

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА**  
**КАТЕДРА „КАРДИОЛОГИЯ, ПУЛМОЛОГИЯ,**  
**ЕНДОКРИНОЛОГИЯ“**

---

**Д-Р СИЛВИЯ СИМЕОНОВА ГАНЕВА - ТОДОРОВА**

**ПРОМЕНИ В ПЛАЗМЕНИТЕ НИВА НА ЦИТОКИНИТЕ И**  
**ЛИМФОЦИТНИТЕ СУБПОПУЛАЦИИ**  
**ПРИ ПАЦИЕНТИ С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА**  
**ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

**НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „Ендокринология“**

**Научен ръководител:**

Доц. д-р Катя Тодорова, д.м.

**Научен консултант:**

Доц. д-р Цветан Луканов, д.м.

Плевен, 2022

Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по кардиология, пулмология и ендокринология при Медицински Университет- Плевен и насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд обхваща 184 стандартни машинописни страници. Онагледен е с 51 таблици и 38 графики. Библиографията включва 210 източника.

Научното жури е в състав назначен със Заповед № 2028/26.07.2022 на Ректора на МУ- Плевен:

Вътрешни членове за МУ -Плевен

1. Проф. Д-р Снежанка Томова Тишева-Господинова, дмн
2. Доц. Д-р Бисер Кирилов Борисов, д м
3. Доц. Д-р Явор Йорданов Иванов, д м (резервен член)

Външни членове за МУ- Плевен:

1. Проф. Д-р Мария Миткова Орбецова (Фейзуллова), д м
2. Проф. Д-р Михаил Ангелов Боянов, дмн
3. Доц. Д-р Живка Бонева Асьова, д м
4. Доц. Д-р Мира Валентинова Сидерова, д м (резервен член)

Официални рецензенти:

Проф. Д-р Мария Орбецова, д м

Проф. Д-р Снежанка Тишева- Господинова

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 14.09.2022г от 14 часа в зала „Амброаз Парев“ МУ- Плевен.

Материалите по защитата са на разположение на интересувалите се в Катедрата по кардиология, пулмология и ендокринология, ул.“Г. Кочев“8А-УМБАЛ“Д-р Г. Странски“ ЕАД, първа клинична база

## **ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:**

БИА- биоелектричен импедансен анализ

ЗДТ1-Захарен диабет тип 1

ЗДТ2- Захарен диабет тип 2

ИРИ – имуно-реактивен инсулин

ИР-инсулинова резистентност

ИТМ – индекс на телесна маса

МС-метаболически синдром

НГГ – нарушена гликемия на гладно

НГТ – нарушен глюкозен толеранс

ОГТТ – орален глюкозо- толерансен тест

СУЕ- скорост на утаяване на еритроцитите

CD19+ (B cells)-В-лимфоцити

CD3-/CD16+CD56+ (NK-natural killer)- NK клетки

CD3+Tcells- общи Т лимфоцити

CD4+ (T helper cells)-Т хелпери; Th

CD4+/CD8+ ratio- съотношение Th/Ts

CD8+ (T suppresor cells) -Т супресори; Ts

НbA1c – гликиран хемоглобин

НОМА β% (Homeostatic Model Assessment β%)-НОМА%B

НОМА-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance)- НОМА-ИР

CRP- С-реактивен протеин

hsCRP – високочувствителен С – реактивен протеин

IL-1-интерлевкин-1

IL-6-интерлевкин -6

IRS-1- insulin receptor substrate- инсулин рецепторен субстрат 1

PRRS-pattern recognition receptors

TLRs-Toll- like receptors;

TNF-α—тумор некротичен фактор алфа

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....</b>	<b>6</b>
<b>III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ.....</b>	<b>7</b>
<b>IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ</b>	
<b>IV.1. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЦИТОКИНИ [ИНТЕРЛЕВКИН 1(IL-1), ИНТЕРЛЕВКИН 6 (IL-6), ТУМОР НЕКРОЗИС ФАКТОР АЛФА (TNF-<math>\alpha</math>)] и МАРКЕРИ НА ВЪЗПАЛЕНИЕТО [високо сензитивен C реактивен протеин (hs-CRP)] ПРИ ПАЦИЕНТИ С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ И ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2.....</b>	<b>10</b>
<b>IV.2. ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛИМФОЦИТНИ СУБПОПУЛАЦИИ В ПЕРИФЕРНА КРЪВ НА ПАЦИЕНТИ С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ БЕЗ И СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2.....</b>	<b>31</b>
<b>V. ОСНОВНИ ИЗВОДИ.....</b>	<b>48</b>
<b>VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>48</b>
<b>VII. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>49</b>
<b>VIII. НАУЧНИ ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>50</b>

