомеостаза.

Амилин

Амилинът, познат още като островен амилоиден полипептид, е член на калцитонин–пептид семейството и се освобождава заедно с инсулин от бета–клетките на панкреаса в отговор на хранителен прием. Основната му физиологична функция е поддържане на глюкозната хомеостаза в организма. Хиперинсулинемията е винаги придружена с хиперамилинемия, като нивото на амилина спада заедно с нивото на инсулина в плазмата. Освен това амилинът играе роля и в регулацията на апетита. Приложен периферно **амилинът намалява приема на храна**. При пациенти със захарен диабет тип 1 и 2 се наблюдава редукция на теглото (стандартно 0.5 и 1.4 кг) за период от една година след лечение с агониста на амилин pramlintide (66).

Глюкозозависим инсулинотропен полипептид (ГИП)

Глюкозозависимият инсулинотропен полипептид се състои от 42 аминокиселини и се отделя от К–клетките на дуоденума след прием на храна. Не е установена пряка връзка между ГИП и влиянието му върху апетита. Въпреки това ГИП рецепторни - knockout мишки показват резистентност към напълняване, когато са хранени с диета, богата на мазнини. Причината за проявяваната ре-

зистентност е неясна. Съществува хипотеза за вероятна връзка между глюкозо-зависимият инсулинотропен полипептид и мастната тъкан, отколкото такава с централните механизми на регулация на апетита.

Глюкагон-подобен пептид – 1 (GLP – 1)

Ендокринните клетки на тънките черва, от които се секретира пептид YY, също така отделят прекурсорен протеин, наречен препроглюкагон. От него произлизат множество молекули като глюкагон, глюкагон – подобен пептид – 1 (GLP – 1), глюкагон – подобен пептид – 2 (GLP – 2) и оксинтомодулин. Глюкагон – подобният пептид – 1 (GLP – 1) съществува под няколко форми, но най – често срещаната е глюкагон – подобният пептид – 1 (GLP – 1). GLP – 1 се освобождава в циркулацията след прием на храна и е силен инкретин, тъй като централното и периферно приложение води до мощна стимулация на секреция на инсулин. При интрацеребровентрикуларна апликация се наблюдава силно потискане на приема на храна при гризачи. Drucker и сътр. (67) документират **намаляване на апетита при животни и хора** след периферно въвеждане на глюкагон подобният пептид – 1. В слюнката на вида гущери *Heloderma suspectum* е открит пептид, наречен ексендин – 4, който е мощен GLP – 1 агонист.

Глюкагон-подобен пептид – 2 (GLP – 2)

Глюкагон – подобният пептид – 2 (GLP – 2) е открит в мозъка. Централното му въвеждане води до **потискане на хранителния прием**. Основните ефекти на GLP – 2 след периферно приложение са да стимулира гастро–интестиналния мотилитет, абсорбцията и растежа, но не повлиява апетита (67).

Оксинтомодулин

Оксинтомодулинът е също продукт на прекурсорната молекула препро-глюкагон и е тясно свързан с хранителния прием. Приложен в мозъчните вентрикули при плъхове **потиска апетита**, както при гризачи и хора, когато е въведен периферно (68). Хроничното въвеждане на оксинтомодулин причинява редукция на теглото при хора. Четири седмично проучване, проведено сред доброволци с наднормено тегло и затлъстяване, които са рандомизирани в две групи (група, третирана с оксинтомодулин и контролна група). Групата на лечение с оксинтомодулин показва средна редукция на теглото с 0.45 кг седмично, повече

отколкото контролната група (69). Приложението на оксинтомодулин повишава значително енергийния разход при плъхове и хора (69). Необходими са допълнителни изследвания, за да се установи ефикасността на оксинтомодулин в дълготрайно лечение на затлъстяването.

Маснатата тъкан е вид съединителна тъкан, съставена от клетки, наречени адипоцити, съхраняващи липиди, с което се свързва, както енергийната и терморегулаторна функция, така и секрецията на редица хормони и биологично активни вещества (70), вземащи участие в регулацията на базалния метаболизъм (лептин, адипонектин, проинфламаторни фактори, като тумор некротизиращ фактор α (TNF- α), интерлевкин (IL6), фактор D (известен като адипсин), протромботични агенти като плазминоген активиращ инхибитор I, както и компоненти, участващи в регулацията на артериалното налягане- ангиотензиноген (71). Множество проучвания показват, че маснатата тъкан, при хора със затлъстяване, се характеризира с повишена инфилтрация от макрофаги (62). Счита се, че затлъстяването се характеризира с нискостепенно възпаление (72).

В зависимост от еволюцията и анатомичните особености на клетките, изграждащи маснатата тъкан, разглеждаме два типа: **бяла и кафява масна тъкан (73)**. Кафявата масна тъкан (brown adipose tissue, BAT), се определя като естествен защитен механизъм срещу хипотермия при бозайниците (74). Съставена е от диференцирани адипоцити, съдържащи множество липидни капчици и големи митохондрии, свързани със специфичен протеини- несвързан протеин 1 (uncoupling protein 1, USP1), разположен върху вътрешната митохондриална мембрана. Излагането на организма на ниски температури, както и приемът на храна, води до активирането на USP1- протеина, което повишава окислението на глюкозата и на свободните мастни киселини(75, 76). Дълго време се е считало, че кафявата масна тъкан може да се открие само при малки бозайници и новородени. В началото на XX век се появяват първите данни за наличие на BAT и при възрастни (74). Описаните през 1908 година депа от кафява масна тъкан в областта на ременете и по врата на възрастни трупове, са със сходна като морфологична структура с интерскапуларните депа на BAT при животни. През 2002 година стана възможно визуализирането на кафявата масна тъкан, посредством F-флуоро-2-деокси-D-глюкозо (F-FDG) позитрон емисионна компютърна томография (77). Доказването

на VAT, поставя редица други въпроси, относно метаболитната роля на този вид мастна тъкан, както и откриване на връзката ѝ с развитието на затлъстяването.

Бялата мастна тъкан има няколко предилекционни зони в човешкото тяло и може да бъде разделена в две основни категории: **подкожно депо**, разположено в хиподермалните области на абдомен, бедрата и седалището и **висцерално депо** - интраабдоминалната област, заобикаляща вътрешните органи. Висцералната мастна тъкан води до значителни здравни рискове, като засяга функцията на жизнено важни органи като черен дроб и сърце.

Малък процент бяла мастна тъкан може да се открие, разположена между клетките на кафявата мастна тъкан (78), което може да бъде индуцирано от външни фактори, като екстремно ниски температури, физически упражнения, както и дълго време третиране с медикаменти от групата на тиазолидиндиони (*rosiglitazone*) - ефект, известен като „покафеняване“ на бялата мастна тъкан (79). Изградена е предимно от натоварени с липиди, мастни клетки, наречени адипоцити, както и от техните прекурсори-преадипоцити, и в по-малка степен мезенхимни клетки, ендотелни клетки, фибробласти, макрофаги и T-клетки. Установяването на ендокринната роля на бялата мастна тъкан, стана възможно, след изолирането на хормона лептин, секретирани от адипоцитите (80). С ендокринната функция на бялата мастна тъкан се свързва също секрецията и на редица други адипозо-специфични протеини, наречени „адипокини“ - адипонектин и резистин, които заедно с лептина, могат да действат като паракринни, аутокринни и ендокринни стимули. Подчертаната ендокринна роля на бялата мастна тъкан, се проявява както при дефицит (липодистрофия), така и при излишък (затлъстяване), като това води до редица метаболитни последствия. Затлъстяването пряко корелира с развитието на инсулинова резистентност, дислипидемия, артериална хипертония и секреция на проинфламаторни агенти (81). В бялата мастна тъкан при лица със затлъстяване, се натрупват триглицериди, което води до увеличаване размерите на вече съществуващите адипоцити (хипертрофия) и/или до увеличаване на броя на адипоцитите (хиперплазия) (75). Механизмите за контрола на продукцията и секрецията на адипоцитите не са напълно изяснени. Продуктите от секрецията на бялата мастна тъкан- хормони и проинфламаторни протеини, участват в редица процеси- от контрола в приема на храна и артериалното налягане, до регулацията на липидния

метаболизъм, повишаване на инсулиновата чувствителност, отговор при възпалителни процеси и активиране на имунната система (82).

Лептинът представлява едноверижен протеохормон, с молекулна маса 16 kDa, вземащ ключова роля в регулацията на телесното тегло. Продуцирането на хормона се свързва с *ob*-ген (83), разположен на 7 хромозома (5). Названието лептин има гръцки произход (от гръцки *leptos*, означаващ слаб). Основната му секреция се реализира от адипоцитите, но съществуват данни за продукция и от други органи и тъкани, като фундуса на стомаха, чернен дроб, скелетната мускулатура, както и плацентата (5). Действието на лептина по отношение на централната нервна система, се свързва основно с ефекта върху хипоталамуса, което довежда до супресия на хранителния прием, както и стимулиране на енергийния разход (84, 85). Лептиновите рецептори принадлежат към групата на клас I цитокинови рецептори, повсеместно разпространени по цялото тяло. При животни и хора със затлъстяване се наблюдава тежка лептинова резистентност, причинена от мутации в лептиновите рецептори (84). Установени са няколко изоформи на рецепторите за хормона, описани като *Ob-Ra*, *Ob-Rb*, *Ob-Rc*, *Ob-Rd* и *Ob-Re* (73). *Ob-Ra* се счита за лептинов транспортер, докато *Ob-Re* е разтворима форма на трансмембрания лептинов рецептор. *Ob-Rb* съдържа интрацелуларен сигнален домейн и показва висока концентрация в хипоталамуса, което определя лептина като аферентен сигнален механизъм за централната нервна система по отношение на мастния статус на организма. Тази концепция се подкрепя и от факта, че при дефекти в *ob/ob*-гена, водещ до лептинов дефицит при мишки и хора, терапия с лептин показва успех в овладяването на наднорменото тегло (86). Това поставя въпроса за възможностите лептинът да бъде включен в лечението на затлъстяването (87, 88). Допълнителни изследвания потвърдиха, че лептиновата резистентност при обезни хора е причината за повишени нива на лептин в организма, което прави терапията неефективна (89). Причината за тази десенситизация на хормона вероятно се дължи на нарушение в транспорта на хормона през кръвно-мозъчната бариера, на абнормалности в експресията на рецепторите за лептин или в индукцията на сигнални механизми (90).

Освен демонстрираните метаболитни ефекти, лептинът оказва въздействие и върху редица ендокринни оси. Проучвания върху хора, показват, че намаляването

на лептиновата концентрация, в отговор на недостиг на храна, се свързва с глад-индуцираната супресия на хипоталамо-хипофизо-гонадната ос. Това подчертава възможната връзка между ендокринната функция на мастната тъкан (91), центровете за регулация на енергийната хомеостаза в хипоталамуса и репродуктивната система, което се счита за индикация за нормална репродуктивна функция (84). Този ефект, в частност, може да се обясни и със супресивния ефект на лептина върху невропептид Y (neuropeptide Y) по отношение на продукцията му и секрецията от невроните в нуклеус аркуатос (arcuate nucleus). Невропептид Y е мощен стимулатор на апетита и участва в регулацията на редица хипофизни хормони: супресия на растежния хормон, чрез стимулация на соматостатин, супресия на гонадотропините, или активиране на хипофизо-адреналната ос (92).

Нивата на лептин в кръвта правопрпорционално корелират с индекса на телесна маса (ИТМ) и с количеството на мастната тъкан в организма (84). Прехранването, инсулинът и кортикостероидите се считат за фактори, увеличаващи секрецията на лептин, докато постенето и недохранването водят до супресия на хормоналните нива. Лептинът има дуалистична роля в регулацията на физиологичните процеси при човек. През периоди на поддържане на нормални стойности на телесното тегло, когато калорийният прием е в баланс с енергийния разход, лептиновите концентрации са в нормални стойности поради нормалното количество мастната тъкан (93). Когато се наруши това равновесие и приемът на храна надвиши енергоразходът, тогава лептинът започва да функционира като сензор за настъпващия енергиен дисбаланс (94). Пациенти с липодистрофия имат значително намалени нива на плазмената концентрация на лептина (91). Прилагането му при такива болни намалява чернодробните мазнини и подобрява инсулиновата чувствителност в хепатоцитите. За клиничната практика, е важно да се знае, че лептиновата секреция се характеризира с циркадни ритми и проявява тенденция за най-висока секреция през нощта (около полунощ), като стойностите, измерени по това време са ~ 30-100% по-висок от тези измерени сутрин или в ранния следобедни часове. Тези вариации е уместно да бъдат съобразявани при вземане на кръв за анализ (84). Лептиновите концентрации при жени са по-високи, сравнени с тези при мъжете. И при двата пола, покачването на лептиновите нива с възрастта се асоциира с намаляване на концентрацията на лептиновите рецептори. Дисбаланс в

експресията на лептинови рецептори и на съотношението между свързаната и свободната фракция на лептина, също се установява и при пациенти с инсулинова резистентност и абдоминално затлъстяване. Причината за това се обяснява с наличната при тези състояния лептинова резистентност, която недвусмислено се свързва с инсулиновата резистентност и абдоминалното затлъстяване и може да се определи като част от комплекса на метаболитния синдром.

Ендокринната функция на мастната тъкан е свързана със секрецията и на друг представител на адипокините - **адипонектин**, известен още като адипоцит комплемент-свързан протеин 30 kDa (Adipocyte complement-related protein of 30 kDa) (Spranger, 2003 #6). Адипонектинът представлява адипоцит-специфичен протеин с роля в глюкозната и липидна хомеостаза. Съществуват две основни групи рецептори за хормона: AdipoR1 и AdipoR2. AdipoE1 се експресира предимно върху скелетната мускулатура, докато AdipoR2 се намират предимно в черния дроб (95). В молекулата на адипонектина са включени два крайни участъка – N-терминален колаген-подобен домейн и C- терминален глобуларен домейн със сигнификантна секвенция и структурно съответствие за C1q субединица от системата на комплемента. Скъсени молекули адипонектин (gAdiponectin), съдържащ само C-терминален глобуларен домейн, отчетени в кръвен серум и рекомбинантни gAdiponectin, се свързват с регулацията на редуцията на Телесна маса както и окислението на свободни мастни киселини в мускулите и черния дроб при мишки (95).

Инжектирането на адипонектин на необезни диабетни мишки води до инсулин-независимо понижаване на глюкозните концентрации. Установена е негативна обратна връзка между затлъстяването и циркулиращия адипонектин, като концентрациите му нарастват паралелно с редуцията на Телесна маса. Понижените концентрации на адипонектин се асоциират с инсулинова резистентност, както и при пациенти с диагностициран захарен диабет тип 2.

Синтезът и секрецията на адипонектин се регулира от редица контролни механизми. Адипоцитите са отговорни за секрецията на инсулин –с ензимиращите хормони, лептин, адипонектин. Адипоцитната хипертрофия, индуцирана от диета, богата на мазнини, повлиява секрецията и продукцията на тези хормони, като влошава инсулиновата резистентност при лица със затлъстяване. Метаболитните функции на адипонектина, също се отнасят и към синтеза на липиди, като увели-

чената му концентрация намалява липидогенезата и глюконеогенезата в черния дроб и в кръвта (95). Инсулинът и инсулин-растежният фактор (IGF-1) повишават синтеза на адипонектин в бялата мастна тъкан. При хора, страдащи от затлъстяване се установяват редуцирани концентрации на хормона, което се асоциира с лептинов дефицит или резистентност. Приемът на храна богата на белтъчини, може да увеличи чувствителността на хепатоцитите към инсулин, както и да окаже директен или индиректен ефект като намалява липидите в общата циркулация. Секрецията на адипонектин може да подобри инсулиновата чувствителност и глюкозния толеранс. По този начин се коригират хипергликемиите при лица със затлъстяване. Действието на адипонектина не се изчерпва само в глюкозната и липидна хомеостаза, както и в подобряване на инсулиновата чувствителност, но също така повлиява и сърдечносъдовата система. Редица проучвания отчитат корелация между ниските нива на хормона и развитието на коронарната съдова болест на фона на основните рискови фактори като мъжки пол, високо кръвно налягане, затлъстяване и захарен диабет II тип. Адипонектинът потиска секрецията на проинфламаторния фактор TNF- α от моноцити/ макрофаги. Счита се, че по този механизъм адипонектинът играе роля като протективен фактор за развитието на атеросклероза. При хора е установено отрицателната обратна връзка между плазмените концентрации на адипонектин и ИТМ, процентът на общите мазнини, постпрандиалните стойности на инсулин и концентрацията на триглицеридите.

Възпаление и затлъстяване

Мастната тъкан се счита за ендокринен орган, който се състои от <50% адипоцити и >50% стромална съдова фракция, която съдържа кръвни клетки, ендотелни клетки, прекурсори на мастната тъкан и стволови клетки, макрофаги и други имунни клетки (96). Като ендокринен орган, адипозната тъкан произвежда и секретира няколко хормона и цитокини, които играят важна роля в въглехидратния и липидния метаболизъм, възпаление, коагулация на кръвта, както и засищане и глад (96). Тези цитокини, известни още като адипоцитокени или адипокини, или се секретират от адипоцитите и/ или от стромалната съдова фракция (96, 97). Адипокините могат да функционират като класически цитокини, растежни фактори и протеини, които участват в регулирането на кръвното налягане, съдовата хомео-

стаза и липидния и глюкозния метаболизми (98). При затлъстяване, разрастването на мастната тъкан причинява хипоксия и стрес, водещ до некроза на адипоцитите. Повече от 90% от макрофагите в бялата мастна тъкан на животните са локализиращи в мъртви адипоцити. „Корона-подобната структура“ описва некротични клетки с нарушена цялост на клетките и липидни капки и околни макрофаги, които служат като почистващи единици за клетъчни остатъци и липидни капки в некротичните клетки (99).

Описани са два вида макрофаги в бялата мастна тъкан: провъзпалителен тип M1 и противовъзпалителен тип M2 (100). Макрофагите от тип M1 се индуцират от възпалителни цитокини, произведени от експандирана мастна тъкан. След като макрофагите от тип M1 инфилтрират в мастната тъкан, те отделят повече провъзпалителни цитокини и произвеждат реактивни кислородни субстанции (ROS), които могат да привлечат повече макрофаги и усилят възпалителния отговор. Тип M2 макрофагите пребивават в мастната тъкан (100). Тези макрофаги се наричат също активирани макрофаги, защото се активират от интерлевкин (IL) -4. M2-тип макрофаги секретират противовъзпалителни цитокини и имат манозни рецептори, рецептори за почистване и специфични интегрини, които водят до противовъзпалителен ефект (100). По време на стрес и хипоксия в мастна тъкан при затлъстели, макрофагите от тип M2 губят своята IL-4 рецепторна експресия и IL-4-медираните противовъзпалителни функции и вместо това се диференцират към M1 тип макрофаги (100). Освен IL-4, понижена експресия на IL-10, Ym1, Аргиназа-1 и повишена експресия на тумор некрозен фактор-алфа (TNF- α) и индуцируема азотна оксидна синтетаза (iNOS) водят до превключването на макрофагите от M2 до M1 тип. Този процес увеличава броя на възпалителните макрофаги, което води до повишено производство на цитокини и хемокини, включително моноцитен хемоаттрактант (MCP) -1, MCP-2, RANTES и хемокинови рецептори като CCR2 и CCR5. Тези възпалителни хемокини допълнително увеличават инфилтрацията на макрофагите в мастната тъкан (98, 101). Kanda и сътр. установяват, че макрофагите и ендотелните клетки в мастната тъкан на плъх могат да отделят MCP-1 (102). Този хемокин и неговият рецептор CCR2 насочват миграцията на моноцити в мастната тъкан. Последващо излагане на моноцитите на макрофаг колония-стимулиращ фактор причинява диференциация към макрофагите, които могат да отделят повече

MCP-1 (102). В други изследвания, затлъстелите лица имат значително по-високи плазмени нива на MCP-1 отколкото контролните групи, като повишените плазмени нива на MCP-1 бяха положително свързани с инсулиновата резистентност (103). В мастна тъкан, макрофагите от тип M1 отделят не само MCP-1, но също така и други възпалителни цитокини, включително TNF α , IL-6, IL-1, IL-1 β и IL-8, които могат да усилят възпалителните отговори (104).

Апелинът е наскоро открит пептид, който се секретира от разнообразни тъкани, включително централната нервна система, мастна тъкан и много други периферни органи, като сърце, бъбреци, и черен дроб. Той е свързващ лиганд за G-протеин-свързания рецептор APJ (105). Един общ 77-аминокиселинен предшественик произвежда три биоактивни апелина, които съдържат 13 аминокиселини (апелин-13), 17 аминокиселини (апелин-17), или 36 аминокиселини (апелин-36), съответно (106, 107). Проучвания върху животни показват, че мишките с дефицит на апелин са инсулиноустойчиви и развиват хиперинсулинемия, която може да бъде преодоляна чрез прилагане на екзогенен апелин (108). Въвеждането на апелин в затлъстели мишки с диабет (db / db) може да увеличи приема на глюкоза и повишаване на чувствителността към инсулин (108). Апелинът стимулира PI3K / Akt фосфорилиране-зависима транслокация на GLUT 4, като това увеличава усвояването на глюкоза от адипоцитите (109). Освен това, секретията на апелин може да активира AMP-активирана протеин киназата (AMPK), водещо до инсулино-сенсibiliзиращ ефект (110). Експресията и секретията на апелин се увеличават по време на адипоцитната диференциация и се регулират от храна и хормони (111).