## **I. ВЪВЕДЕНИЕ:**

През последните 30 години стереотипната представа за патогенезата на захарния диабет тип 2 (ЗДТ2) се промени от класическо метаболитно до мултифакторно хронично заболяване, протичащо с нискостепенно хронично възпаление. Висцералното затлъстяване е не само основен фактор за развитие на инсулинова резистентност (ИР), но и причина за възникване и персистиране на ниско-степенно хронично възпаление сред пациентите с метаболитен синдром (МС) и ЗДТ2. Инициацията на възпалителния процес при тези състояния се осъществява посредством активиране и дисрегулация на вродения имунитет. Повишената серумна концентрация на не-естерефицираните мастни киселини и глюкозата по няколко различни механизми водят до вътреклетъчно активиране в адипоцити, макрофаги, хепатоцити, мускулни, ендотелни и панкреасни  $\beta$ -клетки на основните регулаторни пътища на възпалението и поддържат продукцията на възпалителни цитокини като IL-1 (интерлевкин 1), IL-6 (интерлевкин 6), TNF $\alpha$  (тумор некротичен фактор  $\alpha$ ) и CRP (С-реактивен протеин). Хроничната хипергликемия, при пациенти със ЗДТ2 и МС, и свързаната с нея глюкотоксичност, наред с клетките и продуктите на възпалението причиняват  $\beta$ -клетъчен стрес и апоптоза, продукцията на автоантитела и активация на Т-лимфоцити, насочени към панкреасни  $\beta$ -клетъчни антигени. Степента на затлъстяване и обема на висцералната мастна тъкан се явяват критични за развитието на панкреасната  $\beta$ -клетъчна апоптоза и те представляват патогенетичен "мост", разделящ ЗД тип 1 (ЗДТ1) от ЗДТ2. Автоимунно-медирана панкреасна  $\beta$ -клетъчна деструкция се открива и при двата типа диабет, но скоростта на развитие е много по-бавна при ЗДТ2.

Настоящия дисертационен труд изследва и анализира взаимовръзката между нискостепенното хронично възпаление, имунните промени и клинично-лабораторните отклонения при МС и ЗДТ2 като се проследяват нивата на серумните цитокини IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , hsCRP, Т-лимфоцитните, В-лимфоцитните популации и НК – клетките (natural killers) сред пациенти с МС и ЗДТ2.

## **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **II.1. ЦЕЛ**

Целта на настоящата работа е да се проучат нивата на цитокините: интерлевкин-1, интерлевкин-6, тумор-некротичен фактор алфа и лимфоцитните субпопулации в периферна кръв като маркери за нискостепенно хронично възпаление и имунен отговор при пациенти с метаболитен синдром и да се анализира взаимовръзката им с различните клинично-лабораторни отклонения, включени като компоненти в характеристиката му.

### **II.2. ОСНОВНИ ЗАДАЧИ**

За изпълнение на посочената цел бяха поставени следните конкретни задачи:

**А: В първа част на проучването (включваща пациенти с МС без ЗДТ2 и пациенти с МС и ЗДТ2):**

**2.1** Да се направи сравнителна характеристика по отношение на възраст, антропометрични данни и обща клинично- лабораторна характеристика на изследваните групи лица с МС без ЗДТ2 и със ЗДТ2.

**2.2** Да се сравнят основните параметри на въглехидратен метаболизъм (промени в гликемията в хода на 75 гр. ОГТТ) и инсулиновите индекси: Инсулинова чувствителност (НОМА- IR), Инсулинова секреция (НОМА-%β) и съотношението триглицериди/ХДЛ-холестерол на участниците от изследваните групи лица с МС без ЗДТ2 и лица с МС и ЗДТ2.

**2.3** Да се изследват и сравнят нивата на плазмени цитокини - IL-1, IL-6, TNF-α и hsCRP както и СУЕ и общ левкоцитен брой между изследваните групи лица с МС без ЗДТ2 и лица с МС и ЗДТ2.

**2.4** Да се проучат корелативните връзки между плазмените нива на изследваните цитокини и маркерите на нискостепенното хронично възпаление (СУЕ, общ левкоцитен брой, hsCRP) с показателите на въглехидратна обмяна, инсулиновите индекси, висцералния обезитет и плазмените нива на липидите.

**Б: Във втора част на проучването (включваща пациенти с МС без ЗДТ2, с МС и ЗДТ2 и пациенти със ЗДТ1):**

**2.5.** Да се проведе сравнителен количествен и качествен анализ на общият и диференциран левкоцитен профил и лимфоцитните субпопулации [Общи неспецифични Т лимфоцити (CD+3), Th (CD+4), Ts (CD+8), NK клетки (CD3-/CD16+/CD56+) и В лимфоцити (CD+19)] в периферна кръв между различните групи лица [(пациенти с МС без ЗДТ2, пациенти с МС и ЗДТ2 и пациенти със захарен диабет тип 1); (ЗДТ1)].

**2.6.** Да се изследва и оцени връзката между лимфоцитните субпопулации в периферна кръв с ИТМ и обиколката на талията.

**2.7.** Да се проследи взаимовръзката между лимфоцитните субпопулации в периферна кръв и промените в гликемията, инсулиновата секреция и чувствителност при изследваните пациенти.

**2.8.** Да се изследва и оцени връзката между лимфоцитните субпопулации в периферна кръв и промените в серумния холестерол, неговите фракции и серумните триглицериди.

### **III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

#### **III. 1. ДИЗАЙН НА ПРОУЧВАНЕТО:**

Извършени са две проучвания, със сравнителен характер, тип «случай- контрола» при пациенти с метаболитен синдром.

**III. 1.1. Първото проучване включва: Изследване на цитокини (интерлевкин 1, интерлевкин 6, тумор некротичен фактор алфа) и маркери на възпалението (високо сензитивен С реактивен протеин) при пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2.**

**III. 1.2. Второто проучване включва: Изследване на лимфоцитни субпопулации (CD3, CD4, CD8, CD19) и Th/Ts съотношението при пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2.**

## **III.2. КЛИНИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ИЗСЛЕДВАНАТА ПОПУЛАЦИЯ:**

В първото проучване бяха включени: **общо 79 пациенти** с МС и **21** здрави лица, разделени в три групи както следва:

- 1) група А- **45** пациенти с МС без ЗДТ2
- 2) група В- **34** пациенти с МС и ЗДТ2
- 3) група С-**21** здрави лица

Във второто изследване бяха включени: **общо 96 пациенти** с МС, 22 пациенти със ЗДТ1 и 21 здрави лиц, разпределени в четири групи както следва:

- 1) група А- **26** пациенти с МС без ЗДТ2
- 2) група В- **70** пациенти с МС и ЗДТ2
- 3) група D- **22** пациенти със ЗДТ1
- 4) група С- **21** здрави лица, използвани като контролна група.