Щитовидната жлеза е ключов орган в регулацията на метаболитните процеси при животните и човека. Хормоните на жлезата имат ефект върху почти всички клетки в организма, свързайки се с нуклеарни рецептори и по този начин стартират каскада от реакции, водещи до експресия на различни генни продукти (112). За нормалното развитие в пренаталния период- както за мозъка, така и за соматичните клетки на фетуса, е необходимо майката да има здрава и правилно функционираща тиреоидея. При възрастния организъм, ролята на жлезата е свързана с метаболизма на протеини, мазнини и въглехидрати, което ѝ определя ключова роля при изясняване заболявания, свързани с дисрегулация на описаните

процеси (112). Физиологична роля на периферните хормони трийодтиронин (Т3) и тироксин (Т4) се свързва също с редица процеси – растеж, развитие; повлияване на кислородната консумация и телесната температура, като по този начин, участват в усилването на базалния метаболизъм; повлияват глюконеогенезата в черния дроб; стимулират калциевата и фосфатната обмяна; на ниво мастна обмяна– засилват липолизата (стойностите на серумния холестерол са понижени при тиреотоксикоза и повишени – при хипотиреоидизъм) (113). За правилната синтеза на щитовидните хормони е необходимо достатъчно йод, участващ в структурата на хормоните. Изчислено е, че необходимото количество приет с храната йод трябва да е стандартно по 200 мг дневно, за да се осигурни синтезата на тироксин (112). Йодидите, приети с храната се абсорбират от гастроинтестиналния тракт, след което попадат в кръвообръщението и подложени на трансформация се натрупват в клетките на щитовидната жлеза- тиреоцити, където се окисляват до елементарен йод. Следващия етап в синтезата на щитовидните хормони се определя като купелуване (сдвояване) на тирозина до йодтирони (трийодтиронин и тетраiodтиронин), които се излъчват в кръвното русло (112).

Правилното функциониране на щитовидната жлеза и адекватната ѝ секреция се контролират **на ниво хипоталамус-хипофиза**. В хипофизата се секретира тиреостимулиращ хормон (Thyroid-stimulating hormone, TSH). Той стимулира щитовидната жлеза в производството на Т3 и Т4 и представлява гликопротеин, който се произвежда от тиреотропните клетки в предния дял на хипофизата. Секретирането на TSH също подлежи на контрол, което се реализира на ниво хипоталамус, където се произвежда тиреотропин-освобождаващ хормон (TRH), който стимулира хипофизата да произвежда TSH. В хипоталамуса се образува и хормон с противоположно действие-соматостатин, който има отрицателен ефект върху производството на TSH от хипофизата – намалява или инхибира освобождаването му (113). Действието на TSH върху секрецията на щитовидната жлеза, също се реализира чрез рецепторен механизъм. Нивата на TSH и Т3 и Т4, са подчиняват на правилата за обратна връзка (114). Основната част от щитовидните хормони, произведени от фоликуларните клетки попадат в циркулацията, но част от тях се складира в тиреоидеята (115).

Диагностиката на заболяванията на щитовидната жлеза също търпят прогрес и прецизност в методите. Най-чувствителният лабораторен параметър за функцията на жлезата е концентрацията на TSH.

Предиабет и захарен диабет тип 2

Терминът „предиабет“ обединява в себе си състояния на нарушения във въглехидратния толеранс: нарушена гликемия на гладно (НГГ) и нарушен глюкозен толеранс (НГТ). На фона на тези състояния се наблюдава повишен риск от развитие на захарен диабет тип 2 и значим риск за възникването на сърдечно-съдови увреждания (125). Хората с НГТ имат 1.48 пъти по висока обща смъртност и 1.66 пъти по висок риск от смърт от сърдечно-съдови заболявания в сравнение с индивидите с нормален глюкозен толеранс (126, 127). За хората с НГГ общата смъртност и смъртността от ССЗ са между 1.19 и 1.28 пъти по-високи от тези на индивидите с нормален глюкозен толеранс (128). Всички лица, които са имали отклонения в нивото на кръвната захар – нарушена гликемия на гладно (НГГ) или нарушен глюкозен толеранс (НГТ) остават с потенциален риск от по-натъжно развитие на захарен диабет

Стойността на кръвната захар на гладно трябва да е под 6,1 mmol/L (110 mg/dL) според СЗО. Американската диабетна асоциация счита за нормални стойности на кръвната глюкоза на гладно под 5,6 mmol/L. Стойности между 6,1 и 7,0 mmol/L (110 и 125 mg/dL) са гранични и са показател за нарушена гликемия на гладно, а такива над 7,0 mmol/L (126 mg/dL) са диагностичен критерий за диабет. На втория час резултат под 7,8 mmol/L се счита за нормален, а по-високи стойности демонстрират хипергликемия. Стойности на глюкозата в плазмата след втория час между 7,8 и 11,1 mmol/L са показател за „нарушен глюкозен толеранс“, а над 11,1 mmol/L (200mg/dL) потвърждават diagnоза диабет.

Повечето хора със затлъстяване и инсулинова резистентност нямат отклонение в стойностите на измерената кръвна захар. При нормални условия енокринният апарат на панкреаса увеличава отделянето на инсулин, за да компенсира резистентността на тъканите към действието на хормона и с това да поддържа нормален глюкозен толеранс (129). Когато този намален глюкозен не може да се компенсира се развива захарен диабет.

Захарният диабет е хронична болест, характеризираща се с повишено ниво на кръвната захар в организма, което се дължи на намалена реакция на клетките към инсулина или на недостатъчното му произвеждане в тялото (130). Диагнозата захарен диабет се поставя при наличие на клинична картина: полиурия, полидипсия, помени в телесното тегло и случайно измерена кръвна захар над 11,1 ммол/л, т.е. при проба взета независимо по кое време на денонощието, без оглед на времето от последното хранене или при плазмена глюкоза на 7,0 ммол/л (кръвна проба взета след интервал от поне 8 часа след последното хранене). В диагностичните критерии на заболяването се включват стойността на кръвната захар над 11,1ммол/л на 120' в хода на провеждан ОГТТ, както и стойности на гликиран хемоглобин HbA1c > 6,5% (131).

Инсулиновата резистентност се определя като намалена чувствителност на периферните тъкани (скелетна мускулатура, мастна тъкан и други) към действието на инсулина, което води до високи концентрации както на глюкоза, така и на инсулин в кръвта. Инсулиновата резистентност може да възникне физиологично в различен етап от живота (бременност, пубертета, напредване на възрастта). Промените в начина на живот, в типа на хранене и с повишаването на физическата активност, могат да доведат до подобряване на инсулиновата чувствителност на тъканите (132). Диагностиката на инсулиновата резистентност става след провеждане на **тест с орален глюкозо толерантен тест (ОГТТ)**. Провежда се след поне 12 часа гладуване, сутрин на гладно, пациентът изпива 75 грама глюкоза, разтворена в 300 мл вода. Измерват се стойностите на кръвната глюкоза преди натоварването (0') и на всеки 60', 120' и 180' минута в следващите два часа. За по-прецизно определяне на инсулиновата чувствителност в клиничната практика се използва НОМА индекс (хомеостатичен модел за оценка на инсулинова чувствителност).

Лечение на затлъстяването

Промяна в начина на живот

Значението на промяната в начина на живот на лица със затлъстяване бе демонстрирано в две големи рандомизирани клинични проучвания: Look AHEAD (135) и Diabetes Prevention Program (136). Резултатите от проучването Look AHEAD

показаха, че степента на първоначалната редукция през първия и втория месец може да се използва като предиктор за редукцията на тегло през четвъртата и осмата година (135). Ние установиха, че началната редукция на теглото през втората седмица на нискоенергиен режим е предиктор за крайния ефект от диетата при лица със затлъстяване от европейското диетологично интервенционно проучване DiOGenes (137). Комерсиалните програми за редукция на теглото показват много добри резултати. Установено е, че средната редукция на теглото е 3% през първата година след прием на подобни готови продукти, като няма данни за дългосрочни ефекти (138). В литературата е добре описано, че умерената редукция на теглото от 5-10 % води до многобройни благоприятни ефекти върху здравето (Фигура 3).

Загубата на телесно тегло може да подобри съпътстващите затлъстяването усложнения



Фигура 3. Ефекти върху здравето на умерената редукция на тегло

Диетични подходи за намаляване на теглото

Съществуват няколко основни критерия за избор на хранителен режим с цел редукция на теглото. На първо място, хранителният режим трябва да доставя по-малко енергия в сравнение с предишния начин на хранене, пациентът да понася добре диетата и да носи и други здравни ползи освен само промяната в теглото (139, 140). Първоначалната цел е намаляване на дневния енергиен прием с 500 ккал или чрез диета с 1200-1500 ккал/ дневно за жените или 1500-1800 ккал/ дневно за мъжете. Някои считат, че съществува „магична“ диета, която води до идеалното тегло само чрез приема на правилните храни. Тези схващания доведоха до мно-

жество проучвания за оценка на ефекта на различното съотношение между мазнините, белтъчините и въглехидратите. Хранителните режими с ниско съдържание на мазнини, ниско съдържание на въглехидрати или с високо съдържание на белтъчини, с нисък гликемичен индекс, или балансиран дефицит са изследвани при голям брой проучвания и обобщени чрез мета-анализи. Сравнителен мета-анализ на диетите с ниско съдържание на въглехидрати срещу диетите с ниско съдържание на мазнини показват, че първите са по ефективни по отношение на редукцията на тегло и подобряването на метаболитните рискове (141). Мета-анализ на описаните по-горе диети не показаха разлика в степента на редукцията на тегло. Най-добрият съвет е да се намали дневния енергиен прием. Многобройно проучвания демонстрират, че най-добрият хранителен план е Средиземноморският модел на хранене. Скорошен мета-анализ на девет проучвания, обхващащи 1178 пациента, установяват значително намаляване на теглото, на ИТМ, на гликирания хемоглобин A_{1c} , на кръвната захар и на инсулина на гладно (142). По отношение на гликемичния индекс и гликемичния товар данните са разнопосочни. Мета-анализ на 14 проучвания показват намаление на С-реактивния протеин и инсулина на гладно при приема на храни с нисък гликемичен индекс, но значителна редукция на свободната мастна тъкан. Много ниските енергийни диети (200-800 ккал/дневно) допринасят за нисък енергиен внос и бърза редукция на тегло. Някои проучвания показаха бързо нормализиране на кръвната захар и други рискови фактори при лица със захарен диабет тип 2. Въпреки тези благоприятни ефекти, системен анализ на данните до сега не показва значителна задръжка на първоначалната редукция на теглото след първата година (143). Този тип комерсиални продукти биха могли да се препоръчат при необходимост от бърза редукция на теглото.

Физическа активност

Стимулирането на повишаване на физическата активност е ключов компонент в промяната в начина на живот с цел редукция на теглото. Световните препоръки са постепенно повишение на физическата активност като 150 минути/седмично, което се равнява на > 30 минути/дневно за поне 5 дни всяка седмица (144). Тази промяна има значителни здравни ефекти, независими от намаляването

на теглото. Съществуват данни, които подкрепят становището, че по-голямата физическа активност дневно 30-45 минути на ден е необходима за превенцията на затлъстяването, както и 60-90 минути/ дневно за поддържането на вече постигнато намаление на теглото (144, 145).

Фармакотерапия

Основните индикации за въвеждането на лекарство за редукция на теглото са неуспеха чрез диетотерапия комбинирана с повишена физическа активност (поне 5% намаляване на от теглото) и задръжката му, и при пациенти с ИТМ ≥ 27 kg/m^2 с едно или повече усложнения или с ИТМ > 30 с или без метаболитни усложнения (Таблица 4).

Таблица 4. Препоръки за лечение на затлъстяването

Лечение	Индекс на телесна маса, kg/m^2				
	≥ 25	≥ 27	≥ 30	≥ 35	≥ 40
Диета, физическа активност и поведенческа терапия	Усложнения	Усложнения	√	√	√
Фармакотерапия			√	√	√
Бариатрична/ метаболитна хирургия			Усложнения	√	√

Няколко са основните препоръки при предписане на лекарствено средство за редукция на теглото (146). На първо място успоредно с приема на медикамент е задължително следването на подходящ диетичен режим. Тези медикаменти помагат на пациента да промени хранителните си навици и поведение и водят до енергиен дефицит. Второ, лекарят и пациентът трябва да са наясно с потенциалните нежелани лекарствени реакции. Трето, загубата на тегло започва на третия до четвъртия месец от приема на медикамент. При лица, страдащи от затлъстяване и без диабет намаляването на теглото е повече от 4-5% от първоначалното тегло на пациента, докато при лица със затлъстяване и диабет то може да достигне 3%,

което се счита за задоволително. Не всеки медикамент е ефективен при всеки пациент. При недостатъчен ефект се сменя лечебният план.

Еволюция във фармакотерапията на затлъстяването

През 50-те и 60-те години на миналия век симпатомиметиците (например фентермин, бензфентамин, диетилпропион) бяха одобрени за кратка редукция на теглото в рамките на няколко седмици. Поради липсата на разбиране за патофизиологията на затлъстяването, се считаше, че когато редукцията на тегло се случи за кратък период от време, не е необходимо продължаващо лечение. Това доведе и до липса на данни за безопасност при дълготрайно лечение с симпатомиметици. Орлистат беше одобрен през 1999 година за хронична терапия на теглото чрез блокиране на стомашно-чревното усвояване и абсорбция на мазнини. По това време науката установи, че прекомерното натрупване на мастна тъкан в организма води нарушения в хормоните за ситост на ниво центрите на апетита в ЦНС (28, 147). Взаимовръзката между орексигенните хормони като грелин и анорексигенните хормони като лептин, холецистокинин, пептид YY и амилин и центрите за ситост в хипоталамуса е нарушена, което води до калориен прием, който спомага и поддържа прекомерното натрупване на мастна тъкан. Също така са установени нарушени адаптивни отговори вследствие на редукцията на тегло, които са важен елемент от патофизиологията на затлъстяването. Намалението на теглото чрез хипокалорична диета стимулира образуването на орексигенния хормон грелин и потиска синтеза на анорексигенни хормони като глюкагон подобен пептид-1, амилин, хилецистокинин и пептид YY. Тези механизми водят до повишен апетит и повишен калориен прием. В допълнение, се наблюдава намаление на енергийния разход, което допринася за положителния енергиен баланс. Тези маладаптивни процеси работят срещу пациента, водят до повишението на теглото до първоначални нива, и това обяснява и т.нар. „йо-йо“ феномен. Именно затова съвременната терапия на затлъстяването се нуждае от лекарства, които могат да се приемат за дълго време, да намаляват/ потискат апетита чрез неутрализиране на нарушенията по оста ситост-ЦНС. В последните години три лекарства (фенфлурамин, сибутрамин и лоркасерин) бяха спрени поради данни за проблеми с безопасността. Въпреки това, от 2012 до 2014 година три централно-действащи

медикаменти бяха одобрени за дълготрайно лечение на теглото. Това са комбинациите: фентермин/ топирамат с удължено освобождаване (симпатомиметик в комбинация с габаергично лекарство, използвано при епилепсия), налтрексон с удължено освобождаване/ бупропион с удължено освобождаване (опиоиден антагонист в комбинация с инхибитор на обратното захващане на допамин/ норадреналин, използван при депресия) и самостоятелният медикамент Лираглутид 3 мг/ дневно (глюкагон подобен пептид-1 (GLP-1) рецепторен агонист) (148). През юни 2021 Федералната агенция по храни и лекарства одобри нов GLP-1 агонист, семаглутид 2.4 мг, подкожно еднократно/ седмично за дълготрайно лечение на теглото. Новото лекарство показва двойно по-голяма редукция на теглото през фаза 3 на рандомизираното клинично проучване в сравнение с данните от съществуващите анти-обезни медикаменти (149-151). Тези резултати дават началото на нов хоризонт в терапията на пациентите, живеещи със затлъстяване (152).

Второ поколение анти-обезни лекарства

Второто поколение анти-обезни лекарства трябва да показват значителни предимства в ефикасността и/ или безопасността и да предизвикат значителна промяна в лечението. Лекарство за терапия на теглото, което безопасно довежда до 10-20% редукция на теглото при повечето пациенти е мощно терапевтично средство при за постигане на превенция или намаляване на усложненията на адипоцитно-базираното хронично заболяване. Преди одобрението на семаглутид 2.4 мг, всички съществуващи лекарства за терапия на затлъстяването (орлистат, фентермин/ топирамат с удължено освобождаване, налтрексон с удължено освобождаване/ бупропион с удължено освобождаване и Лираглутид 3 мг) водеха до <10% средна редукция на теглото в сравнение с плацебо за период от една година.

Тирзепатид, двоен стомашен инхибиращ полипептид, GIP и GLP-1 рецепторен агонист, демонстрира загуба на теглото с 12% при пациенти със захарен диабет тип 2 (153, 154). Тези резултати са по-добри от достигнатата около 10% загуба на теглото със семаглутид при пациенти с диабет тип 2 (данни от STEP 2 проучването), (155). Пациентите със захарен диабет тип 2 обикновено по-трудно намаляват теглото си в отговор на различни интервенции в сравнение с индивиди, които не са диабетици. За момента всички проучвания върху тирзепатид са при

лица с диабет тип 2. Други обещаващи медикаменти в процес на развитие включват мулти-агонисти GLP-1/ GIP пептиди, дългодействащи амилинови аналози (156), активин II рецепторни агонисти, които намаляват мастната тъкан, докато увеличават мускулната тъкан (157) и комбинации между GLP-1 рецепторни агонисти с други хормони на ситостта като амилин (156), пептид YY и оксинтомодулин. Съществуващите и бъдещите лекарства за терапия на затлъстяването могат да се използват в комбинация. Регулацията на теглото е сложна и е необходимо таргетирането на различни пътища. Лекарствените комбинации, насочени към различни механизми за регулация на апетита и теглото довеждат до по-голяма редукция на теглото в сравнение с използването на монотерапия (158, 159). Използването на комбинацията от лекарства с различни механизми на действие е честа практика в терапията на други хронични заболявания като захарен диабет тип 2 и артериална хипертония.

Бариатрична/ метаболитна хирургия за лечение на затлъстяването

Бариатричната хирургия (от гръцки *bar*, *baros*–тегло) представлява хирургичен метод за лечение на затлъстяването. Тя е последната стъпка в лечението тогава, когато другите методи не са достатъчни и е показана при пациенти с високостепенно затлъстяване. Според препоръките от Консенсусната конференция на Националния здравен институт в САЩ от 1991 г. на бариатрична операция подлежат следните пациенти (Таблица 5).

Таблица 5. Критерии за извършване бариатрична операция

ИТМ > 35 кг/м ²
ИТМ >30 кг/м ² с доказано едно от следните придружаващи заболявания, които могат да се повлияят от операцията: захарен диабет тип 2, артериална хипертония, сънна апнея, дислипидемия
Възраст между 18 и 60-65 години
Дългогодишна анамнеза за затлъстяване с неуспешно консервативно лечение за най-малко 6 месеца
Липса на ендокринно заболяване, което да е причина за затлъстяването
Психиатрично стабилен пациент, без алкохолна и наркотична зависимост
Добре мотивиран пациент, разбиращи принципа и рисковете на операцията, способен на дългосрочно следоперативно проследяване
Приемлив оперативен риск

Още от възникването ѝ през 1952 г. основната цел на бариатричната хирургия е да доведе до трайно намаляване на теглото. Това се постига по два основни механизма, които са различно изразени при отделните техники. Единият механизъм е чрез рестрикция, при която намалявайки обема на стомаха, се намалява и възможността за прием на повече храна. Другият механизъм е чрез малабсорбция, при който се редуцира абсорбцията на приетите хранителни вещества, като се съкращава пътят им през гастроинтестиналния тракт, където тя е възможна. През последните 10-15 години значително се промени разбирането за бариатричните операции и се доказа, че те имат ефект върху метаболизма като цяло, настъпващ по все още неясни невро-хормонални механизми, благодарение на които се наблюдава ремисия на захарния диабет тип 2 в повече от 80% от случаите и продължителен контрол и на другите придружаващи заболявания. Това е причината вече да се говори за бариатрична и метаболитна хирургия (38).

Основните видове операции са:

- поставяне на **регулируем стомашен пръстен** (adjustable gastric banding) AGB – единствената останала само рестриктивна операция;

- **вертикална стомашна резекция (sleeve gastrectomy) SG** – представлява вертикална резекция на 2/3 от стомаха по голямата му кривина, довеждаща до рестрикция, но и до остраняване на фундуса, в който са разположени клетките, секретирани грелин, което води до потискане на апетита по все още неясни механизми;

- **Roux en Y стомашен байпас (gastric bypass) RYGBP** – представлява рестриktivна процедура, тъй като се създава стомах с вместимост около 25-30 мл, но и с малабсорбтивна компонента поради разделянето на храната от билиопанкреатичната секреция, чието срещане може да стане на различно разстояние по хода на гастро-интестиналния тракт и по този начин може да се контролира степента на малабсорбцията. Най-често се заобикалят около 75-150 см от тънките черва.

- **Билиопанкреатичен байпас с дуоденално изключване (biliopancreatic diversion with duodenal switch) BPD/DS** е класическия малабсорбтивна операция, която все по-често се прилага на два етапа, особено при пациенти с BMI > 60 кг/м² поради големите рискове при тях. На първи етап се извършва рестриktivна операция на стомаха – sleeve gastrectomy. На втори етап, след като пациентът отслабне до известна степен, се извършва при нужда основната оперативна процедура, целяща малабсорбция – прекъсване на дуоденума под пилора; прекъсване на тънкочревния пасаж на 200 см преди Баухиновата клапа; пилоро-илео анастомоза с проксималния край на дисталното тънкото черво; последваща анастомоза между дисталния край на проксималното тънко черво и илеума на около 100 см преди Баухиновата клапа; холецистектомия и апендектомия. При тази операция има значително по-голяма малабсорбция от RYGBP и съответно по-голяма загуба на тегло, но е с повече странични ефекти и по-голяма честота на дефицит на микронутриенти и витамини.

- Операции с все още недоказан ефект в дългосрочен план – **Омега стомашен байпас** (още наречен мини байпас), стомашна пликация.

- Операции в ход на проучване – дуоденално-илеален байпас със sleeve gastrectomy, като разновидност на дуоденалното изключване, ендоскопски процедури и др.(39).

Бариатричната хирургия бързо навлезе в клиничната практика за лечение на високостепенното затлъстяване. Лапароскопската техника е „златен стандарт” при всички видове бариатрични операции и повече от 90% от всички операции в цял свят се извършват по този начин (40). През 2013 година в света са направени почти половин милион бариатрични операции (40). Най-мощното проучване в тази област е SOS проучването (Swedish Obese Subjects study), което показва намаляване с 24% на смъртността вследствие на намален риск от миокарден инфаркт и рак при жените, подобряване, дори ремисия на захарния диабет тип 2 и подобрене в качеството на живот. (41-43). При малабсорбтивните интервенции като стомашния байпас съществува риск от дефицит на витамини и минерали. Дъмпинг синдром, гастро-езофагиален рефлукс и хипогликемия са също странични ефекти от бариатричната хирургия (44).

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

2. СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ

2.1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

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

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

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

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

A. Експериментални изследвания

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

1. Експериментални животни

За целите и задачите на проведените експериментални изследвания се използваха половозрели мъжки плъхове порода Вистар (200-230 гр), доставени от централен вивариум. Опитите се проведоха при спазване на стандартните условия за отглеждане, храна и вода. Експериментите бяха извършени спрямо Международните Насоки и Принципи на Експерименти с Животни (International Guiding Principles for Animals Research), както и етичните принципи при планиране и провеждане на експериментите според КЕНИМУС (Комисия по Етика на Научните изследвания при Медицински Университет).

Опитите се осъществяваха при спазване на циркадния ритъм (12 ч. светло/12 ч. тъмно). Поддържаната температура на околната среда по време на експериментите беше 22 С. Плъховете бяха рандомизирани в три групи: 1-ва група с експериментално индуциран хипотиреоидизъм, 2-ра група с експериментално индуциран модел на хипертиреоидизъм и 3-та контролна група. Животните бяха разделни по три в кафез. Всички животни от трите групи имаха достъп до вода и стандартна лабораторна храна *ad libitum*. Телесната маса на всички животни беше измервана седмично.

2. Модел на експериментално индуциран хипотиреоидизъм

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

3. Модел на експериментално индуциран хипертиреоидизъм

Плъховете от експерименталната група получаваха чрез водата (L-tyroxin 100 µg, Berlin-Chemie) в дневна доза 2µg/ml в продължение на един месец. За диагностициране на хипертиреоидизъм се отчиташе теглото на плъховете, тяхното поведение и общо състояние и след 30-ия ден от третирането се определяха хормони на щитовидната жлеза и ТТХ.

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

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

4. ELISA (enzyme immunosorbent assay) метод

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

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

4.2. Протокол за изследване на пльши ацелииран грелин чрез ELISA кит (BioVender, Чехия)

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

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

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

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

5. Създаване на експериментален модел на затлъстяване в продължение на 19 седмици чрез кафетерийна диета (първи етап)

Мъжки плъхчета порода Вистар (n=40) се аклиматизираха за една седмица на лабораторните условия в Катедра по фармакология и токсикология. Възрастта на плъховете бе два месеца. Всички плъхове получаваха стандартна лабораторна храна (пелети), вода и кафетерийна диета ad libitum в продължение на 19 седмици. Кафетерийната диета се състои от три високо-енергийни храни: обикновено две сладки, една солена и сладък сок всекидневно в изобилие (таблица 6) (160). Кафетерийната диета представлява добър метод за получаване на метаболитни промени, които са характерни за човека. Животните са настанени в групи по три в клетка на стайна температура от 20-22 градуса на стандартен 12ч. бодърстване-сън цикъл (07:00-19:00ч.). Телесното тегло се измерваше веднъж седмично. В края на

експеримента бяха измерени назо-аналната дължина, индекса на телесна маса, които са антропометрични параметри за определяне на затлъстяване при експериментални животни. По време на първия етап се установи екзитус на един плъх.

Таблица 6. Хранително съдържание на стандартна диета и на кафетерийна диета

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

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

Плъховете се разделят на три групи на случаен принцип. Първата група (Метформин група, n=17) се третира с Метформин в доза 250мг/кг телесна маса, разтворен в 0.5мл физиологичен разтвор. Втората група (GLP-1 група, n=11) се

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

7. Глюкооксигеназен метод

Използва се за измерване на плазмената глюкоза. Основава се на базата на глюкооксигеназната реакция. При използване на глюкоанализатор се определя само глюкозата, тъй като посредством селективни, кислородчувствителни електроди се измерва количеството на кислорода, участвал в глюкооксигеназната реакция. При варианта с колориметричен завършек на ензимната реакция (глюкооксигеназна-пероксидазна реакция) се включват още един ензим-пероксидаза и хромогени като донатори на водород.

8. Генетични методи:

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

8.2. Аналитична обработка на материала:

8.2.1. Провеждане на полимеразна верижна реакция

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

8.2.2. Директно секвениране по Sanger на намножените фрагменти

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

9. Антропометрични методи

Антропометричните измервания включват телесна маса, индекс на телесна маса, индекс на Лий (161). *Телесната маса* се измерваше сутрин, ежеседмично. *Индексът на телесна маса (ИТМ)* отразява съотношението на телесното тегло разделено на корен квадратен от ръста. За плъхчета от породата Вистар варира от 0.45-0.68 гр/см². Над тези стойности се отчита затлъстяване. *Индексът на Лий* се формира като корен квадратен от теглото (грамове) разделен на назо-аналната дължина на тялото (сантиметри). Плъхове с индекс на Лий над 0,31 се считат за затлъстели.

Б. Клинични изследвания

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

10. Характеристика на проучването

Научното изследване представлява диетологично проучване при жени с метаболитен синдром, при които се изследва ефикасността и безопасността на приложението на хранителен режим, обогатен с фруктоза. Проучването се проведе в Катедрата по фармакология и токсикология и Клиниката по ендокринология на Александровска болница, София. Пациентите постъпваха в клиниката за лечение на метаболитен синдром. Лицата, които участваха в изследването имаха индекс на телесната маса (ИТМ) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ и отговаряха на критериите за метаболитен синдром. Първоначално всички лица бяха скринирани и взеха участие тези, които покриваха включващите критерии и нито един от изключващите критерии за участие (таблица 7).

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

Таблица 7. Определяна на включващи и изключващи критерии за участие в проучване

Включващи критерии	Изключващи критерии
<ul style="list-style-type: none"> • Да са от женски пол в първа фаза на менструалния цикъл • Да имат ИТМ\geq30 кг/м² • Да отговарят на критериите за метаболитен синдром • Да имат преддиабетно състояние • Да са на възраст от 35 до 50 годишна възраст. 	<ul style="list-style-type: none"> • Лице с индекс на телесна маса (ИТМ) \geq35. • Лице със заболявания на щитовидната жлеза (лица с добре контролиран хипотиреоидизъм със заместителна терапия могат да участват). • Лице с обменни нарушения (болест на Кушинг, случаи с хипералдостеронизъм). • Лице с паренхимни увреждания (бели дробове, черен дроб, бъбреци). • Лице с ендокринни заболявания. • Лице с психиатрични заболявания. • Лице със системни инфекциозни и възпалителни заболявания. • Лице с диагностицирано злокачествено заболяване в последните 5 години. • Хранителни алергии. • Специфични диетични режими (вегетарианци, Аткинс). • Лактозна недостатъчност или друга хранителна интолерантност. • Хранителни разстройства • Бременност и лактация. • Лице на терапия с лекарства, които водят до редуция на теглото в последните 2 месеца преди началото на изследването. • Лице, провели хирургична интервенция за лечение на затлъстяването преди началото на изследването.

Таблица 8. Критерии за метаболитен синдром

<p>1. Централен тип на затлъстяване, дефинирано като обиколка на талията ≥ 80 см за жени и ≥ 94 см за мъже. Ако ИТМ е ≥ 30 кг/м², се счита, че е налично централно затлъстяване и не е необходимо измерването на обиколката на талията.</p> <p>Плюс два от следните четири критерии:</p> <p>1. Увеличени нива на триглицериди ≥ 1.7 ммол/л или лечение на патологията;</p> <p>2. Намалени нива на HDL-холестерола (1.03 ммол/л за мъже и 1.29 ммол/л за жени или лечение на патологията);</p> <p>3. Увеличено артериално налягане $\geq 130/80$ mmHg или лечение;</p> <p>4. Увеличено ниво на кръвната захар на гладно (НГГ ≥ 5.6 ммол/л) или диагностициран ЗДТ2</p>

Таблица 9. Класификация на нарушенията на въглехидратната обмяна въз основа на препоръките на ADA, IDF и WHO***

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

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

11. Антропометрични изследвания и качествен анализ на тъканите чрез биоимпеданс

В началото на прочването на всички участници бяха направени следните антропометрични измервания: Телесна маса (кг), височина (см), индекс на телесна маса (ИТМ, $\text{кг}/\text{м}^2$), обиколка на талията (см), обиколка на ханша (см), както и качествена оценка на тъканите - % на мастна тъкан, % на висцерална мастна тъкан, отношение на мастна тъкан към свободна мастна тъкан, основна обмяна, измерване на стойностите на кръвното налягане (систолично и диастолично налягане в mmHg). Освен това на пациентите беше направена пълна кръвна картина с биохимични показатели, липиден профил, както и орално глюкозо-толерантен тест (ОГТТ). Продължителността на проучването беше пет дни.

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

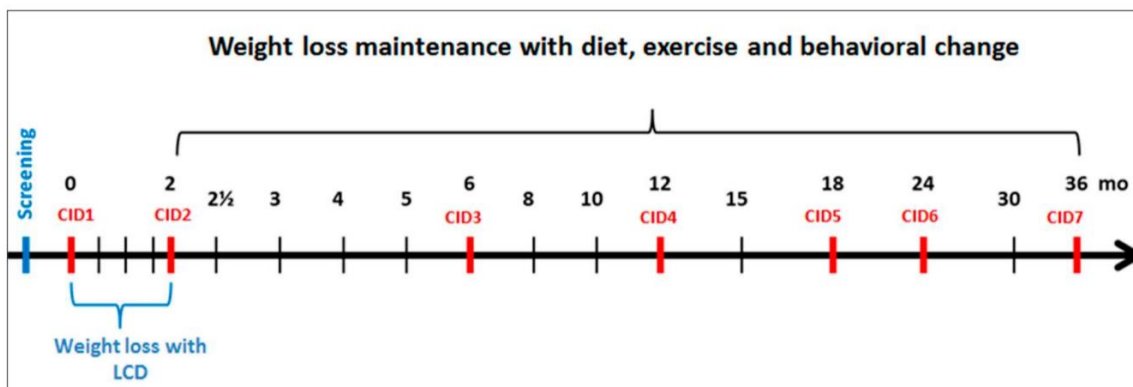
Важно е да се подчертае, че кръвните проби на пациентите се обработваха отделно за грелин, съгласно указанията на метода. За всеки пациент имаше 8 пъти определяне на грелин – 4 преди курсът на прием на фруктоза и 4 след 7 дневния прием на богата на фруктоза диета. Часовете бяха определени с оглед търсене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

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

13. Характеристика на проучването

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

Проектът се осъществи в два основни периода: 1-ви период на нискоенергийна диета с продължителност 8 седмици; 2-рият период включваше запазване на първоначалната редукция на теглото чрез различна комбинация между хранителна интервенция, физическа активност и поведенчески подход с продължителност 3 години. През различните клинично-изследователски дни (CID) 1-7 се проследяваха различни антропометрични параметри, анализ на тъканите, кръвно налягане, кръвни и биохимични показатели и други, представени на фигура 4.



Фигура 4. Етапи на проучването (скрининг; период на загуба на тегло чрез нискоенергийна диета, представени в синьо; период на поддържане на предварителната загуба на тегло чрез диета, физическа активност и поведенчески промени, представени в черно. Легенда: CID, клинично-изследователски ден, LCD, ниско-енергийна диета.

В проучването участваха 2000 доброволци (800 на възраст 25-45 години, и 1200 възрастни, 55-70 години), (таблица 10). В България проучването се проведе в Катедрата по фармакология и токсикология при общо 368 участника. При всички възрастни първо беше приложена нискоенергийна диета в продължение на 8 седмици, чиято цел беше да се постигне намаление на теглото с $>8\%$. Дневният енергиен прием беше приблизително 3,4 MJ (800 kcal), а целевият макронутриентен състав на диетата е бил 15-20 E% мазнини, 35-40 E% белтъчини (84 g белтъчини) и 45-50 E% СНО. Дневната диета се състоеше от общо 4 x 40 г сашета за заместване на храната Cambridge Weight Plan® (Cambridge Weight Plan Ltd, Великобритания), 3 от които бяха разтворени в 250 мл нискомаслено мляко (обща доза 750 мл) и 1 в 250 мл вода. Участниците, които не можеха да пият млечни продукти, можеха да изберат соево мляко или мляко без лактоза. Разрешени бяха и напитки без съдържание на енергия. Освен това можеше да се консумират максимум 400 гр зеленчуци с ниско съдържание на въглехидрати, като маруля, аспержи, броколи, целина, краставици, гъби, репички, домати и кресон.

След етапа на нискоенергийната диета участниците бяха рандомизирани произволно в две различни хранителни интервенции и две интервенции с физи-

чески упражнения с обща продължителност 148 седмици (таблица 11). **Двете хранителни интервенции** бяха: МР=умеренобелтъчна (15%) в комбинация с въглехидрати (55 Е%) с умерен до висок гликемичен индекс на храната (GI) ≥ 56 ; НР = високобелтъчна (25 Е%) в комбинация с въглехидрати (45 Е%) с нисък гликемичен индекс ≤ 50 . И при двете диети бе предвидено да се ползват здравословни храни. **Двете интервенции с физически упражнения** бяха следните: МІ = умерено интензивна: 60-75% от максималната стойност на сърдечната честота (HRmax), т.е. бързо ходене за възрастни; НІ=високо интензивна: 76-90% HRmax, т.е. бягане за възрастни. Тъй като всички участници бяха групирани произволно в една диета, както и в една група за упражнения, общият брой комбинации (интервенции-групи) беше четири (МР-МІ, МР-НІ, НР-МІ и НР-НІ).

Таблица 10. Основни характеристики на участниците в европейското научно проучване PREVIEW

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

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

Таблица 11. Характеристика на хранителните интервенции в комбинация с различна по интензитет физическа активност

	Диета с високо съдържание на белтъчини (НР) (25 E%), умерен прием на въглехидрати (45 E%) и нисък гликемичен индекс (<50)	Диета с умерено съдържание на белтъчини (МР) (15 E%), високо съдържание на въглехидрати (55 E%) и умерено висок гликемичен индекс (>56)
Физическа активност с висока интензивност (НІ)	НР-НІ (> 6 MET)	МР-НІ (> 6 MET)
Физическа активност с умерена интензивност (МІ)	НР-МІ (3-6 MET)	МР-МІ (3-6 MET)

На таблица 12 са преставени основните критерии, на които доброволците трябва да отговарят, за да бъдат включени в научно-изследователския проект.

Таблица 12. Включващи критерии

1. Възраст	25-45 години или 55-70 години
2. Наднормено тегло/ затлъстяване	ИТМ >25 kg/m ²
1. Предиабетно състояние (По критериите от Международната федерация за борба с диабета)	Нарушена глюкоза на гладно (НГГ): Плазмената глюкоза във венозната кръв 5.6-6.9 mmol/l или нарушен глюкозен толеранс (НГТ): плазмената глюкоза във венозната кръв 7.8 - 11.0 mmol/l 2 часа след пероралното приемане на 75 г глюкоза (ОГТТ). Поради възможни разлики между отделните лаборатории (местна оценка), HbA1c не се използва като критерий за включване в квалификационните изследвания.
4. Информирано съгласие	Изисква се
5. Етническа група	Без ограничения
6. Пушене	Пушенето е разрешено, при условие, че това не е промяна при участниците (от последния 1 месец).

Всички пациенти, включени в проекта, покриха всички включващи критерии и нито един изключващ. На всички участници в проекта на различни интервали по протоколите на проекта се измерваха и изследваха различни параметри.

14. Антропометрични данни и телесен състав

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

15. Орален глюкозо-толерантен тест и кръвни проби: Двучасов орален глюкозо-толерантен тест (OGTT): Всеки участник приемаше перорално 75 g глюкоза (търговски продукт) разтворена в 300 ml вода в рамките на 5 минути. По време на тази процедура участниците оставаха в полулегло състояние и в покой, като преди започването на теста не трябваше да са приемали храна (освен 1 dL вода). Не се позволяваше никакви храни и напитки (различни от даваното по време на изследването) до приключване на изследването. Вземаха се кръвни проби за измерване на глюкозата на 0-ва, 30-та, 60-та, 90-та и 120-та минута след като изпиеха течния глюкозен разтвор.

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

17. Кръвно налягане и сърдечен ритъм. Измерваше се систолно и диастолно кръвно налягане с автоматично устройство на дясната ръка 5-10 мин. по-късно, докато индивидът си почива в седнало положение. Кръвното налягане се измерваше три пъти с интервал от 1 минута между измерванията, а отбелязването се извършваше с точност до 1 mmHg. Прилагаше се средната стойност между тези три измервания. През последните 12 часа преди измерването не се позволяваше енергичната физическа активност, употребата на кафе или тютюнопушенето.

Уредът трябваше да се поддържа и калибрира редовно (поне веднъж годишно). Измерваше се сърдечният ритъм в покой.

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

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

18. Характеристика на изследването

Научното изследване беше планирано в четири етапа: Първият етап включваше подбор на лица с високостепенно затлъстяване, които са подходящи за бариатрична/ метаболитна операция (Таблица 13). Вторият етап включваше измерване на антропометричните параметри и телесен състав, както и взимане на кръв за изследване на следните хормони, които регулират апетита и метаболизма (лептин, адипонектин, глюкагон-подобен пептид 1, пептид YY, грелин) на пациенти с високостепенно затлъстяване преди бариатричната операция. Третият етап включваше измерване на антропометричните параметри и телесен състав, както и взимане на кръв за изследване на следните хормони, които регулират апетита и метаболизма (лептин, адипонектин, пептид YY, грелин) на същите пациенти един месец след бариатричната операция. Четвъртият етап включваше измерване на плазмените нива на лептин, адипонектин, пептид YY и грелин в проби преди и след хирургичната интервенция чрез ELISA методика, както и статистическа обработка на данните и анализ на получените резултати.

Таблица 13. Критерии за бариатрична/ метаболитна хирургия*

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

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

На таблица 14 са представени характеристиките на пациентите преди бариатричната интервенция.

Таблица 14. Основни характеристики на пациентите (n=20)

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

Данните са представени като средна стойност ± стандартно отклонение.

19. Използвани методи по време на научно-изследователския проект

19.1. Антропометрични данни и телесен състав

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

19.2. Кръвни проби на гладно

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

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

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

20. Характеристика на изследването (отделните методи са описани по-горе)

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

подобен хормон-1, пептид YY3-36 и холецистокинин) и на адипокините (лептин и адипонектин) чрез ELISA методика, анализ на резултатите.

21. Оценка на хранителен прием

21.1. Оценяване на въздържанието от храна. Въздържанието от храна означава **самоконтрол над храненето**. Ограниченията в храненето могат да се характеризират като променливи или постоянни. Използвахме пълната версия на Въпросника за трифакторното хранене (TFEQ), за да оценим всички характеристики на въздържанието от храни, както бе обяснено по-горе. Въпросниците за трифакторното хранене се връщаха лично на техническото лице, ангажирано в изследването, което незабавно ги проверяваше и задаваше пояснителни въпроси, ако бе необходимо.

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

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

22. Характеристика на проучването

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

изследване на плазмените нива на проинфламаторните адипокини (апелин, резистин и аполипопротеин М) от проби преди и шест месеца след бариатрична/ метаболитна хирургия.

23. Статистически анализ. Данните от всички експерименти (експериментални и клинични) бяха анализирани и представени графично със софтуер SPSS, v. 21 и GraphPad. Получените резултати са обработени статистически и представени като средна стойност \pm стандартно отклонение посредством методите на дисперсионния анализ (one-way ANOVA)

23.1. Описателни методи: Вариационен анализ на количествени променливи – средна, стандартно отклонение, стандартна грешка на средна при 95% доверителен интервал; графично изобразяване на данните.