Изследваните лица от група А, В и D отговаряха на всички включващи и на нито един изключващ от предварително определените критерии:

### **Включващи критерии за групи А, В и D:**

- А) Лица над 18 годишна възраст с диагностициран МС и/или известен ЗДТ2 с ИТМ $\geq$  25кг/м<sup>2</sup> или известен ЗДТ1 с нормално телесно тегло.
- Б) Лица подписали информирано съгласие за участие в изпитването.

### **Изключващи критерии за групи А, В и D:**

- А) Лица с остро или хронично активно възпаление
- Б) Лица с придружаващи системни аутоимунни заболявания.
- В) Пациенти приемащи имunosупресираща, имуноактивираща или имуномодулираща терапия.
- Г) Лица със ЗДТ1 или ЗДТ2 с остра метаболитна декомпенсация (диабетна кетоацидоза, хиперосморално некетогенно състояние, хипогликемия) в момента или  $\leq$  от 120 дни преди подписване на информираното съгласие.

Д) Пациенти с преживян остър коронарен или мозъчно-съдов инцидент, хронична артериална недостатъчност на крайниците, реваascularизация на периферни артерии или ампутация на крайник.

Е) Изявена чернодробна или бъбречна недостатъчност.

Ж) Сърдечна недостатъчност III и IV клас по NYHA, независимо от етиологията.

**Контролна група:** Включените участници в сравнителната **контролна група** (група С) и в двете проучвания са здрави, над 18 годишна възраст лица с ИТМ  $\leq 25$  кг/м<sup>2</sup>, взели доброволно участие в клиничното изпитване след подписване на информирано съгласие за участие. За да попаднат в тази група лицата трябваше да нямат нито един от определените изключващи критерии за група B и D. Подписали информирано съгласие за доброволно участие като контролна група бяха 39 здрави лица. След получаване на резултатите от клинично-лабораторните изследвания само 21 от тях напълно отговоряха на всички включващи и изключващи критерии.

И двете проучвания са проведени за период от 1 година. Всички участници от групи А, В и D са селектирани от хоспитализирани пациенти в клиника по ендокринология, УМБАЛ "Д-р Георги Странски" ЕАД, Плевен с диагнози: МС, ЗДТ2 или ЗДТ1.

### **III. 3. МЕТОДИЧНИ ПОДХОДИ:**

**III.3.1. Документален и анкетен метод** Посредством анкетния и документален метод беше добивана информацията относно лична анамнеза за артериална хипертония и провежданото до момента лечение (при съществуваща артериална хипертония), захарен диабет, продължителността на захарния диабет (ако има такъв) и провежданото до момента антидиабетно лечение, придружаващи хронични възпалителни и автоимунни заболявания, прием на медикаменти с потенциално антивъзпалително, имуномодулиращо, имunosупресиращо или имуноактивиращо действие, наличие на тютюнопушене, фамилна обремененост за захарен диабет, артериална хипертония и сърдечно-съдови заболявания.

#### **III.3.2. Физикален статус:**

3.2.1 Антропометрични показатели- беше измерена **височина (м)**, телесно тегло (**кг**) и се изчисляваше индекс на телесна маса (ИТМ). **Обиколката на талията** беше измерена в сантиметри.

3.2.2 Измерване на артериалното налягане по аускултаторния метод на Коротков с anerоиден сфигмоманометър след 5 минутен покой.

#### **III.3.3. Лабораторни изследвания**

Изследванията на СУЕ, общ и диференциален брой левкоцити в цялостна кръв, плазмена глюкоза, общ холестерол, HDL- холестерол, триглицериди, гликиран



хемоглобин (HbA1c) бяха осъществени в централна клинична лаборатория към УМБАЛ „Д-р Г. Странски” – Плевен.

Изследването на имуно-реактивния инсулин (IRI) и нивата на IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , hsCRP и флоуцитометричния анализ на лимфоцитните субпопулации беше проведено в Медико-диагностична лаборатория по имунология на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ – Плевен.

**III.3.3.1. Изследване на общия и диференциален левкоцитен брой** беше осъществявано с автоматичен, хематологичен аналйзер Micros 60 CS/ CT-16 ( ABX Horiba Diagnostics, France) от EDTA- венозна кръв.

**III. 3.3.2. Плазмена глюкоза-** хексокиназен ензимен метод в проби от цялостна хемализирана кръв с аналйзер GA 3 (KABE Labortechnik, Denmark).

**III.3.3.3. Гликиран хемоглобин (HbA1c).** Измерването на HbA1c в проценти (DCCT/NGSP) беше извършвано в пълна кръв с ин витро тестове (Roche diagnostic GmbH, Mannheim, Germany).

**III. 3.3.4. Плазмените триглицериди, общият холестерол и HDL- холестерола** бяха изследвани по ензимен колориметричен метод с автоматичен аналйзер BA 400 (BioSystems S.A, Spain). При нива на серумни триглицериди <4.5 mmol/l, стойностите на **LDL** холестерола бяха изчислявани по формулата на Friedewald:  $LDL = \text{общ холестерол} - [HDL + (\text{триглицериди}/2.2)]$ .

**III.3.3.5. Имуно-реактивен серумен инсулин (IRI)** – в серума на гладно с имуноензимометричен метод (DIAsource INS-EASIA kit; DIAsource Immuno Assays, Belgium).