23.2. Методи за проверка на статистически хипотези: Използваното на ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ или *** $p < 0.001$.

23.3. Параметрични (при нормално разпределение на данните): Student t-тест за две независими извадки – за сравняване на средните между две независими групи; Непараметрични (при неправилно разпределение на данните).

23.4. Метод на Kolmogorov-Smirnov – за проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива.

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

4. РЕЗУЛТАТИ

А. Експериментални проучвания

І. Сравнително изследване на ефекта на две лекарства (Метформин и Емпаглифлозин) върху хормоните, които регулират апетита при експериментално индуцирани модели на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза

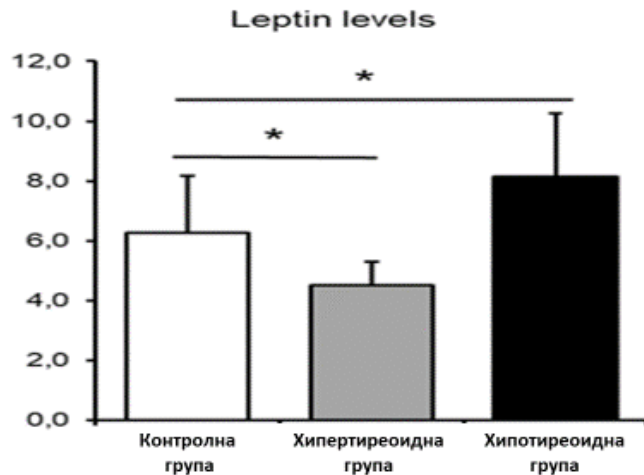
За целите на изследването бяха проследени следните биохимични показатели TSH, fT3 и fT4 за определяне на функцията на щитовидната жлеза. Счита се, че показателят TSH е скринингов маркер за състоянието на жлезата. Резултатите демонстрират създаването на двата експериментални модела на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза (таблица 15).

Таблица 15. Промяна в хормоните, свързани с функцията на щитовидната жлеза при експериментален модел на хипо- и хиперфункция

Показател (средни стойности)	Контролна група	Модел на хипофункция на щитовидната жлеза	Модел на хиперфункция на щитовидната жлеза	Статистическа значимост
TSH (ng/ml)	1.08	20.49	1.05	* p< 0.05
ft3 (ng/ml)	2.08	2.07	2.54	няма
fT4 (ng/ml)	1.74	2.53	2.32	* p< 0.05

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

Резултатите показват, че хипотиреоидизмът е свързан с по-високи нива на лептин в кръвта, на което би могло да се дължат последващите метаболитни промени, характерни за състоянието, ($p < 0.05$), (фигура 5).



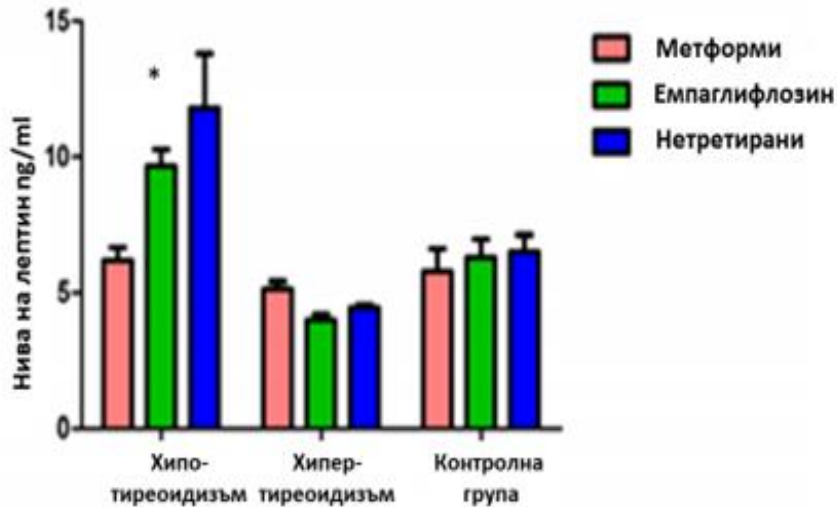
Фигура 5. Оценка на средни стойности на лептин в трите групи. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, ($*p < 0.05$).

След индуцирането на тиреоидната дисфункция, експерименталните мъжки плъхове порода Вистар във всяка група бяха разделени съответно на три подгрупи:

1. модел на хиперфункция на щитовидната жлеза на група 1.1, третирани с Метформин, група 1.2, третирани с Емпаглифлозин и група 1.3- контролна група;
2. модел на хипофункция на щитовидната жлеза на група 2.1, третирани с Метформин, група 2.2, третирани с Емпаглифлозин и група 2.3- контролна група;
- и 3. контролната група на група 3.1, третирани с Метформин, група 3.2, третирани с Емпаглифлозин и група 3.3- контролна група.

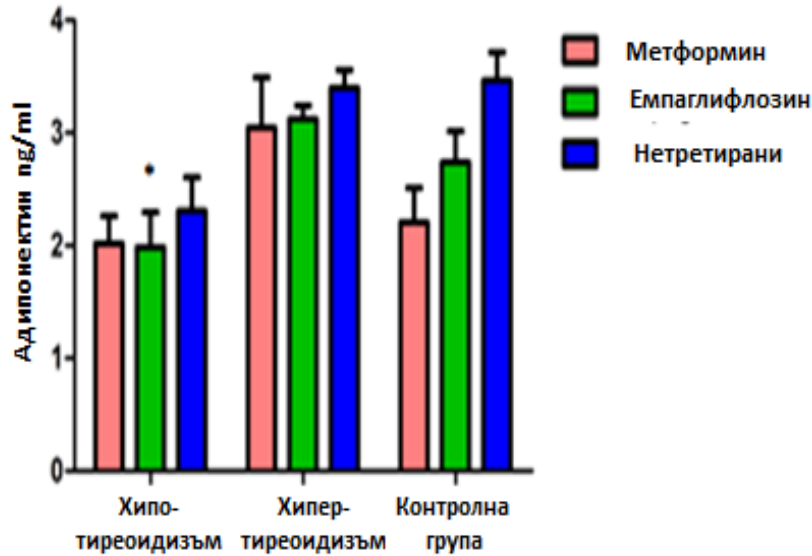
В изследването беше проучено влиянието на Метформин и Емпаглифлозин върху серумните концентрации на адипокините (лептин и адипонектин), както и върху грелина при моделите на хипо- и хиперфункция на щитовидната жлеза при мъжки плъхове порода Вистар. Резултатите демонстрират промени в серумните концентрации на лептин след третирането Емпаглифлозин в продължение на един месец в трите групи (хипотиреоидизъм, хипертиреоидизъм и контрола), (фигура 6). В групата с хипотиреоидизъм се наблюдава статистическо значимо понижение на

серумните концентрации на лептин вследствие терапията, както с Емпаглифлозин, така и с Метформин в сравнение с нетретиранта група ($p < 0.05$), (фигура 6).



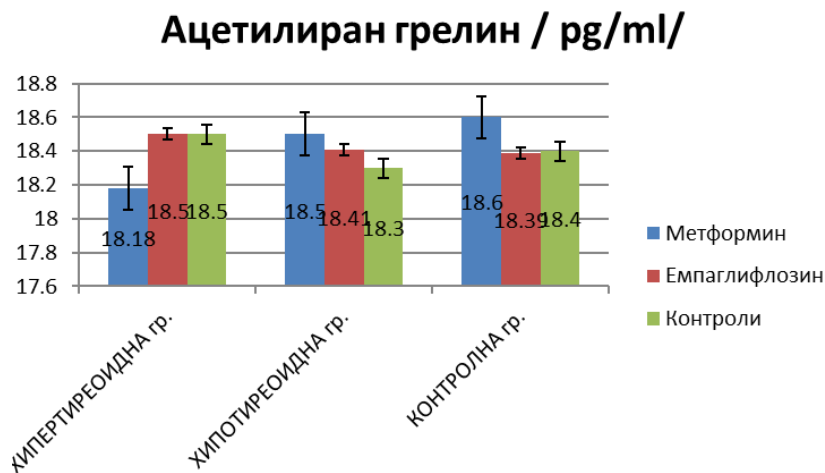
Фигура 6. Серумни нива на лептин (ng/ml) в двете групи с тиреоидна дисфункция и контролна група, с приложена терапия с Метформин и Емпаглифлозин. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, * $p < 0.05$.

Още повече, третирането с Емпаглифлозин и Метформин на експерименталните плъхове с хипотиреоидизъм води до статистически значимо намаляване на серумните нива на адипонектин в сравнение с нетретираните животни с хипотиреоидизъм, $p < 0.05$, (фигура 7). Такъв ефект не се наблюдава в останалите две групи.



Фигура 7. Серумни нива на адипонектин ($\mu\text{g/ml}$) в двете групи с тиреоидна дисфункция и контролна група, с приложена терапия с Метформин и Емпаглифлозин. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, $*p < 0.05$.

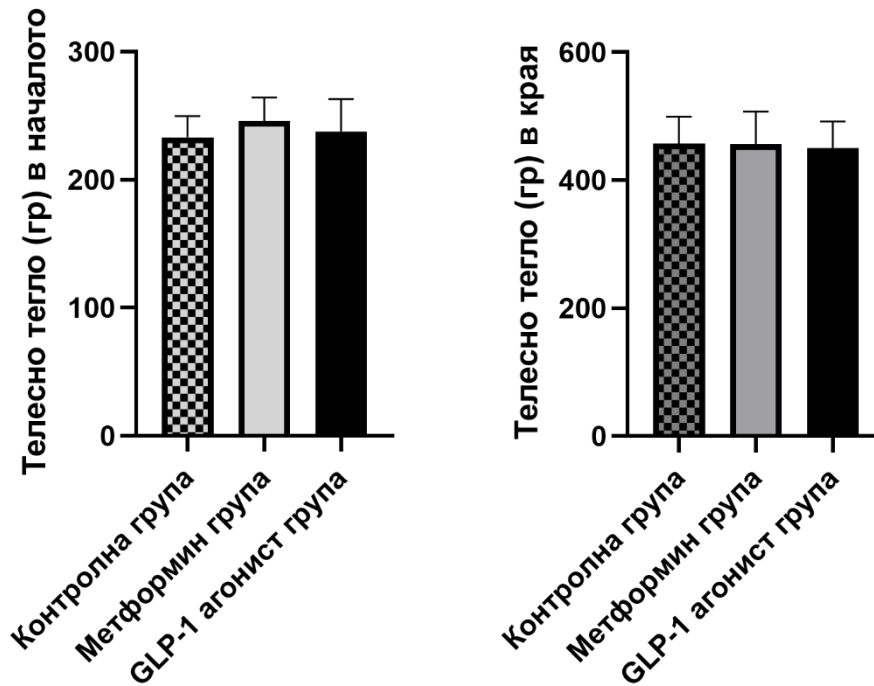
Не се установи значителна промяна в нивата на ацетилиран грелин, вследствие третирането с Метформин и Емпаглифлозин в трите изследвани групи (фигура 8).



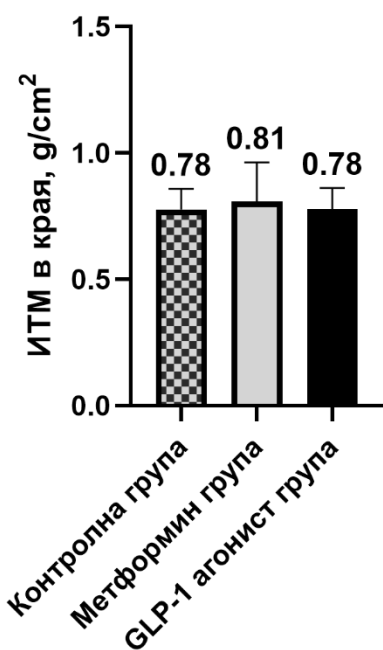
Фигура 8. Серумни нива на грелин (pg/ml) в двете групи с тиреоидна дисфункция и контролна група, с приложена терапия с Метформин и Емпаглифлозин. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

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

Първи етап: Създаване на модел на експериментално затлъстяване чрез кафетерийна диета в продължение на 19 седмици



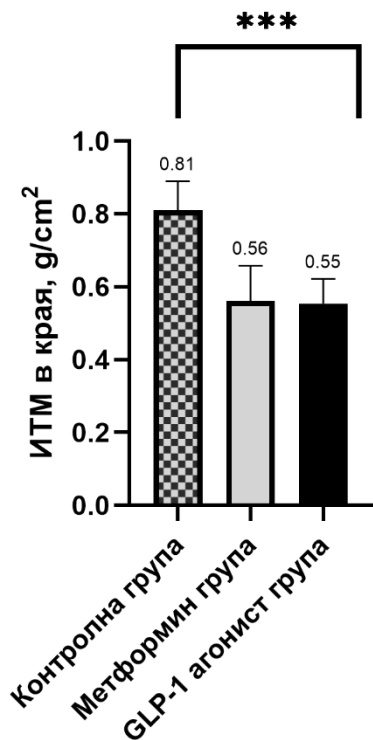
Фигура 9. Телесна маса (гр) в трите групи в началото и в края на 19-седмичния модел на експериментално затлъстяване. Данните да представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.



Фигура 10. Индекс на телесна маса (ИТМ, гр/ см²) в края на 19-седмичния модел на експериментално затлъстяване. Данните да представени като средна стойност ± стандартно отклонение.

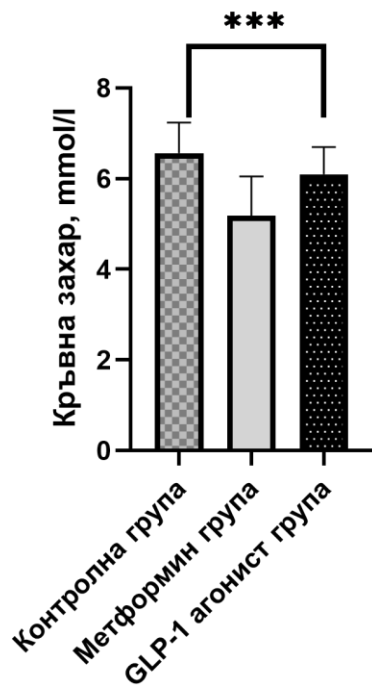
Вторият етап на изследването включваше проследяването на ефекта на Метформин и Лираглутид върху антропометрични и биохимични параметри в продължение на шест седмици. Плъховете бяха разпределени на случаен принцип в три групи: контролна група (n=11), група, третирана с Метформин (n=17) и група, третирана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

Резултатите демонстрират статистически значимо намаляване на ИТМ след третиране с Метформин и Лираглутид в продължение на шест седмици в сравнение с контролната група (p= 0.0001), (фигура 11).



Фигура 11. Индекс на телесна маса (ИТМ, гр/ см²) в края на втория етап на изследването. Данните да представени като средна стойност ± стандартно отклонение, ***p= 0.0001.

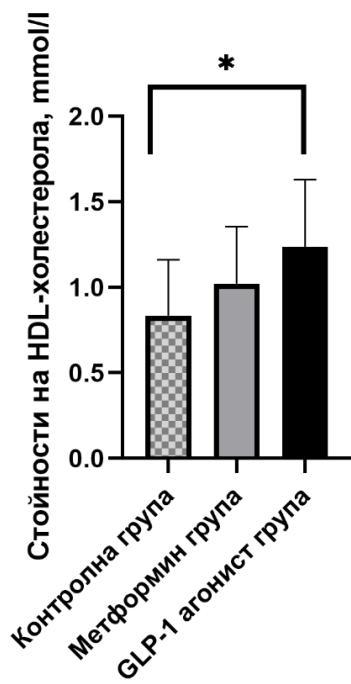
Наблюдаваха се промени и в биохимичните параметри. На фигура 12 са представени промените в нивата на кръвната захар в трите групи. Прави впечатление мощният намаляващ ефект на Метформин и Лираглутид върху плазмените нива на кръвна захар, p= 0.0001. Средните стойности (ммол/л) на кръвна захар в трите групи са: в контролна група - 6.6 ± 0.7 (най-нисък 95% CI of mean 6.1 – най-висок 95% CI of mean 7); в групата, третирана с Метформин 5.2 ± 0.9 (най-нисък 95% CI of mean 4.7 - най-висок 95% CI of mean 5.6) и в групата, третирана с Лираглутид 5.7 ± 0.6 (най-нисък 95% CI of mean 5.7- най- висок 95% CI of mean 6.5).



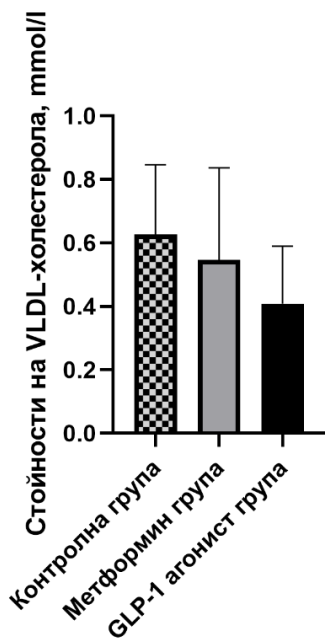
Фигура 12. Серумни стойности на кръвната захар (mmol/l). Данните да представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, *** $p=0.0001$.

Данните показват значително повишаване на серумните нива на HDL-холестерола след третиране с Метформин и Лираглутид, $p=0.03$ (фигура 13). Средните серумни нива на HDL-холестерол в контролата, групите на Метформин и Лираглутид бяха $0,8 \pm 0,3$ (най-нисък 95% CI of mean 0,6 - най- висок 95% CI of mean 1,1), $1 \pm 0,3$ (най-нисък 95% CI of mean 0,8 - най- висок 95% CI of mean 1,2) и $1,2 \pm 0,4$ (най-нисък 95% CI of mean 0,1 - най- висок 95% CI of mean 1,5), съответно.

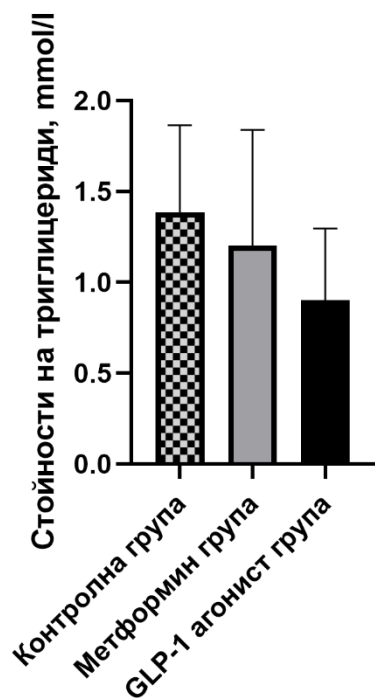
Не се установи промяна в серумните концентрации на VLDL-холестерола и триглицеридите след третирането с Метформин и Лираглутид (фигури 14-15).



Фигура 13. Серумни стойности на HDL-холестерола (mmol/l). Данните да представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, * $p=0.03$ в сравнение с двете третиранни групи.



Фигура 14. Серумни стойности на VLDL-холестерола (mmol/l). Данните да представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.