**За оценка и количествен израз на инсулиновата резистентност** беше използван **математически хомеостазен модел: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (НОМА-IR)**. За референтни нива бяха приети стойности на НОМА-IR от 0.7 до 2.4.

**За оценка и количествен израз на  $\beta$  клетъчната инсулинова секреторна активност** беше използван **математически хомеостазен модел: Homeostatic Model Assessment  $\beta\%$  (НОМА- $\beta\%$ )**.

**III.3.3.6 Измерването на IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  и hsCRP-** чрез ELISA в изолирана плазма от EDTA цялостна кръвна проба (Gen-Probe Diaclone SAS, France и DIAsource Immuno Assays, Belgium). Приети референтни стойности: за IL-6 от 0 до 2 pg/ml; за TNF- $\alpha$  0-8pg/ml за hsCRP- от 0,03 до 63,68 mg/l. II-1 няма утвърдена референтна стойност.

**III. 3.3.7. Лимфоцитните субпопулации** - бяха анализирани чрез двулазерен флоуцитометър с определяне на флоуресценцията от специфични моноклонални антитела. Идентифицираха се клетъчните субпопулации CD3+ (Т-лимфоцити), CD4+

(Т-хелпери), CD8+ (Т-цитотоксични лимфоцити), CD19+ (В-лимфоцити), CD3-/CD16+ CD56+ (NK-клетки) като процентна стойност от лимфоцитите. За калкулиране на абсолютния брой клетки на лимфоцитните субпопулации в 1 микролитър кръв беше използвана формулата: лимф. стойност (%) X общ абсолютен лимф. брой X 10 (\* информация за общ лимфоцитен брой се извличаше от автоматичния анализ на пълна кръвна картина).

### **III. 3.4. Функционални тестове**

**III.3.4. 1.Орален глюкозо- толерантен тест (ОГТТ)** При участниците от гр.А и гр.С беше провеждан ОГТТ съгласно изискванията на СЗО. Стойности на кръвната захар на гладно  $\geq 5,6$ ммол/л се приеха за нарушена гликемия на гладно, а  $\geq 7,8$ ммол/л до  $\leq 11,0$  ммол/л на 120 минута за нарушен глюкозен толеранс.

**III.3.4. 2.Кръвно- захарен профил (КЗП)** При участниците от гр. В и гр.Д беше провеждан 4-ри точков КЗП профил.

### **III. 3.5. Инструментални методи**

**3.5.1. Импедансометрия:** Биоелектрически импедансен анализ (БИА) бе проведен с калибриран биоимпедансометър TANITA inner scan body composition monitor BC-571. Определено беше процентното съдържание на общата мастна тъкан и вода спрямо телесното тегло и съответно дял на висцералната мастна тъкан (индекс).

### **III. 3.6. Статистически методи**

Получените данни и в двете проучвания бяха въведени, групирани и обработени с помощта на компютърни пакети: MS Excel 2010, STATGRAPHICS Centurion XV.I.

Резултатите са описани чрез таблици, графики и числови величини (проценти, коефициенти, средни величини, стандартно отклонение и др.)

Оценка на статистическата достоверност в проучваните групи се осъществяваше посредством стойността на  $p$  за намереното значение на хи квадрат или точния критерий на Фишер, като за сигнификантно значими се приемаха разликите при ниво на значимост  $p < 0,05$ .

Бяха използвани параметрични методи за проверка на хипотези (t- критерий на Стюdent, F- критерий на Fisher) и непараметрични методи (критерият на Pearson  $\chi^2$  и на Kruskal- Wallis).

Беше използван корелационен анализ за изучаване на връзката между измененията на зависимата променлива и съответните изменения в проучваните фактори. Оценена е силата на корелационната зависимост, чрез коефициентът на корелация на Пирсон и специален критерий за факторно влияние – отношение на шансовете (OR- odds ratio). Построени са ROC криви и изчислена площта под кривата, зада се определят

специфичност, чувствителност и гранична стойност на някои показатели. Направен е регресионен анализ.

#### IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

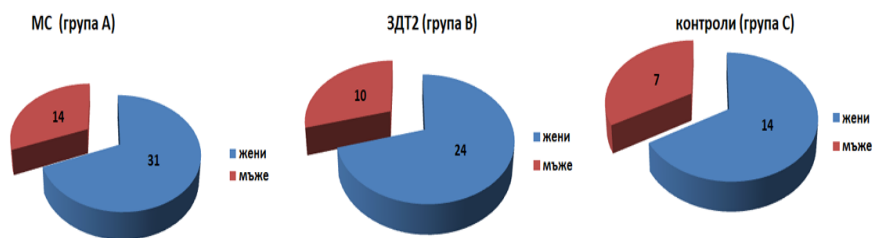
##### IV.1 ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЦИТОКИНИ (ИНТЕРЛЕВКИН 1, ИНТЕРЛЕВКИН 6, ТУМОР НЕКРОТИЧЕН ФАКТОР АЛФА) И МАРКЕРИ НА ВЪЗПАЛЕНИЕТО (високо сензитивен С реактивен протеин) ПРИ ПАЦИЕНТИ С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ И ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2.

IV.1 .1 Характеристика на изследваните лица с метаболитен синдром без захарен диабет тип 2 (група А), с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2 (група В) и контролна група здрави лица (група С).

##### Основна характеристика на изследваните лица

1. **Полова принадлежност:** И в двете изследвани групи (А и В) по-голям дял заемат жените: 68,89% в група А и съответно 70,59% за група В. При контролите 65% от изследваните също са от женски пол (Фиг.1). Не се наблюдава статистически значими различия в половото разпределение както между двете изследвани групи (гр. А и гр.В), така и между тях и контролите.

##### Разпределение на изследваните пациенти по пол



Фиг.1 Разпределение на изследваните пациенти по пол

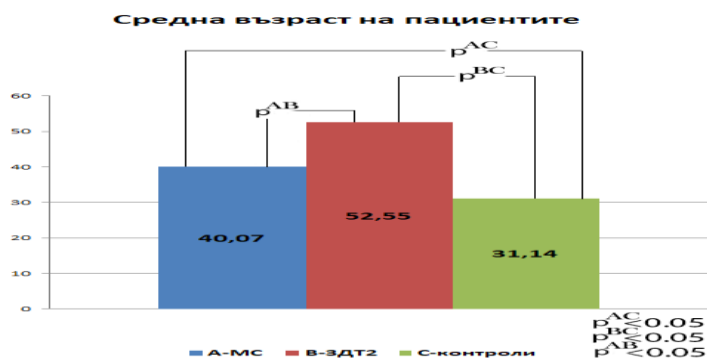
2. **Възраст:** Средната възраст на пациентите от двете групи и контролите е отразена на таблица 1.

Табл.1 Възраст на изследваните пациенти с МС без ЗДТ2 (група А), с МС и ЗДТ2 (група В) и контролните лица (група С)

Възраст (години)	Пациенти с МС Група А (n=45)	Пациенти със ЗДТ2 Група В (n=34)	Контроли Група С (n=21)	Сигнификантност P<0,05
Средна възраст	40,07±14,24	52,55±3,72	31,14±3,15	p*, p**, p≠

легенда p\*-p<sup>AB</sup><0,005; p\*\* - p<sup>BC</sup><0,05; p≠- p<sup>AC</sup><0,05

Средната възраст на пациентите с МС (групи А и В) е статистически по- висока в сравнение с тази на контролните лица. Също така пациентите със ЗДТ2 (група В) са с една декада по- възрастни от тези без ЗДТ2 (А) ( фиг. 2).



Фиг. 2 Средна възраст на изследваните пациенти с МС без ЗДТ2, с МС и ЗДТ2 и контроли

### 3. Наследственост

Наследствеността е немодифицируем рисков фактор за възникване на ЗД сърдечно-съдови заболявания и беше включена в анализа.

Делът на изследваните с налична фамилна анамнеза за ЗДТ2 бе съответно: n=21(46,64% ) в група А, n=21(64,71%) в група В и n= 10 (50%) сред контролите (група С). Не се откриха статистически значими различия между изследваните относно позитивната анамнеза за ЗДТ2 сред техните родственици.

Най- висок дял на пациенти с позитивна фамилна анамнеза за сърдечно- съдови заболявания се установи сред тези с развит ЗДТ2 (група В)- n=22 (64%), следвани от пациентите с МС не покриващи критериите за ЗДТ2 (група А) – n=27 (60%). При здравите лица в контролната група (група С) фамилна анамнеза за сърдечно- съдови заболявания бе регистрирана при n=9 (45%). Наблюдаваните различия не показаха сигнификантност.

## Клинико-метаболическа характеристика

Клиничната характеристика на участниците в изследването, включваща компонентите на МС е отразена на Табл.2.

Табл. 2 Клинична характеристика на пациентите с МС

Показатели	МС; Гр. А (n=45)	ЗДТ2; Гр. В (n=34)	Контроли; гр. С (n=21)	сигнификантност p<0,05
АХ % (брой пациенти)	77,7(35)	88,2 (30)	42,9 (9)	
Систолно АН (mmHg)	130,68±15,69	134,85±16,26	116, 67±15,52	p <sup>AB</sup> =NS (0,2) p <sup>AC</sup> <0,05 p <sup>BC</sup> <0,05
Диастолно АН (mmHg)	86,33±7,93	85,0±9,77	76,19±9,6	p <sup>AB</sup> =NS(0,5) p <sup>AC</sup> <0,05 p <sup>BC</sup> <0,05
Гл.на гладно (ммол/л)	5,25 ± 0,24	9,65 ± 1,54	4,89±0,47	p <sup>AB</sup> < 0,05 p <sup>AC</sup> =NS(0,06) p <sup>BC</sup> <0,05
НВА1с (%)	5,78±0,61	7,78±0,80	4,71±0,31	p <sup>AB</sup> <0.05 p <sup>AC</sup> <0,05 p <sup>BC</sup> <0,05
Общ холестерол (ммол/л)	4,51±0,23	5,49±0,43	4,47±0,52	p <sup>AB</sup> =NS(0,2) p <sup>AC</sup> <0,05 p <sup>BC</sup> <0,05
HDL-холестерол (ммол/л)	1,03±0,09	1,12±0, 11	1,26±0,24	p <sup>AB</sup> =NS(0,19) p <sup>AC</sup> <0,05 p <sup>BC</sup> =NS(0,08)

LDL-холестерол (ммол/л)	3,42±0,30	3,44±0,36	2,58±0,62	$p^{AB} = NS(0,94)$ $p^{AC} < 0,05$ $p^{BC} < 0,05$
Триглицериди (ммол/л)	1,59±0,22	2,33±0,49	1,06±0,33	$p^{AB} < 0,05$ $p^{AC} < 0,05$ $p^{BC} < 0,05$