Фигура 15. Серумни стойности на триглицеридите (mmol/l). Данните да представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

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

Б. Клинични проучвания

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

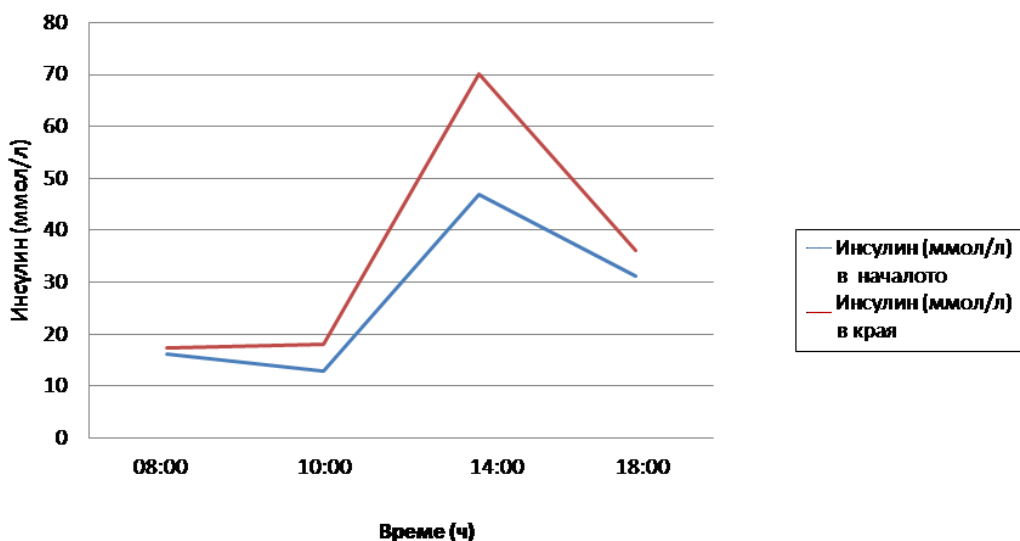
Таблица 16. Характеристики на участниците в началото на диетологичното проучване

Параметър	Брой пациенти	Средна стойност ± Стандартна грешка на средната
Възраст (години)	N= 9	34.8 ± 2.1
Телесна маса (кг)	N= 9	83.2 ± 1.8
Височина (см)	N= 9	159.6 ± 1.8
ИТМ (кг/м ²)	N= 9	32.7 ± 0.5
Обиколка на талията (см)	N= 9	93.6 ± 2.2
Обиколка на ханша (см)	N= 9	107.4 ± 2.2
Систолно кръвно налягане (mmHg)	N= 9	124.4 ± 1.5
Диастолно кръвно налягане (mmHg)	N= 9	81.1 ± 0.7
Мастна тъкан (кг)	N= 9	33.8 ± 1.4
Свободна мастна тъкан (кг)	N= 9	47.9 ± 1.5

Таблица 17. Биохимични показатели на участниците в диетологичното проучване

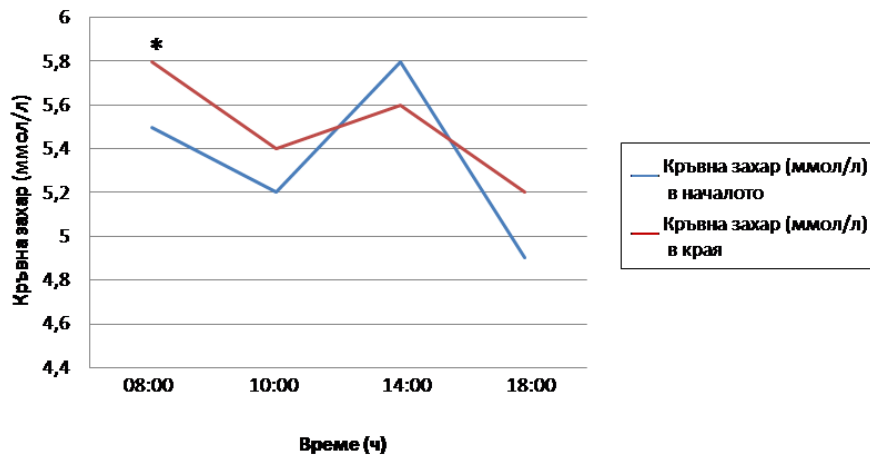
Параметър	Брой пациенти	Средна стойност ± Стандартна грешка на средната
Триглицериди (mmol/l)	N= 9	1.1 ± 0.1
HDL-холестерол (mmol/l)	N= 9	1.1 ± 0.2
LDL-холестерол (mmol/l)	N= 9	2.94 ± 0.2
Пикочна киселина	N= 9	276 ± 21.9
ASAT	N= 9	24 ± 7.4
ALAT	N= 9	30 ± 10.3
ОГТТ 0'	N= 9	4.2 ± 0.2
ОГТТ 60'	N= 9	7.9 ± 0.5
ОГТТ 120'	N= 9	5.2 ± 0.9

Средните стойности на инсулин в кръвта на гладно не се различаваха между началото и края на проучването (фигура 16). Установихме по-високо плазмени концентрации на инсулин през последния ден на проучването (ден 5) в сравнение с първия ден на проучването (ден 1) с пик на инсулинова секреция в 14ч.



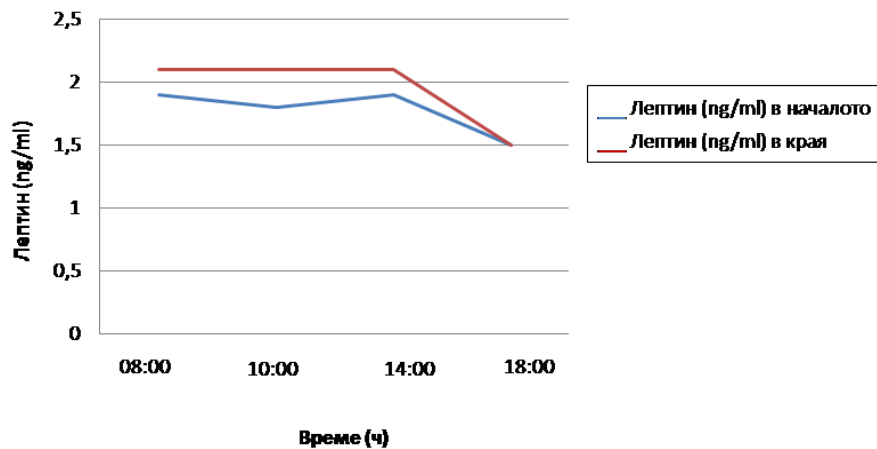
Фигура 16. Плазмени нива на инсулин ($\mu\text{U}/\text{mL}$) в началото и в края на диетологичното проучване при жени с метаболитен синдром.

Установихме различни стойности на плазмените нива на захарта на гладно в началото и в края на изследването (5.5 ± 0.3 ммол/л, ден 1 vs. 5.8 ± 0.3 ммол/л, ден 5, $p < 0.05$), (фигура 19). Нивата на кръвната захар не се повлияха статистически значимо след субхроничния прием на фруктоза в сравнение със стойностите на глюкозата в началото на диетологичното проучване (фигура 17).



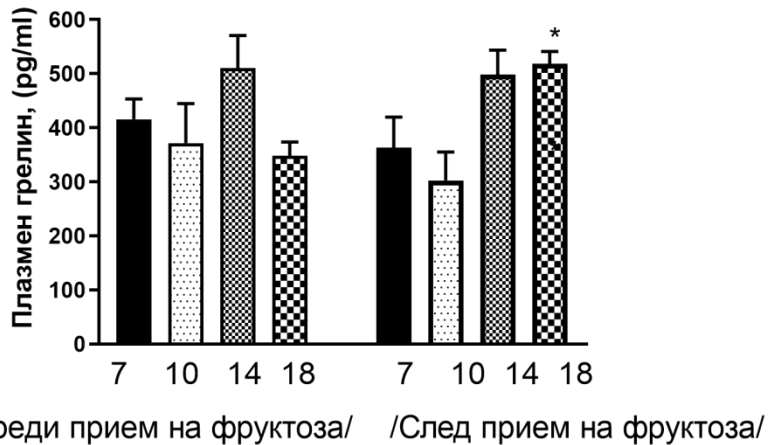
Фигура 17. Плазмени нива на кръвна захар (ммол/л) в началото и в края на диетологичното проучване при жени с метаболитен синдром. Данните са представени като средна стойност, * $p < 0.05$.

Резултатите показваха, че няма промяна в нивата на лептин в кръвта след прием на фруктоза между началото и края на изследването (фигура 18).



Фигура 18. Плазмени нива на лептин (ng/ml) в началото и в края на диетологичното проучване при жени с метаболитен синдром.

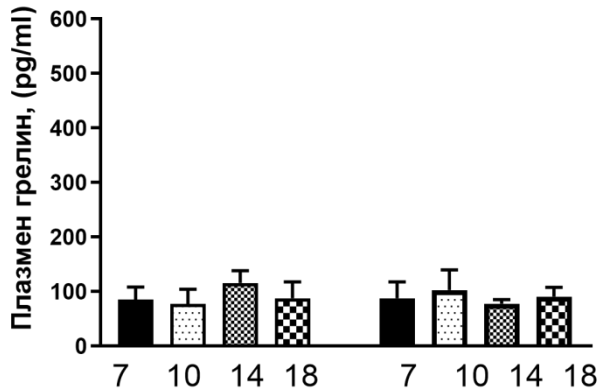
Данните демонстрираха, че всеки от пациентите има своя характеристика на дневни и сутрешни нива на грелин в плазма, което се определя от много фактори, вкл. индивидуалните особености на хранене на пациента преди включване в проучването. Първата група от пациенти със затлъстяване, които показаха високи нива на грелин в плазмата сутрин в 7.00 часа на гладно и чиито нива оставаха високи през целия ден преди приема на диета богата на фруктоза. На фигура 19 са представени резултатите, които показват и при четиримата пациенти увеличаване на грелин в плазма в 18 часа след диета с фруктоза. Грелин запази високи нива в плазмата при пациентите. При двама от пациентите нивата на грелин след фруктоза бяха с 50% увеличени сутрин в 7.00 в сравнение с тези преди фруктоза.



Фигура 19. Плазмени нива на грелин при пациенти със затлъстяване и високи начални сутрешни, дневни и вечерни нива на хормона преди стартиране на диета богата на фруктоза. Легенда: Грелин е определян сутрин в 7.00 на гладно, в 10.00, след обяд в 14.00 и вечер в 18.00 часа, съответно деня преди започване на диетата и деня след завършване на диетата.

Втората група пациенти със затлъстяване показаха ниски нива на плазмен грелин сутрин на гладно преди диетата с фруктоза. При всичките грелин беше 2-3 пъти по-нисък от пациентите на първата група. Резултатите са представени на фигура 20. При пациентите от втора група грелин оставаше нисък целия ден преди стартиране на диета с фруктоза. Ниските нива на грелин се запазиха и след диетата

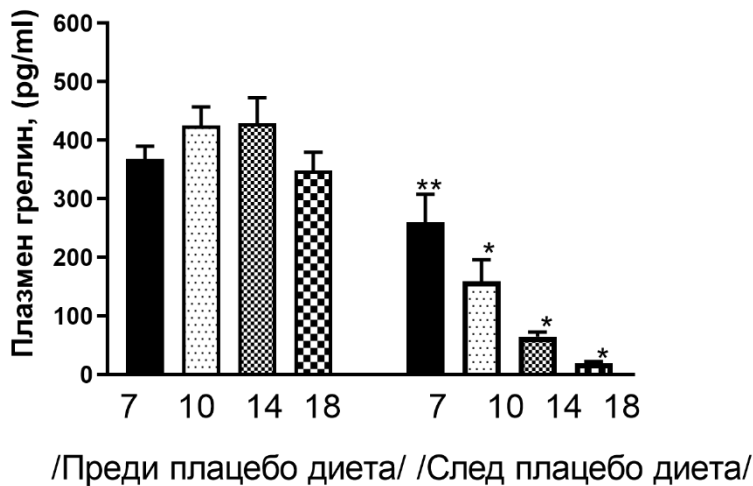
с фруктоза при всичките пациенти. Няма статистически значими промени в нивата на грелин на всяко измерване след третиране с фруктоза в сравнение със съответните преди третиране.



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

Фигура 20. Плазмени нива на грелин при пациенти със затлъстяване и ниски начални сутрешни, дневни и вечерни нива на хормона преди стартиране на диета богата на фруктоза. Легенда: Грелин е определян сутрин в 7.00 на гладно, в 10.00, след обяд в 14.00 и вечер в 18.00 часа, съответно деня преди започване на диетата и деня след завършване на диетата.

Трета група пациенти (двама) не бяха поставени на фруктоза поради откриване в първия ден на прием на непоносимост към фруктозата. Те обаче бяха на диетата на останалите пациенти с ограничаване на калорийния внос на храната но без фруктоза. Тази група е контрола, като за плацебо те имаха ниско калориен сок без фруктоза. Резултатите са показани на фигура 21. Пациентите постъпиха с високи плазмени нива на грелин при всички измервания преди поставяне на диета. Те бяха близки до тези на първа група пациенти със затлъстяване. След периода на диета се отчете значимо намаляване на плазмените нива на хормона.



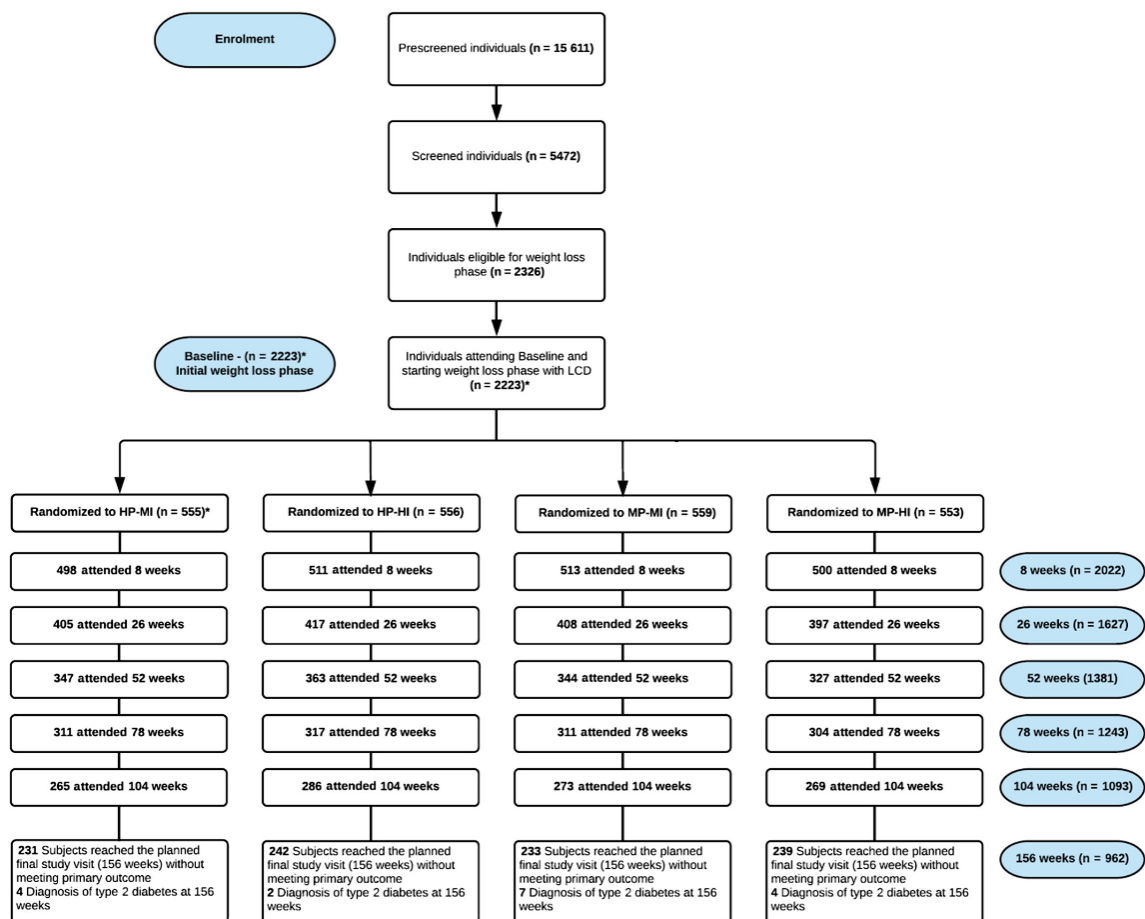
Фигура 21. Плазмени нива на грелин при контролната-плацебо група пациенти със затлъстяване. Легенда: Грелин е определян сутрин в 7.00 на гладно, в 10.00, след обяд в 14.00 и вечер в 18.00 часа, съответно деня преди започване на диетата и деня след завършване на диетата

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

След скрининга на пациенти бяха включени общо 2 326 лица, които бяха рандомизирани в проучването с n=555, n=556, n=559 и n=553 за групите НР-МІ, НР-НІ, МР-МІ и МР-НІ, съответно. В периода между рандомизацията и CID1 102 участници бяха напуснали проучването, главно поради оттегляне на съгласието по лични причини (таблица 18). Така общо 2224 пациенти бяха участвали в CID1 и са започнали фазата на нискоенергийната диета. Поради това в анализите на данните от CID1 бяха включени 2223 пациенти. След фазата на нискоенергийния режим 122 лица не са загубили ≥ 8 % телесната маса и следователно не са могли да продължат във фазата на поддържане на теглото. Други 79 лица не участваха в CID2, главно поради оттегляне на съгласието по лични причини. Седем лица бяха диагностицирани с ЗДТ2 на CID1 и поради това бяха изключени от изпитването. Общо 2 022 лица са участвали в CID2. От тях 1 857 отговаряха на критериите за

продължаване на фазата на поддържане на теглото. Общо 1 381 участници са завършили 1 година, 1 093 са завършили 2 години и 962 са завършили 3-годишната интервенция (n = HP-MI: 235, HP-HI: 244, MP-MI: 240, MP-HI: 243). По този начин 1261 (или 54%) от всички рандомизирани лица (n=2326) са прекъснали участието си през 3-те години. Процентът на отпадане е бил сходен в четирите интервенционни групи (таблица 18).

Таблица 18. Диаграма на проучването



Изходните характеристики на антропометричните оценки и кръвните анализи бяха сходни в четирите групи за интервенция. Жените представляваха 67,6 % от изследваната популация. Средната възраст е $51,4 \pm 11,6$ години (\pm стандартно отклонение) (в диапазон 25 - 70 години), Телесна маса $100,1 \pm 21,4$ kg, ИТМ $35,4 \pm$

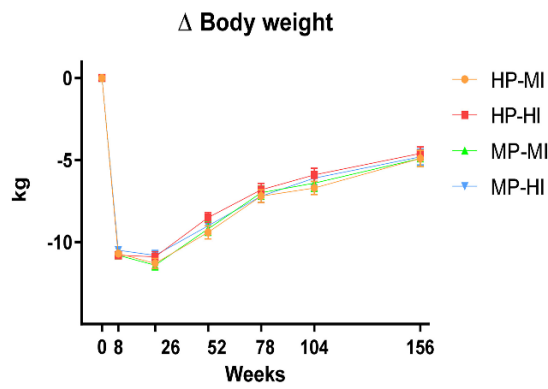
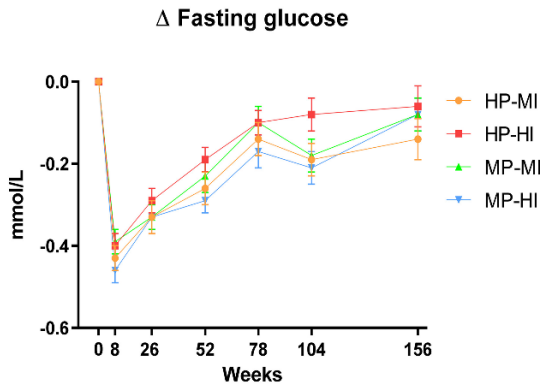
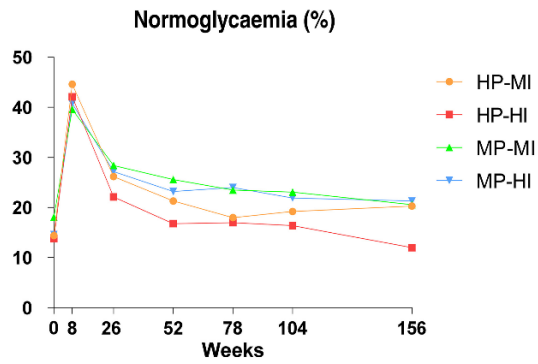
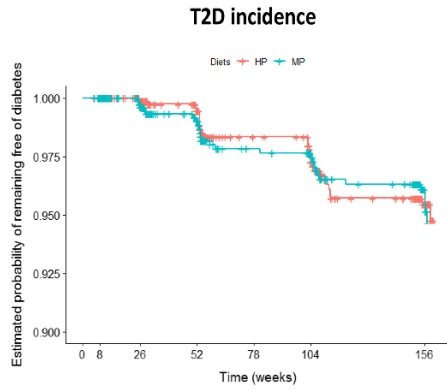
6,6 кг/м², плазмена глюкоза на гладно 6,2 ± 0,7 ммол/л, 2-часова натоварване 7,7 ± 2,3 mmol/l и HbA1c 36,7 ± 4,1 ммол/л.

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

Телесната маса е намаляла с 11% след нискоенергийната фаза (p= 0,001). Допълнително малко намаление на телесното тегло е наблюдавано на шест месеца (4 месеца след фазата на поддържане на теглото). След 3 години средната промяна при завършилите интервенцията е -4,8 kg (-6,1 до -3,4 kg, n = 962) или -5% от първоначалната телесна маса, което е значително различно от изходното ниво във всички интервенционни групи. По отношение на мастната маса (ММ) се установи подобна картина като телесното тегло, докато свободната мастна тъкан остана на ниво, подобно на това след нискоенергийната фаза (таблица 19). Не се наблюдаваха взаимодействие или разлики между интервенционните групи в нито един момент.