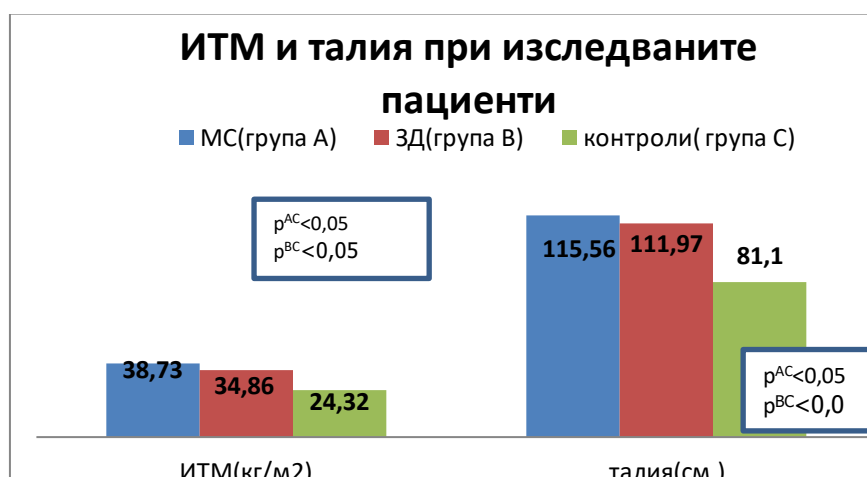
$p^{AB}$ -МС срещу ЗДТ2;  $p^{AC}$ - МС срещу контроли;  $p^{BC}$ - ЗДТ2 срещу контроли; NS- незначително

Всички пациенти от групи А и В изпълняват критериите за метаболитен синдром на Международната диабетна федерация .

При всички лица с МС (група А и В) средните стойности на ИТМ и талията ( фиг.3), систолното и диастолично артериално налягане, плазмените нива на LDL холестерола и серумни триглицериди са статистически значимо по- високи в сравнение с лицата от контролната група (група С).

#### Характеристика на затлъстяването

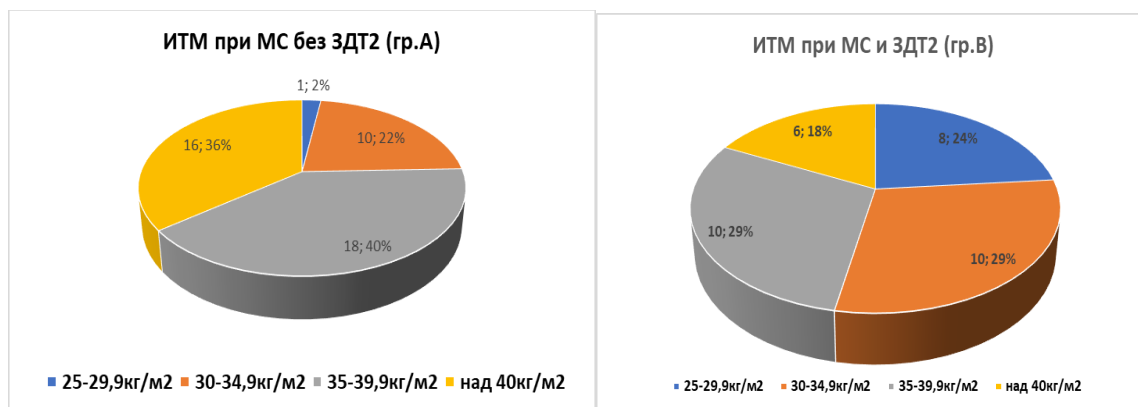
Всички участници в изследването с МС (група А и група В) са със средни стойности на ИТМ и обиколка на талията, показващи затлъстяване (фиг.3).



$p^{AC}$ -МС сравнено с контроли;  $p^{BC}$  -ЗДТ2 сравнено с контроли; $p^{AB}$  -МС сравнено със ЗДТ2.

Фиг.3 ИТМ и обиколка на талията при пациентите с МС, ЗДТ2 и контроли

Разпределението на пациентите с МС без ЗДТ2 (група А) спрямо стойностите на изчисления ИТМ бе съответно (фиг.4).



Фиг.4 Разпределение на пациентите с MC без ЗДТ2( гр.А) и с MC и ЗДТ2( гр.В) спрямо стойностите на ИТМ

На табл.3 са отразени общите характеристики на затлъстяването при пациентите с MC (група А и В). Лицата с MC без ЗДТ2 (групаА) показаха сигнификантно по- висок ИТМ и висцерална мастната тъкан сравнено с изследваните от групата с MC и ЗДТ2 (група В).

Табл.3 Характеристика на затлъстяването при пациентите с MC без ЗДТ2 (група А) и с MC и ЗДТ2 (група В)

Параметри	Група А; (n=45)		Група В; (n=34)	
	Мъже (n=14)	Жени (n=31)	Мъже (n=10)	Жени (n=34)
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )	36,93±5,1	39,54±6,43	34,54±6,43	35,00±6,16
Талия (см.)	117,79±13,13	114,55±17,13	115,00±15,2	110,71±12,14
Дял на мастната тъкан (%)	44,14±4,85	48,48±4,39	46,0±5,66	47,08±4,14
Висцерална мастна тъкан	28,36±10,74	24,96±7,54	21,8±3,82	21,92±6,07

**IV.1.2 Основни параметри на въглехидратен метаболизъм (промени в гликемията в хода на 75 гр. ОГТТ) и инсулиновите индекси: Инсулинова чувствителност (НОМА- IR), Инсулинова секреция (НОМА-%β) и съотношението**

триглицериди/ХДЛ- холестерол на участниците от изследваните групи лица с МС със ЗДТ2 (група В) и без ЗДТ2 (група А).