Таблица 19. Промени в антропометричните и биохимични параметри в изследваните четири интервенционни групи

	Group	8 weeks (n=2022)	26 weeks (n=1627)	52 weeks (n=1381)	104 weeks (n=1093)	156 weeks (n=962)	P-value for interaction#	P-value for time	P-value for group
ΔBMI, kg/m ²	HP-MI	-3.8 (-4.2 to -3.4)	-3.9 (-4.5 to -3.4)	-3.2 (-3.9 to -2.6)	-2.3 (-2.9 to -1.6)	-1.6 (-2.1 to -1.1)	0.7257	< 0.00001	0.8971
	HP-HI	-3.8 (-4.2 to -3.4)	-3.8 (-4.3 to -3.3)	-2.9 (-3.6 to -2.3)	-2.0 (-2.6 to -1.3)	-1.6 (-2.1 to -1.1)			
	MP-MI	-3.8 (-4.1 to -3.4)	-3.9 (-4.4 to -3.4)	-3.2 (-3.8 to -2.5)	-2.1 (-2.8 to -1.5)	-1.7 (-2.2 to -1.2)			
	MP-HI	-3.8 (-4.1 to -3.4)	-3.9 (-4.4 to -3.4)	-3.2 (-3.8 to -2.5)	-2.1 (-2.7 to -1.5)	-1.7 (-2.2 to -1.2)			
ΔFat mass, kg	HP-MI	-7.7 (-8.7 to -6.7)	-9.2 (-10.3 to -8.2)	-7.4 (-8.8 to -6.0)	-4.8 (-6.6 to -3.0)	-3.4 (-4.5 to -2.2)	0.9641	< 0.00001	0.9118
	HP-HI	-7.9 (-8.9 to -7.0)	-9.0 (-10.1 to -7.9)	-6.9 (-8.3 to -5.5)	-4.0 (-5.9 to -2.2)	-2.9 (-4.0 to -1.8)			
	MP-MI	-7.7 (-8.7 to -6.8)	-9.0 (-10.1 to -7.9)	-7.2 (-8.6 to -5.8)	-4.4 (-6.3 to -2.6)	-2.9 (4.1 to -1.8)			
	MP-HI	-7.9 (-8.8 to -6.9)	-9.0 (-10.1 to -7.9)	-7.2 (-8.6 to -5.8)	-4.3 (-6.2 to -2.5)	-2.9 (-4.1 to -1.8)			
ΔFat free mass, kg	HP-MI	-2.8 (-3.7 to -1.9)	-1.9 (-2.7 to -1.2)	-1.6 (-2.3 to -0.9)	-1.6 (-2.4 to -0.8)	-1.5 (-2.3 to -0.6)	0.42365	< 0.00001	0.6784
	HP-HI	-2.8 (-3.7 to -1.9)	-1.6 (-2.4 to -0.8)	-1.4 (-2.1 to -0.7)	-0.9 (-1.7 to -0.1)	-1.5 (-2.3 to -0.7)			
	MP-MI	-2.8 (-3.7 to -1.9)	-1.9 (-2.7 to -1.2)	-1.6 (-2.3 to -0.8)	-1.3 (-2.1 to -0.5)	-1.4 (-2.3 to -0.6)			
	MP-HI	-2.7 (-3.6 to -1.8)	-1.7 (-2.4 to -0.9)	-1.4 (-2.2 to -0.7)	-1.1 (-1.9 to -0.3)	-1.7 (-2.5 to -0.8)			
ΔWaist circumference, cm	HP-MI	-9.7 (-10.7 to -8.7)	-10.4 (-12.3 to -8.5)	-7.8 (-9.9 to -5.8)	-5.7 (-7.6 to -3.7)	-3.9 (-5.8 to -1.9)	0.1319	< 0.00001	0.7329
	HP-HI	-9.8 (-10.8 to -8.8)	-9.7 (-11.6 to -7.8)	-7.2 (-9.3 to -5.2)	-4.5 (-6.4 to -2.5)	-3.3 (-5.3 to -1.4)			
	MP-MI	-9.6 (-10.6 to -8.6)	-9.9 (-11.8 to -8.0)	-8.3 (-10.3 to -6.2)	-5.0 (-7.0 to -3.0)	-3.3 (-5.2 to -1.4)			
	MP-HI	-9.3 (-10.4 to -8.3)	-9.8 (-11.7 to -7.9)	-8.0 (-10.0 to -5.9)	-5.1 (-7.0 to -3.1)	-2.6 (-4.5 to -0.7)			
ΔHip circumference, cm	HP-MI	-7.3 (-7.9 to -6.7)	-7.6 (-8.9 to -6.3)	-5.9 (-7.4 to -4.4)	-3.6 (-5.5 to -1.7)	-2.0 (-3.5 to -0.5)	0.1896	< 0.00001	0.8933
	HP-HI	-7.1 (-7.7 to -6.5)	-7.4 (-8.7 to -6.1)	-4.9 (-6.4 to -3.4)	-3.0 (-4.9 to -1.1)	-2.3 (-3.8 to -0.8)			
	MP-MI	-7.1 (-7.7 to -6.5)	-7.7 (-9.0 to -6.4)	-5.7 (-7.2 to -4.2)	-3.2 (-5.1 to -1.3)	-2.3 (-3.8 to -0.8)			
	MP-HI	-7.1 (-7.7 to -6.5)	-7.3 (-8.6 to -6.0)	-5.6 (-7.1 to -4.1)	-3.5 (-5.4 to -1.7)	-2.2 (-3.7 to -0.7)			
ΔThigh circumference, cm	HP-MI	-3.6 (-4.0 to -3.3)	-4.0 (-4.7 to -3.3)	-3.4 (-4.6 to -2.2) ^a	-2.5 (-4.1 to -1.0)	-2.4 (-3.9 to -0.9)	0.0349	< 0.00001	0.1340
	HP-HI	-3.7 (-4.0 to -3.3)	-3.6 (-4.3 to -2.9)	-2.7 (-3.8 to -1.5) ^b	-2.4 (-3.9 to -0.8) ^{ac}	-2.3 (-3.8 to -0.8)			
	MP-MI	-3.8 (-4.1 to -3.5)	-3.9 (-4.6 to -3.2) ^a	-3.2 (-4.4 to -2.0) ^{bc}	-2.5 (-4.1 to -1.0) ^a	-1.6 (-3.1 to -0.1)			
	MP-HI	-3.9 (-4.3 to -3.6)	-4.1 (-4.8 to -3.4) ^a	-3.3 (-4.5 to -2.1) ^{acd}	-2.8 (-4.4 to -1.3) ^b	-2.6 (-4.1 to -1.1)			
ΔSBP, mmHg	HP-MI	-7.8 (-10.9 to -4.7)	-6.2 (-9.1 to -3.3)	-3.5 (-5.9 to -1.2)	-2.4 (-4.4 to -0.4)	-2.2 (-4.6 to 0.1)	0.7025	< 0.00001	0.2218
	HP-HI	-7.7 (-10.8 to -4.6)	-5.1 (-8.0 to -2.2)	-3.5 (-5.9 to -1.2)	-0.4 (-2.3 to 1.5)	-0.7 (-3.1 to 1.6)			



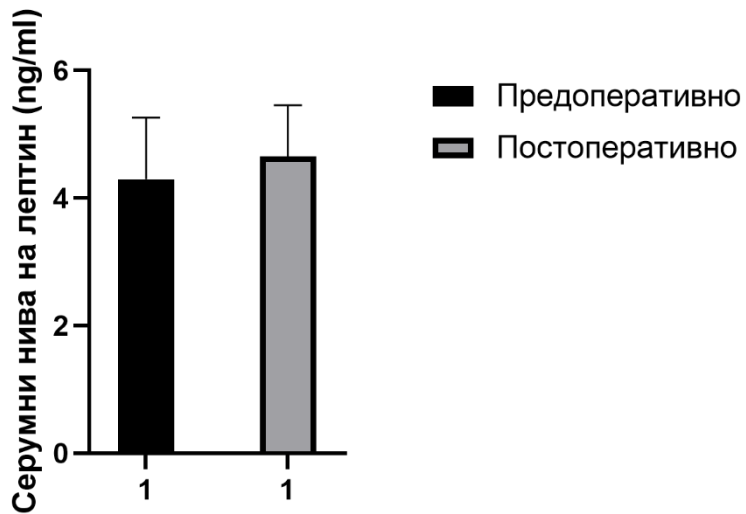
Фигури 22-25. Различни показатели (разпространение на ЗДТ2, нормогликемия, кръвна захар на гладно и телесна маса) спрямо интервенционната група.

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

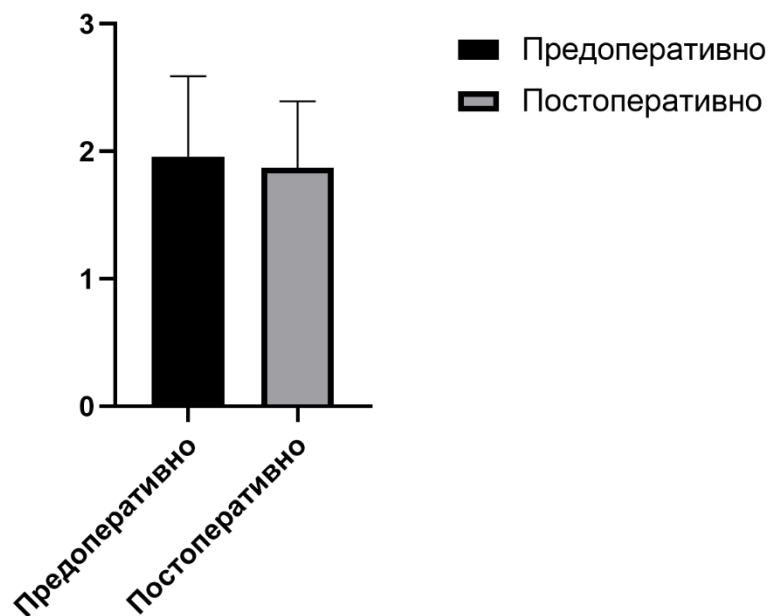
На 3 години ИТМ, обиколката на талията и бедрата не се различаваха съществено между четирите групи за интервенция. Систоличното и диастоличното кръвно налягане, както и сърдечната честота бяха значително намалени след периода на нискоенергийния режим, а сърдечната честота все още беше значително по-ниска след 3 години. Всички променливи са значително намалени след фазата на нискоенергийния режим. По време на периода на поддържане на теглото плазмената глюкоза на гладно и HbA1c постепенно се увеличиха.

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

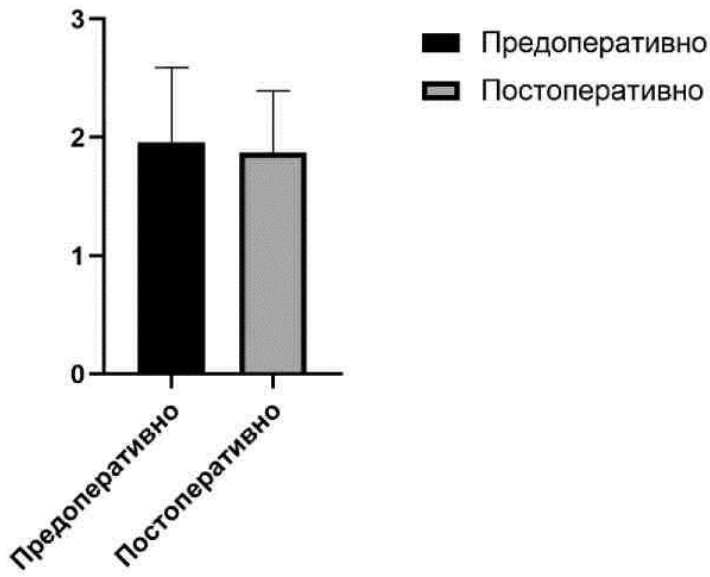
На фигури 26-30 са представени средните стойности на съответните параметри преди и един месец след бариатричната интервенция. Получените резултати не демонстрираха промяна в плазмените/ серумни нива на хормоните, регулиращи апетита (фигури 26-30). Данните от грелин не са представени, тъй като не се отчете промяна в плазмените нива на този орексигенен хормон.



Фигура 26. Серумни нива на лептин преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

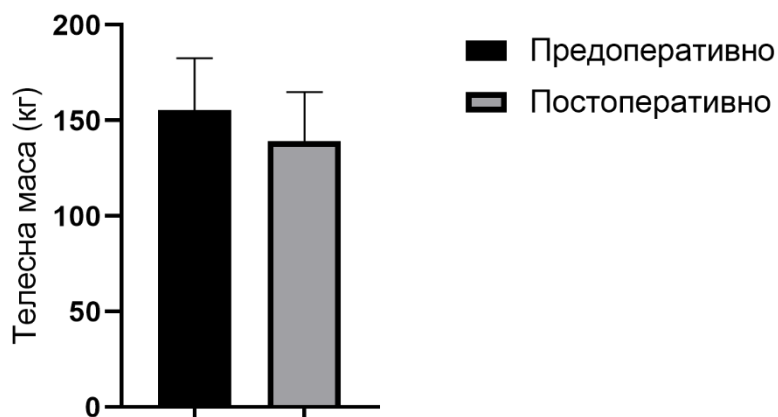


Фигура 27. Серумни нива на адипонектин преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

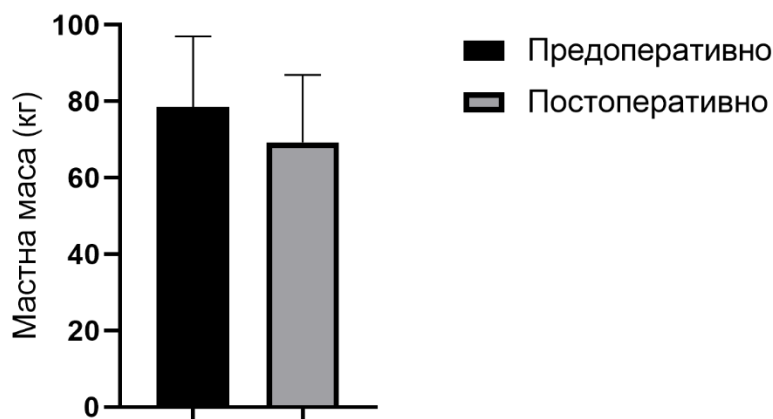


Фигура 28. Плазмени нива на PYY (3-36) преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

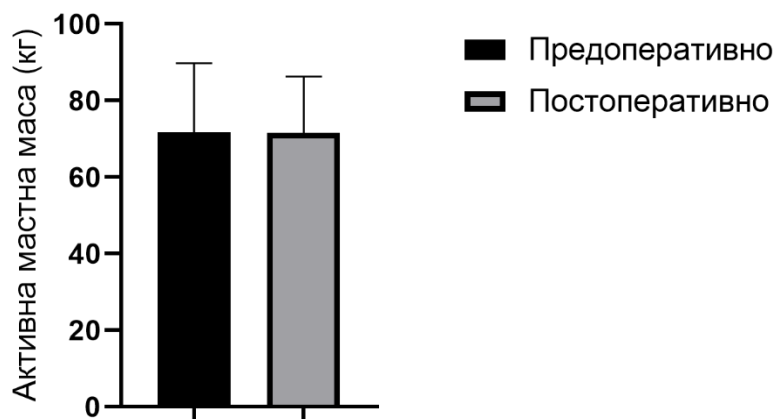
Не се установиха статистически значими разлики в стойностите на телесното тегло (кг), мастната маса (кг) и активната мастна маса (кг) на първия месец след бариатричната интервенция (фигури 29-31). Редукцията на тегло беше стандартно от 15 кг на първия месец, което подкрепи данните в литературата (фигура 29).



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



Фигура 30. Масна маса (кг) преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

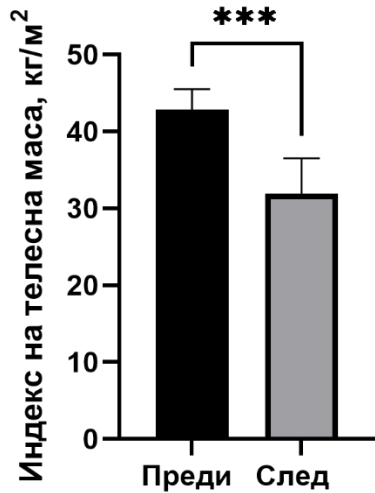


Фигура 31. Активна масна маса (кг) преди и след операцията. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

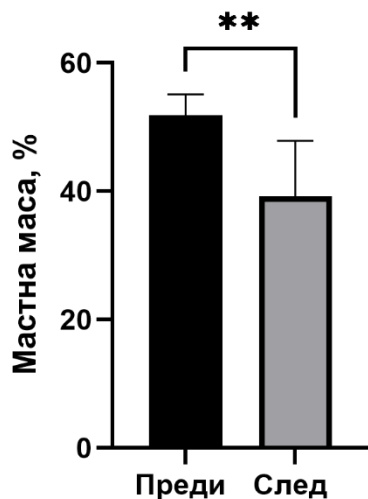
VI. Проследяване промяната във вкусовите предпочитания, мотивацията и самоконтрола при хранене и в хормоните, регулиращи апетита след бариатрична/ метаболитна хирургия

На фигури 32-35 са представени средните стойности на антропометричните параметри преди и шест месеца след бариатрична хирургия. Установиха се статистическо значимо намаление на ИТМ ($p= 0.0002$), масната маса ($p= 0.008$) и

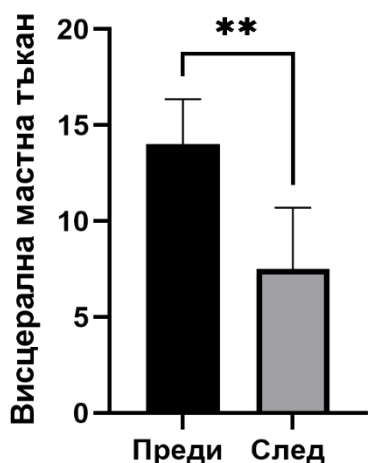
висцералната мастна маса ($p= 0.003$) след операцията в сравнение със същите параметри преди интервенцията. Не се наблюдаше статистически значима промяна на свободната мастна тъкан преди и след бариатричната/ метаболитна хирургия (фигура 35).



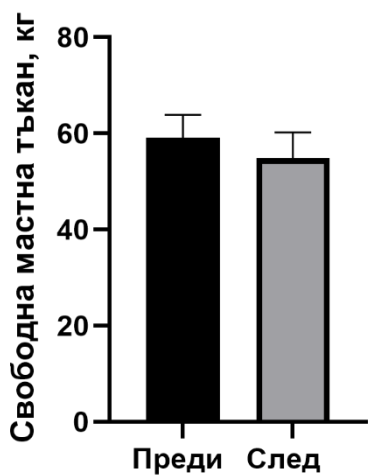
Фигура 32. Средна стойност на индекс на телесна маса (kg/m^2) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, *** $p= 0.0002$.



Фигура 33. Средна стойност на мастната маса (кг) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, ** $p= 0.008$.



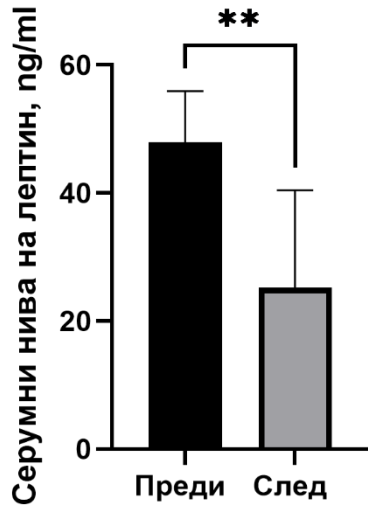
Фигура 34. Средна стойност на висцералната мастна маса (кг) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, ** $p= 0.003$.



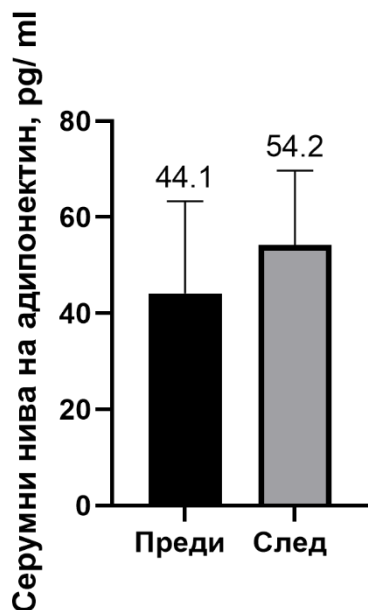
Фигура 35. Средна стойност на свободната мастна маса (кг) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

На фигури 36-39 са представени средните стойности на серумните концентрации на лептин (ng/ml), адипонектин (pg/ml), грелин (pg/ml) и холецистокинин (pg/ml) преди и шест след бариатричната хирургия. Наблюдава се статистически значимо намаление на серумните нива на лептин шест месеца след операцията

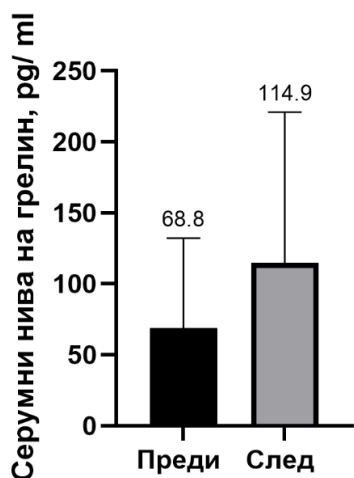
сравнено с нивата преди операцията ($p=0.001$, фигура 36). Не се установи ефект на бариатричната интервенция върху серумните нива на адипонектин и на ентералните хормони преди и след хирургичната интервенция (фигури 37-39).