### Основни параметри на въглехидратен метаболизъм

В табличен вид са отразени нивата на гликемия при пациенти с МС (група А) и контроли (група С) в хода на 75гр. ОГТТ.

Табл. 4 Глюкозни нива в хода на ОГТТ при пациенти с МС (група А) и контроли (Група С)

Кр. глюкоза	Пациенти с МС Група А (n=45)	Контроли Група С (n=21)	Сигнификантност P<0,05
0мин.	5,25±0,8	4,9±0,47	P=0,06
60мин.	8,13±2,25	6,67±1,56	p*
120мин.	6,1±1,8	5,13±1,23	p*

p\*=p<0,05

### Основни инсулинови индекси

Нивата на ендogenous инсулин на гладно, НОМА- ИР и НОМА%В пациентите с МС без ЗД (група А), МС със ЗДТ2 (група В) и контролната група лица (група С) са представени на табл.5.

Табл.5 Нива на ендogenous инсулин, НОМА-ИР и НОМА%В при изследваните пациенти.

Показатели	МС Група А (n=45)	ЗДТ2 Група В (n=34)	Контроли Група С (n=21)	Сигнификантност (p<0.05)
Ендogenous инсулин (μIU/ml)	19,32±3,22	21,79±10,85	9,13±0,74	p <sup>AB</sup> =0,5 P <sup>AC</sup> <0,05 P <sup>BC</sup> <0,05
НОМА-ИР	4,62±0,8	8,06±3,16	1,97±0,16	p <sup>AB</sup> <0,05 P <sup>AC</sup> <0,05 P <sup>BC</sup> <0,05
НОМА%В	258,77±57,76	89,97±38,42	183,31±107,92	p <sup>AB</sup> <0,05



				$P^{AC} < 0,05$ $P^{BC} < 0,05$
--	--	--	--	------------------------------------

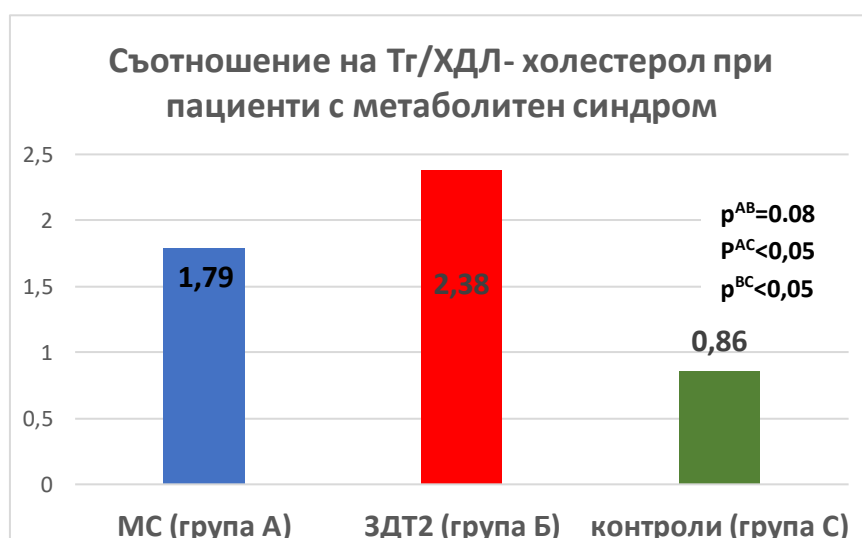
$p^{AB}$ - МС сравнено със ЗДТ2;  $P^{AC}$ -МС сравнено с контроли;  $p^{BC}$  -ЗДТ2 сравнено с контроли

При всички изследвани с висцерално затлъстяване и МС (групи А и В) се установява базална сутрешна хиперинсулинемия на гладно и изявена инсулинова резистентност.

### Съотношение на Тг/ ХДЛ холестерол

Направено е сравнение на съотношението Тг/ХДЛ холестерол, като сурогатен атерогенен индекс и маркер за чернодробна инсулинова резистентност между трите групи.

Резултатите показват, че отношението Тг/ХДЛ бе повишено при пациентите от активните групи А ( $1,79 \pm 0,91$ ) и В ( $2,38 \pm 1,97$ ) спрямо здравите контролни лица ( $0,86 \pm 0,28$ ) (Фиг. 5). Сравнението на отношението Тг/ХДЛ между група А и група В не установява сигнификантно различие, докато такава се установява при сравняването им с група С.



$p^{AB}$ - МС сравнено със ЗДТ2;  $P^{AC}$ -МС сравнено с контроли;  $p^{BC}$  -ЗДТ2 сравнено с контроли;

Фиг. 5 Съотношение Тг/ХДЛ-хол. при изследваните пациенти с МС (гр.А и В) и контроли (гр.С)

При всички изследвани с МС (група А и група В) не се установиха статистически значими корелации между отношението Тг/ХДЛ-хол. с ИТМ, обиколката на талията, гликемията и ендогенния инсулин на гладно, НОМА-ИР и НОВА%В.

При пациентите с МС без ЗДТ2 (група А) се откри силна линейна позитивна взаимовръзка между Тг/ХДЛ-хол. и плазмените нива на IL-1 с корелационен коефициент на Пийърсън  $r=0,5$ ;  $p=0,008$ .

В групата на МС със ЗДТ2 (група В) съотношението Тг/ХДЛ-хол. и СУЕ показва положителна линейна корелационна зависимост с  $r=0,5$ ;  $p=0,003$ .

#### IV.1. 3 Нива на плазмени цитокини - IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ и hsCRP между изследваните групи лица с МС без ЗДТ2 (група А) и със ЗДТ2 (група В).