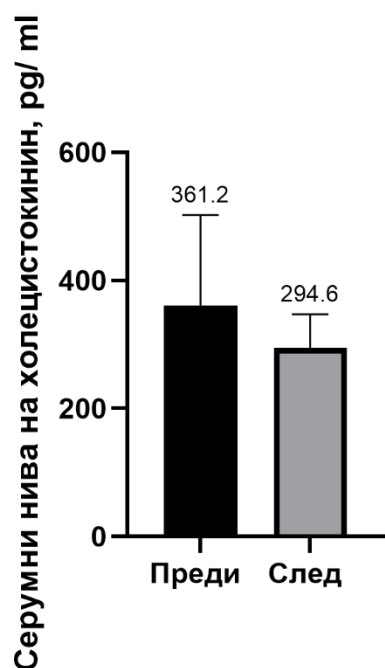
Фигура 36. Серумни нива на лептин (ng/ ml) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, $**p= 0.001$



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



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



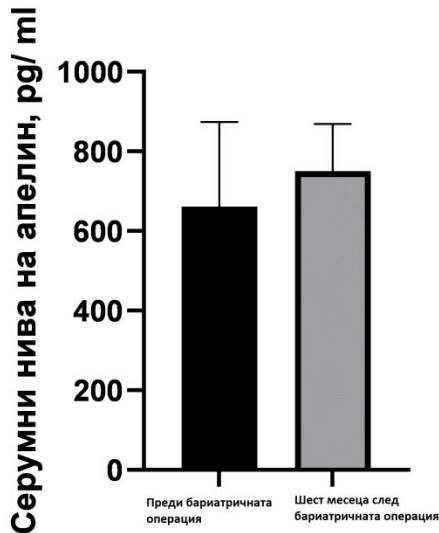
Фигура 39. Серумни нива на холецистокинин (pg/ml) преди и шест месеца след бариатрична операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

Резултатите от въздържанието от храна, оценено чрез въпросника за трифакторното хранене (TFEQ) показаха, че оценките за глад, желанието за хранене и желанието за консумация на нещо сладко бяха значително по-ниски след опера-

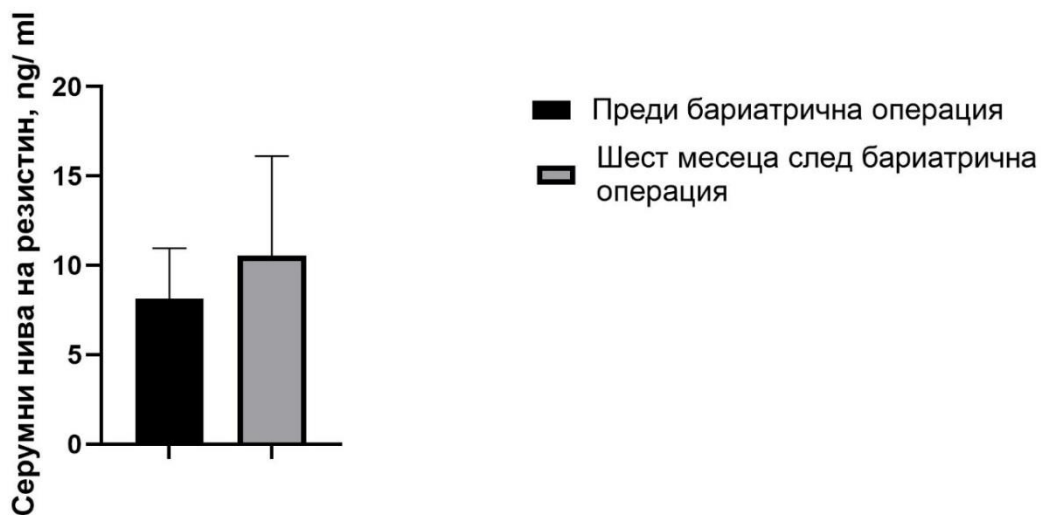
цията в сравнение с изходното ниво ($p= 0.01$). Не са установиха промени в оценката на апетита чрез VAS (visual analogue scale) преди и след бариатричната/метаболична операция.

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

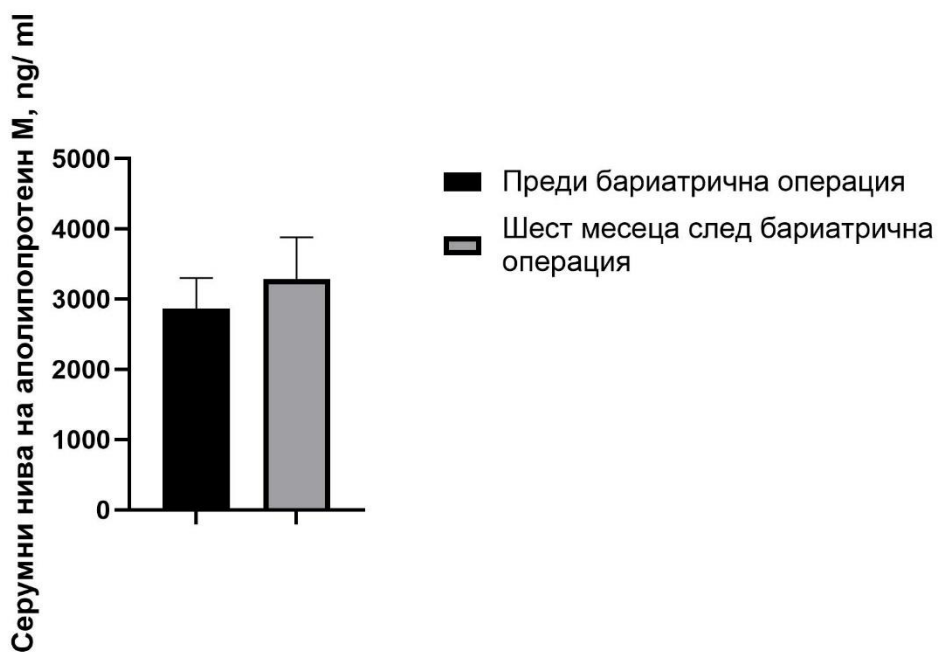
На фигури 40-42 са представени серумните нива на апелин (pg/ml), резистин (ng/ml) и аполипопротеин М (ng/ml) преди и шест месеца след бариатричната/метаболичната операция. Не се установи ефект на бариатричната хирургия върху изследваните показатели.



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



Фигура 41. Серумни нива на резистин (ng/ml) преди и шест месеца след бариатричната операция. Даните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.



Фигура 42. Серумни нива на аполипопротеин М (ng/ml) преди и шест месеца след бариатричната операция. Даните са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

На таблица 20 са представени средните стойности на телесната маса (кг), мастната маса (%), индекса на телесна маса (кг/ м²) и показателя за натрупване на висцерални мазнини. Не се установи ефект на бариатричната операция върху разглежданите антропометрични параметри и показателите на тъканния анализ.

Таблица 20. Статистически анализ на антропометричните данни и качествения анализ на тъканите

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

5. ОБСЪЖДАНЕ

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

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

При провеждане на изследванията за възможни фармакогенетични ефекти при терапия с Метформин и Лираглутид (GLPR агонист) при плъхове Вистар, бяха специално подбрани кодиращи екзони в гените OGT1, MATE1, MATE2 и GLP1R, поради наличието на висока хомоложност между гените на човек и плъх. При човешките гени, споменатите региони съдържат варианти, определящи индивидуален отговор към терапия с Метформин. На базата на тези познания, съответните региони бяха секвенирани в извадка от плъхове, състояща се от контролни и лекувани с Метформин плъхове. В цялата извадка не бяха открити варианти в изследваните екзони на изброените по-горе гени; нито на позициите в кодиращата

последователност, еквивалентни на фармакогенетични варианти при човек, нито в останалата част от протеин-кодиращата ДНК последователност. Заключение от проведените анализ е, че плъховете са „див тип“, тоест не се наблюдават изменения в съответните гени. Следователно, ако се наблюдават различни изходи по време на и след терапия между самите плъхове, то това не се дължи на изследваните гени. Тъй като плъховете са приемали еднакво количество Метформин, дозата също може да бъде изключена като причина за различен резултат от терапията. Като логично обяснение би следвало да има други гени отговорни за разликата, а също е възможно да има и други фактори (напр. околна среда, диета и стрес).

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

Основният извод от интервенционното проучване PREVIEW е, че честотата на ЗДТ2, проследена по време на 3-годишна интервенция на начина на живот, не се различава между двете хранителни интервенции, свързани с различен гликемичен

индекс и различен прием на белтъчини. Въпреки, че основната ни хипотеза (че диетата с по-високо съдържание на белтъчини и по-нисък гликемичен индекс ще бъде по-добра от сегашната най-добра практика с по-ниско съдържание на белтъчини и по-високо съдържание на въглехидрати) не можа да бъде потвърдена, честотата на ЗДТ2 сред завършилите е значително по-ниска от прогнозираната от предишни проучвания за превенция на диабета. На второ място, нямаше разлики в честотата на ЗДТ2 между двете групи с различна по интензитет физическа активност или при сравняването на четирите групи с диета и упражнения. Тези "негативни" резултати може да са свързани с голямото намаление на телесното тегло (-11 % от изходното тегло) след периода на отслабване и стандартно с 5% по-ниско тегло след 3 години интервенция (анализи на завършилите). В сравнение с изходното ниво, повечето вторични резултати, включително тези, свързани с риска от ЗДТ2, също са се подобрили на 3 години, без да има основни разлики между групите на интервенция.

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

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

Проучването PREVIEW е първото, което изследва ефекта на два различни режима на хранене, с акцент върху белтъчините и гликемичния индекс, върху поддържането на теглото след бърза загуба на тегло и по този начин върху превенцията на ЗДТ2 при лица с предиабет. Това е нов подход, тъй като различните диети не са били сравнявани в предишни проучвания за превенция на диабета (165). Спазването на диетите, оценено по приема на белтъчини (от анализите на урината), е било сравнително високо през първите 12-18 месеца. Въпреки това диетата умерено съдържание на белтъчини е била с по-високо съдържание на белтъчини от целевото (стандартно 0,84 g/kg спрямо 0,95 g/kg) (166) и вероятно с достатъчно високо съдържание на белтъчини, за да се насърчи поддържането на телесното тегло, независимо от съдържанието на въглехидрати (166). В сравнение с финландското проучване за превенция на диабета (n = 522) и американската програма за превенция на диабета (n=1079) в групата с интензивен начин на живот в проучването PREVIEW има особени предимства. PREVIEW включва много голяма извадка от >2 300 участници с предиабет и използва многоцентрови, многонационални и мултиетнически подходи, което прави резултатите по-обобщени за други популации в Европа и по света. По време на 3-годишната интервенция се наблюдава сравнително голям процент на отпадане, като само 43% остават в проучването в края на 3-годишния период. Това трябва да се счита за слабост, тъй като намалява статистическата сила и възможността за интерпретиране на резултатите. За съжаление, не е необичайно за дългосрочни, интензивни проучвания с голяма тежест за участниците да се наблюдава висок

процент на отпадане. Интересно е, че намаляването в мотивацията е било по-голямо през първите 6-12 месеца, отколкото през втората половина на проучването. Така 19,5 % са напуснали проучването между 2 и 6 месец, докато 15,1 % са го напуснали между 6 и 12 месец, а 10-12 % - между 12 и 36 месец.

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

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

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

Традиционно се смята, че в основата на механизма на действие на бариатричните операции стоят рестрикцията на калорийния прием, малабсорбцията

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

Нашето изследване демонстрира статистически значимо повишение в серумните концентрации на лептин шест месеца след бариатрична операция. Всяко явление, водещо до повишение на циркулиращите нива на хормона, както и на сигналните пътища, свързани с хипоталамичната регулация, намалява експресията на гена за AgRP/ NPY и увеличава тази за PONS. Ефектите върху тази невронална активност водят до проява на ситост и увеличен разход на енергия. Редукцията на телесна маса води до сенсibiliзиране на лептиновите рецептори. Този феномен също играе роля в индуцираната от бариатричната хирургия редукция на теглото. Също така, серумните нива на адипонектин се повишават, което най-вероятно е свързано с подобряването на общия метаболитен профил и намаляването на мастната тъкан шест месеца след бариатрична/ метаболитна интервенция. Редица проучвания установяват, че при подобряване на инсулиновата чувствителност на тъканите вследствие редукцията на тегло, се увеличават плазмените нива на адипонектин. Нашето изследване доказва и промени в ентералните хормони шест месеца след операция за лечение на високостепенно затлъстяване. Резултатите потвърждават данните в литературата за намаление на циркулиращите нива на

грелин и холецистокинин, което се свързва с намаляване на апетита и последваща редукция на теглото.

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

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

В последните години се установи, че затлъстяването се характеризира с нискостепенно възпаление и увеличени нива на проинфламаторните цитокини и адипокини (168). Нашето проучване при лица с високостепенно затлъстяване не установи промени в апелин, резистин и аполипопротеин М след бариатрична интервенция. В литературата е описано, че хората, живеещи със затлъстяване

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

В мастната тъкан, както адипоцитите, така и макрофагите отделят голям брой хормони, протеини, цитокини и хемокини, заедно наречени адипокини. Тези адипокини допринасят за патогенезата на метаболитен синдром, инсулиновата резистентност, диабет тип 2 и сърдечно-съдови заболявания, най-вероятно чрез регулиране на възпалителния път, медиран от TNF- α , IL-6, NF- κ B, JNK и IKK и инсулиновия сигнален път, медиран от IRS, PI3k / Akt и SOCSs. Загубата на тегло чрез операции променя драстично нивата на тези адипокини и като цяло повишава чувствителността към инсулина. Въпреки множеството доказателства, подкрепящи ролята на тези адипокини във затлъстяването и инсулинова резистентност, механизмите, медиращи техните ефекти в по-голямата си част все още не са разяснени. Не е ясно как тези адипокини медираат ефекта от операциите за отслабване при възпаление и инсулинов отговор. Необходими са допълнителни изследвания, за да се разбере по-добре връзката между тези адипокини и инсулиновата резистентност и как те се модулират чрез бариатрична хирургия. Промяна в адипокиния профил отразява основно промените в производството на мастна тъкан и секрецията на тези цитокини. Допълнителни изследвания са

необходими за определяне дали намаленото възпаление на мастната тъкан след бариатрична хирургия е отговорно за намаленото системно възпаление и подобрена чувствителност към инсулин.

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

6. ИЗВОДИ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. ПРИНОСИ

7.1. Научно-теоретични:

7.1.1. Оригинални

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

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

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

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

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

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

7.1.1.7. За първи път се проучи влиянието на бариатричната хирургия върху анорексигенните (лептин, адипонектин, пептид YY, глюкагон подобния пептид-1,

холецистокинин) и орексигенния (грелин) хормони при лица с високостепенно затлъстяване.

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

7.1.1.9. За първи път се проучи влиянието на бариатричната хирургия върху апелин, резистин и аполиппротеин М при лица с високостепенно затлъстяване.

7.1.2. Потвърдителни:

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

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

7.2. Научно-практически:

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

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

8. БИБЛИОГРАФИЯ

1. AS B. Fat & Thin: a natural history of obesity. New York: Farrar, Straus and Giroux; 1997.
2. Bray GA. The battle of the bulge: a history of obesity research. Pittsburgh, PA: Dorrance Publishing; 2007.
3. MJ B. Tumeur du corps pituitaire sans acromegalie et avec de developpement des organes genitaux. Rev Neurol. 1900;8:531-3.
4. H C. The pituitary body and its disorders. Philadelphia, PA: JB Lippincott; 1912.
5. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature. 1998;395(6704):763-70.
6. Bray GA, Kim KK, Wilding JPH, World Obesity F. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. Obes Rev. 2017;18(7):715-23.
7. Association WH. Obesity: preventing and managing the global epidemic. . Geneva: World Health Association; 1998 June 3-5, 1997.
8. agency Em. EMA Draft Guideline on clinical evaluation of medicinal products used in weight control. EMA/CHMP/311805/. 2014.
9. Fruhbeck G, Sbraccia P, Nisoli E, Woodward E, Yumuk V, Farpour-Lambert NJ, et al. 2015 Milan Declaration: A Call to Action on Obesity - an EASO Position Statement on the Occasion of the 2015 EXPO. Obes Facts. 2016;9(4):296-8.
10. Fruhbeck G, Busetto L, Dicker D, Yumuk V, Goossens GH, Hebebrand J, et al. The ABCD of Obesity: An EASO Position Statement on a Diagnostic Term with Clinical and Scientific Implications. Obes Facts. 2019;12(2):131-6.
11. Mechanick JI, Garber AJ, Handelsman Y, Garvey WT. American Association of Clinical Endocrinologists' position statement on obesity and obesity medicine. Endocr Pract. 2012;18(5):642-8.
12. Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, Boggiano MM, Hanlon EC, Benca RM, et al. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. International journal of obesity. 2006;30(11):1585-94.
13. Janesick AS, Shioda T, Blumberg B. Transgenerational inheritance of prenatal obesogen exposure. Molecular and cellular endocrinology. 2014;398(1-2):31-5.
14. Elks CE, den Hoed M, Zhao JH, Sharp SJ, Wareham NJ, Loos RJ, et al. Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression. Front Endocrinol (Lausanne). 2012;3:29.
15. Wang D, Ma J, Zhang S, Hinney A, Hebebrand J, Wang Y, et al. Association of the MC4R V103I polymorphism with obesity: a Chinese case-control study and meta-analysis in 55,195 individuals. Obesity (Silver Spring). 2010;18(3):573-9.
16. Stutzmann F, Vatin V, Cauchi S, Morandi A, Jouret B, Landt O, et al. Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene. Hum Mol Genet. 2007;16(15):1837-44.
17. Kurokawa N, Young EH, Oka Y, Satoh H, Wareham NJ, Sandhu MS, et al. The ADRB3 Trp64Arg variant and BMI: a meta-analysis of 44 833 individuals. Int J Obes (Lond). 2008;32(8):1240-9.

18. Kilpelainen TO, Bingham SA, Khaw KT, Wareham NJ, Loos RJ. Association of variants in the PCSK1 gene with obesity in the EPIC-Norfolk study. *Hum Mol Genet.* 2009;18(18):3496-501.
19. Shugart YY, Chen L, Day IN, Lewis SJ, Timpson NJ, Yuan W, et al. Two British women studies replicated the association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and BMI. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(8):1050-5.
20. Kettunen J, Silander K, Saarela O, Amin N, Muller M, Timpson N, et al. European lactase persistence genotype shows evidence of association with increase in body mass index. *Hum Mol Genet.* 2010;19(6):1129-36.
21. Wang R, Zhou D, Xi B, Ge X, Zhu P, Wang B, et al. ENPP1/PC-1 gene K121Q polymorphism is associated with obesity in European adult populations: evidence from a meta-analysis involving 24,324 subjects. *Biomed Environ Sci.* 2011;24(2):200-6.
22. Sun HD, Malabunga M, Tonra JR, DiRenzo R, Carrick FE, Zheng H, et al. Monoclonal antibody antagonists of hypothalamic FGFR1 cause potent but reversible hypophagia and weight loss in rodents and monkeys. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(3):E964-76.
23. Farooqi IS, O'Rahilly S. Mutations in ligands and receptors of the leptin-melanocortin pathway that lead to obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(10):569-77.
24. Bender N, Allemann N, Marek D, Vollenweider P, Waeber G, Mooser V, et al. Association between variants of the leptin receptor gene (LEPR) and overweight: a systematic review and an analysis of the CoLaus study. *PLoS One.* 2011;6(10):e26157.
25. Prospective Studies C, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* 2009;373(9669):1083-96.
26. Li C, Ford ES, Zhao G, Croft JB, Balluz LS, Mokdad AH. Prevalence of self-reported clinically diagnosed sleep apnea according to obesity status in men and women: National Health and Nutrition Examination Survey, 2005-2006. *Preventive medicine.* 2010;51(1):18-23.
27. Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, et al. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *The New England journal of medicine.* 2010;363(23):2211-9.
28. Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med.* 1995;332(10):621-8.
29. Greenway FL. Physiological adaptations to weight loss and factors favouring weight regain. *Int J Obes (Lond).* 2015;39(8):1188-96.
30. Sumithran P, Prendergast LA, Delbridge E, Purcell K, Shulkes A, Kriketos A, et al. Long-term persistence of hormonal adaptations to weight loss. *The New England journal of medicine.* 2011;365(17):1597-604.
31. Schwartz A, Doucet E. Relative changes in resting energy expenditure during weight loss: a systematic review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity.* 2010;11(7):531-47.
32. Rosenbaum M, Kissileff HR, Mayer LE, Hirsch J, Leibel RL. Energy intake in weight-reduced humans. *Brain research.* 2010;1350:95-102.
33. Monteiro CA ME, Conde WL, et al. Socioeconomic status and obesity in adult populations of developing countries. *Bull Wrlld Hlth Org.* 2004;82:940-6.

34. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res.* 1998;6 Suppl 2:51S-209S.
35. Seidell JC. Worldwide prevalence of obesity in adults. In: George Bray CB, editor. *Handbook of obesity: epidemiology, etiology, and physiopathology*. 1. Third ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC; 2014. p. 47-54.
36. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA.* 2012;307(5):491-7.
37. Doak CM, Wijnhoven TM, Schokker DF, Visscher TL, Seidell JC. Age standardization in mapping adult overweight and obesity trends in the WHO European Region. *Obes Rev.* 2012;13(2):174-91.
38. Howel D. Trends in the prevalence of obesity and overweight in English adults by age and birth cohort, 1991-2006. *Public Health Nutr.* 2011;14(1):27-33.
39. Webber L, Kilpi F, Marsh T, Rtveladze K, McPherson K, Brown M. Modelling obesity trends and related diseases in Eastern Europe. *Obes Rev.* 2012;13(8):744-51.
40. Lang T HM. *Food Wars: The Global Battle for Mouths, Minds and Markets*. . London: Earthscan; 2004.
41. death. WHOttco, document]. W. WHO top ten causes of death. June 2011 [Available from: URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> (accessed June 2011).
42. Ulijaszek SJ, Koziel S. Nutrition transition and dietary energy availability in Eastern Europe after the collapse of communism. *Econ Hum Biol.* 2007;5(3):359-69.
43. TG L. *Anthropometric standardization reference manual*.: Champaign, IL; 1988.
44. Association WH. *Waist circumference and waist-to-hip ration*. . Geneva: World Health Association; 2011 December 8-11, 2008.
45. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet.* 2005;366(9497):1640-9.
46. Petursson H, Sigurdsson JA, Bengtsson C, Nilsen TI, Getz L. Body configuration as a predictor of mortality: comparison of five anthropometric measures in a 12 year follow-up of the Norwegian HUNT 2 study. *PLoS One.* 2011;6(10):e26621.
47. Ashwell M, Gunn P, Gibson S. Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2012;13(3):275-86.
48. Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med.* 2005;56:443-58.
49. Levine AS, Morley JE. Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides.* 1984;5(6):1025-9.
50. Tsujii S, Bray GA. Acetylation alters the feeding response to MSH and beta-endorphin. *Brain Res Bull.* 1989;23(3):165-9.
51. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature.* 1996;380(6571):243-7.

52. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 1998;92(4):573-85.
53. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*. 2002;418(6898):650-4.
54. Ukkola O. Endocrinological activities of ghrelin: new insights. *Eur J Intern Med*. 2003;14(6):351-6.
55. Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M. Molecular evolution of GPCRs: Ghrelin/ghrelin receptors. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(3):T87-100.
56. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(4):1630-5.
57. Dovolou E, Periquesta E, Messinis IE, Tsiligianni T, Dafopoulos K, Gutierrez-Adan A, et al. Daily supplementation with ghrelin improves in vitro bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. *Theriogenology*. 2014;81(4):565-71.
58. Togliatto G, Trombetta A, Dentelli P, Cotogni P, Rosso A, Tschop MH, et al. Unacylated ghrelin promotes skeletal muscle regeneration following hindlimb ischemia via SOD-2-mediated miR-221/222 expression. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(6):e000376.
59. Halatchev IG, Ellacott KL, Fan W, Cone RD. Peptide YY3-36 inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independent mechanism. *Endocrinology*. 2004;145(6):2585-90.
60. Adams SH, Won WB, Schonhoff SE, Leiter AB, Paterniti JR, Jr. Effects of peptide YY[3-36] on short-term food intake in mice are not affected by prevailing plasma ghrelin levels. *Endocrinology*. 2004;145(11):4967-75.
61. Beglinger C, Degen L. Gastrointestinal satiety signals in humans--physiologic roles for GLP-1 and PYY? *Physiol Behav*. 2006;89(4):460-4.
62. Ji B, Bi Y, Simeone D, Mortensen RM, Logsdon CD. Human pancreatic acinar cells do not respond to cholecystokinin. *Pharmacol Toxicol*. 2002;91(6):327-32.
63. Batterham RL, Le Roux CW, Cohen MA, Park AJ, Ellis SM, Patterson M, et al. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(8):3989-92.
64. Katsuura G, Asakawa A, Inui A. Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides*. 2002;23(2):323-9.
65. Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Ueno N, Katsuura G, Fujimiya M, et al. Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1325-36.
66. Whitehouse F, Kruger DF, Fineman M, Shen L, Ruggles JA, Maggs DG, et al. A randomized study and open-label extension evaluating the long-term efficacy of pramlintide as an adjunct to insulin therapy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25(4):724-30.
67. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131-57.
68. Dakin CL, Small CJ, Batterham RL, Neary NM, Cohen MA, Patterson M, et al. Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology*. 2004;145(6):2687-95.

69. Wynne K, Park AJ, Small CJ, Patterson M, Ellis SM, Murphy KG, et al. Subcutaneous oxyntomodulin reduces body weight in overweight and obese subjects: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes*. 2005;54(8):2390-5.
70. Simopoulos A. The FTO Gene, Browning of Adipose Tissue and Omega-3 Fatty Acids. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2016;9(2-4):123-6.
71. Hwang DY, Lee JW, Lee SM, Kim S. Causes of (18)F-FDG uptake on white adipose tissue. *Hell J Nucl Med*. 2016;19(1):7-9.
72. Webber J. Energy balance in obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2003;62(2):539-43.
73. Mulya A, Kirwan JP. Brown and Beige Adipose Tissue: Therapy for Obesity and Its Comorbidities? *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2016;45(3):605-21.
74. Lean ME, Jennings G. Brown adipose tissue activity in pyrexial cases of cot death. *Journal of clinical pathology*. 1989;42(11):1153-6.
75. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-76.
76. Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise regulation of adipose tissue. *Adipocyte*. 2016;5(2):153-62.
77. Sampath SC, Sampath SC, Bredella MA, Cypess AM, Torriani M. Imaging of Brown Adipose Tissue: State of the Art. *Radiology*. 2016;280(1):4-19.
78. Bartness TJ, Ryu V. Neural control of white, beige and brown adipocytes. *Int J Obes Suppl*. 2015;5(Suppl 1):S35-9.
79. Stechschulte LA, Qiu B, Warriar M, Hinds TD, Jr., Zhang M, Gu H, et al. FKBP51 Null Mice Are Resistant to Diet-Induced Obesity and the PPARgamma Agonist Rosiglitazone. *Endocrinology*. 2016;en20151996.
80. Cedikova M, Kripnerova M, Dvorakova J, Pitule P, Grundmanova M, Babuska V, et al. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6067349.
81. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev*. 2013;27(3):234-50.
82. Kuhn E, Binart N, Lombes M. [Brown, white, beige: the color of fat and new therapeutic perspectives for obesity...]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2012;73 Suppl 1:S2-8.
83. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
84. Funahashi H, Yada T, Suzuki R, Shioda S. Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. *Int Rev Cytol*. 2003;224:1-27.
85. Semple RK, Soos MA, Luan J, Mitchell CS, Wilson JC, Gurnell M, et al. Elevated plasma adiponectin in humans with genetically defective insulin receptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):3219-23.

86. Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283(4):982-8.
87. Ricci R, Bevilacqua F. The potential role of leptin and adiponectin in obesity: a comparative review. *Vet J.* 2012;191(3):292-8.
88. Assiri AM, Kamel HF. Evaluation of diagnostic and predictive value of serum adipokines: Leptin, resistin and visfatin in postmenopausal breast cancer. *Obes Res Clin Pract.* 2016;10(4):442-53.
89. Kotsis V, Stabouli S, Papakatsika S, Rizos Z, Parati G. Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens Res.* 2010;33(5):386-93.
90. Zhang R, Jiao J, Zhang W, Zhang Z, Zhang W, Qin LQ, et al. Effects of cereal fiber on leptin resistance and sensitivity in C57BL/6J mice fed a high-fat/cholesterol diet. *Food Nutr Res.* 2016;60:31690.
91. Triantafyllou GA, Paschou SA, Mantzoros CS. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2016;45(3):633-45.
92. Li E, Kim Y, Kim S, Sato T, Kojima M, Park S. Ghrelin stimulates proliferation, migration and differentiation of neural progenitors from the subventricular zone in the adult mice. *Exp Neurol.* 2014;252:75-84.
93. Davenport RJ, Wright S. Treating obesity: is it all in the gut? *Drug Discov Today.* 2014;19(7):845-58.
94. Becker GF, Passos EP, Moulin CC. Short-term effects of a hypocaloric diet with low glycemic index and low glycemic load on body adiposity, metabolic variables, ghrelin, leptin, and pregnancy rate in overweight and obese infertile women: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(6):1365-72.
95. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol.* 2003;148(3):293-300.
96. Wang Z, Nakayama T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:535918.
97. Vivanco-Allende A, Garcia-Gonzalez M, Gonzalez-Jimenez D, Perez-Guirado A, Fernandez I, Gomez-Illan R. Precocious puberty produced by an osteolipoma of the tuber cinereum. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2012;25(11-12):1165-8.
98. Trayhurn P. Adipocyte biology. *Obes Rev.* 2007;8 Suppl 1:41-4.
99. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69.
100. Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm.* 2010;2010.
101. Malavazos AE, Cereda E, Morricone L, Corsi MM, Ambrosi B. Monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):3128.
102. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1494-505.

103. Llorente-Cortes V, Royo T, Juan-Babot O, Badimon L. Adipocyte differentiation-related protein is induced by LRP1-mediated aggregated LDL internalization in human vascular smooth muscle cells and macrophages. *J Lipid Res.* 2007;48(10):2133-40.
104. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology.* 2009;55(4):379-86.
105. Yamamoto T, Habata Y, Matsumoto Y, Yasuhara Y, Hashimoto T, Hamajyo H, et al. Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1810(9):853-62.
106. Beltowski J. Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit.* 2006;12(6):RA112-9.
107. Reinehr T, Woelfle J, Roth CL. Lack of association between apelin, insulin resistance, cardiovascular risk factors, and obesity in children: a longitudinal analysis. *Metabolism.* 2011;60(9):1349-54.
108. Yue P, Jin H, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, et al. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(1):E59-67.
109. Lee DK, George SR, O'Dowd BF. Unravelling the roles of the apelin system: prospective therapeutic applications in heart failure and obesity. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27(4):190-4.
110. Kadoglou NP, Lampropoulos S, Kapelouzou A, Gkontopoulos A, Theofilogiannakos EK, Fotiadis G, et al. Serum levels of apelin and ghrelin in patients with acute coronary syndromes and established coronary artery disease--KOZANI STUDY. *Transl Res.* 2010;155(5):238-46.
111. Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology.* 2005;146(4):1764-71.
112. Mansourian AR. Metabolic pathways of tetraiodothyronine and triiodothyronine production by thyroid gland: a review of articles. *Pak J Biol Sci.* 2011;14(1):1-12.
113. Laurberg P. Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. *Metabolism.* 1984;33(4):379-92.
114. Child C, Nolan G, Jubiz W. Changes in serum thyroxine, triiodothyronine, and thyrotropin induced by lithium in normal subjects and in rats. *Clin Pharmacol Ther.* 1976;20(6):715-9.
115. Б Л. Эндокринология. Учебник 2000.
116. Gierach M, Gierach J, Junik R. Insulin resistance and thyroid disorders. *Endokrynol Pol.* 2014;65(1):70-6.
117. Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest.* 2001;108(9):1253-9.
118. Ximenes HM, Lortz S, Jorns A, Lenzen S. Triiodothyronine (T3)-mediated toxicity and induction of apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. *Life Sci.* 2007;80(22):2045-50.
119. Keskek SO, Kirim S, Kaya R, Canataroglu A. The effects of thyroid dysfunctions on insulin resistance in patients with hepatosteatosis. *Adv Clin Exp Med.* 2014;23(6):913-8.
120. De Leo S, Lee SY, Braverman LE. Hyperthyroidism. *Lancet.* 2016.
121. Maratou E, Hadjidakis DJ, Peppas M, Alevizaki M, Tsegka K, Lambadiari V, et al. Studies of insulin resistance in patients with clinical and subclinical hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2010;163(4):625-30.

122. Dimitriadis G, Maratou E, Boutati E, Psarra K, Papasteriades C, Raptis SA. Evaluation of glucose transport and its regulation by insulin in human monocytes using flow cytometry. *Cytometry A*. 2005;64(1):27-33.
123. Brenta G. Why can insulin resistance be a natural consequence of thyroid dysfunction? *J Thyroid Res*. 2011;2011:152850.
124. Maratou E, Hadjidakis DJ, Kollias A, Tsegka K, Peppas M, Alevizaki M, et al. Studies of insulin resistance in patients with clinical and subclinical hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2009;160(5):785-90.
125. Lin JD. Levels of the first-phase insulin secretion deficiency as a predictor for type 2 diabetes onset by using clinical-metabolic models. *Ann Saudi Med*. 2015;35(2):138-45.
126. Nichols GA, Hillier TA, Brown JB. Progression from newly acquired impaired fasting glucose to type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30(2):228-33.
127. Siddiqui A, Madhu SV, Sharma SB, Desai NG. Endocrine stress responses and risk of type 2 diabetes mellitus. *Stress*. 2015;18(5):498-506.
128. Barr EL, Zimmet PZ, Welborn TA, Jolley D, Magliano DJ, Dunstan DW, et al. Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Circulation*. 2007;116(2):151-7.
129. Kahn SE, Bergman RN, Schwartz MW, Taborsky GJ, Jr., Porte D, Jr. Short-term hyperglycemia and hyperinsulinemia improve insulin action but do not alter glucose action in normal humans. *Am J Physiol*. 1992;262(4 Pt 1):E518-23.
130. Daly ME, Vale C, Walker M, Littlefield A, Alberti KG, Mathers JC. Acute effects on insulin sensitivity and diurnal metabolic profiles of a high-sucrose compared with a high-starch diet. *Am J Clin Nutr*. 1998;67(6):1186-96.
131. А-М Б. Разпространение на захарния диабет и преддиабет в България. In: А III, editor.: *Ендокринология*. p. 182-192.
132. Chen M, Bergman RN, Porte D, Jr. Insulin resistance and beta-cell dysfunction in aging: the importance of dietary carbohydrate. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67(5):951-7.
133. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
134. Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(10):1111-7.
135. Look ARG. Eight-year weight losses with an intensive lifestyle intervention: the look AHEAD study. *Obesity*. 2014;22(1):5-13.
136. Diabetes Prevention Program Research G, Knowler WC, Fowler SE, Hamman RF, Christophi CA, Hoffman HJ, et al. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet*. 2009;374(9702):1677-86.
137. Handjieva-Darlenska T, Handjiev S, Larsen TM, van Baak MA, Jebb S, Papadaki A, et al. Initial weight loss on an 800-kcal diet as a predictor of weight loss success after 8 weeks: the Diogenes study. *European journal of clinical nutrition*. 2010;64(9):994-9.
138. Johnston BC, Kanters S, Bandayrel K, Wu P, Naji F, Siemieniuk RA, et al. Comparison of weight loss among named diet programs in overweight and obese adults: a meta-analysis. *Jama*. 2014;312(9):923-33.

139. Thomas DM, Weedermann M, Fuemmeler BF, Martin CK, Dhurandhar NV, Bredlau C, et al. Dynamic model predicting overweight, obesity, and extreme obesity prevalence trends. *Obesity*. 2014;22(2):590-7.
140. Hall KD, Sacks G, Chandramohan D, Chow CC, Wang YC, Gortmaker SL, et al. Quantification of the effect of energy imbalance on bodyweight. *Lancet*. 2011;378(9793):826-37.
141. Hu T, Mills KT, Yao L, Demanelis K, Eloustaz M, Yancy WS, Jr., et al. Effects of low-carbohydrate diets versus low-fat diets on metabolic risk factors: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *American journal of epidemiology*. 2012;176 Suppl 7:S44-54.
142. Huo R, Du T, Xu Y, Xu W, Chen X, Sun K, et al. Effects of Mediterranean-style diet on glycemic control, weight loss and cardiovascular risk factors among type 2 diabetes individuals: a meta-analysis. *European journal of clinical nutrition*. 2015;69(11):1200-8.
143. Tsai AG, Wadden TA. The evolution of very-low-calorie diets: an update and meta-analysis. *Obesity*. 2006;14(8):1283-93.
144. Jakicic JM, Egan CM, Fabricatore AN, Gaussoin SA, Glasser SP, Hesson LA, et al. Four-year change in cardiorespiratory fitness and influence on glycemic control in adults with type 2 diabetes in a randomized trial: the Look AHEAD Trial. *Diabetes care*. 2013;36(5):1297-303.
145. McTiernan A, Sorensen B, Irwin ML, Morgan A, Yasui Y, Rudolph RE, et al. Exercise effect on weight and body fat in men and women. *Obesity*. 2007;15(6):1496-512.
146. Apovian CM, Aronne LJ, Bessesen DH, McDonnell ME, Murad MH, Pagotto U, et al. Pharmacological management of obesity: an endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(2):342-62.
147. Sumithran P, Proietto J. The defence of body weight: a physiological basis for weight regain after weight loss. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(4):231-41.
148. Garvey WT, Mechanick JI, Brett EM, Garber AJ, Hurley DL, Jastreboff AM, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Comprehensive Clinical Practice Guidelines for Medical Care of Patients with Obesity. *Endocr Pract*. 2016;22 Suppl 3:1-203.
149. Wilding JPH, Calanna S, Kushner RF. Once-Weekly Semaglutide in Adults with Overweight or Obesity. Reply. *N Engl J Med*. 2021;385(1):e4.
150. Wadden TA, Bailey TS, Billings LK, Davies M, Frias JP, Koroleva A, et al. Effect of Subcutaneous Semaglutide vs Placebo as an Adjunct to Intensive Behavioral Therapy on Body Weight in Adults With Overweight or Obesity: The STEP 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021;325(14):1403-13.
151. Rubino D, Abrahamsson N, Davies M, Hesse D, Greenway FL, Jensen C, et al. Effect of Continued Weekly Subcutaneous Semaglutide vs Placebo on Weight Loss Maintenance in Adults With Overweight or Obesity: The STEP 4 Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021;325(14):1414-25.
152. Garvey WT. New Horizons A New Paradigm for Treating to Target with Second-Generation Obesity Medications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021.
153. Rosenstock J, Wysham C, Frias JP, Kaneko S, Lee CJ, Fernandez Lando L, et al. Efficacy and safety of a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist tirzepatide in patients with type 2 diabetes (SURPASS-1): a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2021;398(10295):143-55.

154. Frias JP, Davies MJ, Rosenstock J, Perez Manghi FC, Fernandez Lando L, Bergman BK, et al. Tirzepatide versus Semaglutide Once Weekly in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2021;385(6):503-15.
155. Davies M, Faerch L, Jeppesen OK, Pakseresht A, Pedersen SD, Perreault L, et al. Semaglutide 2.4 mg once a week in adults with overweight or obesity, and type 2 diabetes (STEP 2): a randomised, double-blind, double-dummy, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2021;397(10278):971-84.
156. Enebo LB, Berthelsen KK, Kankam M, Lund MT, Rubino DM, Satylganova A, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of concomitant administration of multiple doses of cagrilintide with semaglutide 2.4 mg for weight management: a randomised, controlled, phase 1b trial. *Lancet*. 2021;397(10286):1736-48.
157. Heymsfield SB CL, Miller R, et al. Effect of bimagrumab vs placebo on body fat mass among adults with type 2 diabetes and obesity: a phase 2 randomized clinical trial. *J Am Med Assoc Netw Open*. 2021;4.
158. Smith SR, Garvey WT, Greenway FL, Zhou S, Fain R, Pilson R, et al. Coadministration of lorcaserin and phentermine for weight management: A 12-week, randomized, pilot safety study. *Obesity (Silver Spring)*. 2017;25(5):857-65.
159. Aronne LJ, Wadden TA, Peterson C, Winslow D, Odeh S, Gadde KM. Evaluation of phentermine and topiramate versus phentermine/topiramate extended-release in obese adults. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(11):2163-71.
160. Hristov M, Landzhov B, Yakimova K. Cafeteria diet-induced obesity reduces leptin-stimulated NADPH-diaphorase reactivity in the hypothalamic arcuate nucleus of rats. *Acta Histochem*. 2020;122(7):151616.
161. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007;41(1):111-9.
162. Huttunen-Lenz M, Hansen S, Christensen P, Meinert Larsen T, Sando-Pedersen F, Drummen M, et al. PREVIEW study-influence of a behavior modification intervention (PREMIT) in over 2300 people with pre-diabetes: intention, self-efficacy and outcome expectancies during the early phase of a lifestyle intervention. *Psychol Res Behav Manag*. 2018;11:383-94.
163. Andriessen C, Christensen P, Vestergaard Nielsen L, Ritz C, Astrup A, Meinert Larsen T, et al. Weight loss decreases self-reported appetite and alters food preferences in overweight and obese adults: Observational data from the DiOGenes study. *Appetite*. 2018;125:314-22.
164. Kahlert D, Unyi-Reicherz A, Stratton G, Meinert Larsen T, Fogelholm M, Raben A, et al. PREVIEW Behavior Modification Intervention Toolbox (PREMIT): A Study Protocol for a Psychological Element of a Multicenter Project. *Front Psychol*. 2016;7:1136.
165. Guess ND. Dietary Interventions for the Prevention of Type 2 Diabetes in High-Risk Groups: Current State of Evidence and Future Research Needs. *Nutrients*. 2018;10(9).
166. Soenen S, Martens EA, Hochstenbach-Waelen A, Lemmens SG, Westerterp-Plantenga MS. Normal protein intake is required for body weight loss and weight maintenance, and elevated protein intake for additional preservation of resting energy expenditure and fat free mass. *J Nutr*. 2013;143(5):591-6.
167. King AJ, Levey AS. Dietary protein and renal function. *J Am Soc Nephrol*. 1993;3(11):1723-37.
168. Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021;320(3):C375-C91.

169. Castan-Laurell I, Boucher J, Dray C, Daviaud D, Guigne C, Valet P. Apelin, a novel adipokine over-produced in obesity: friend or foe? *Mol Cell Endocrinol.* 2005;245(1-2):7-9.
170. Castan-Laurell I, Dray C, Attane C, Duparc T, Knauf C, Valet P. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine.* 2011;40(1):1-9.
171. Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Tinahones FJ, et al. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg.* 2009;19(11):1574-80.
172. Krist J, Wieder K, Kloting N, Oberbach A, Kralisch S, Wiesner T, et al. Effects of weight loss and exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Obes Facts.* 2013;6(1):57-69.