##### Плазмени цитокини

В табличен и графичен вид са представени резултатите от изследваните нива на плазмени цитокини (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) и hsCRP при пациенти с МС без ЗД (група А), МС със ЗДТ2 (група В) и контроли (група С).

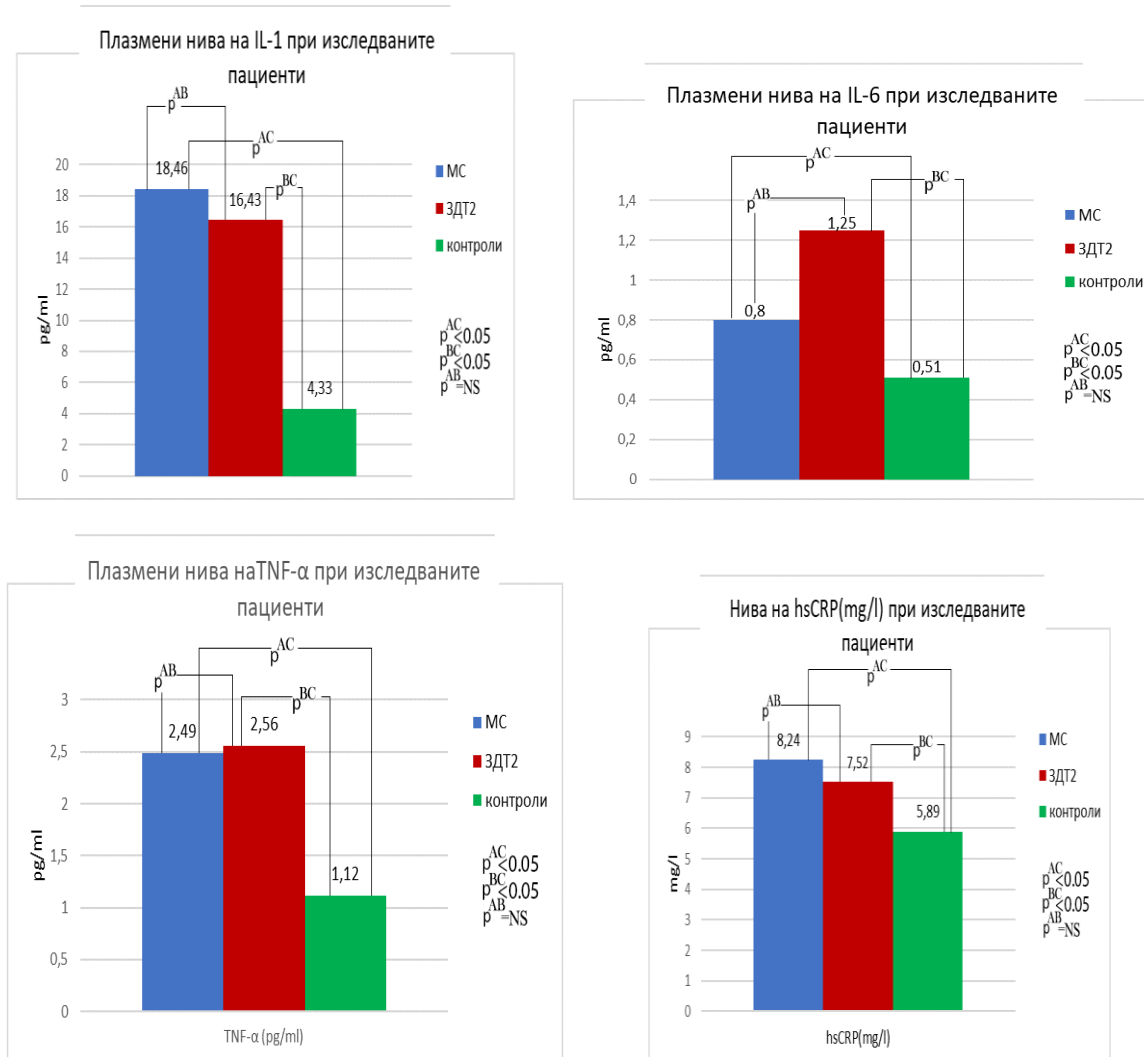
Табл. 6 Нива на плазмени цитокини - IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  и hsCRP между изследваните групи лица с МС без ЗДТ2 (група А) и със ЗДТ2 (група В).

Показатели (референтни стойности)	МС без ЗД Група А (n=45)	МС със ЗДТ2 Група В (n=34)	Контроли Група С (n=21)	Сигнификантност $P < 0,05$
<b>IL-1</b>	18,46 $\pm$ 4,34	16,42 $\pm$ 2,18	4,33 $\pm$ 1,46	$P_{AB} = NS$ (0,43) $p^{AC} < 0,05$ $p^{BC} < 0,05$
<b>IL-6</b> (0-2pg/ml)	1,97 $\pm$ 0,16	1,25 $\pm$ 0,41	0,51 $\pm$ 0,3	$P_{AB} = NS$ (0,1) $p^{AC} < 0,05$ $p^{BC} < 0,05$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (0-8pg/ml)	2,49 $\pm$ 1,17	2,56 $\pm$ 1,5	1,12 $\pm$ 0,58	$P^{AB} = NS$ (0,38) $p^{AC} < 0,05$ $p^{BC} < 0,05$
<b>hsCRP</b> (0,03- 63,68mg/l)	8,24 $\pm$ 1,48	7,53 $\pm$ 2,22	5,9 $\pm$ 2,36	$P^{AB} = NS$ (0,5) $p^{AC} < 0,05$ $p^{BC} < 0,05$

$p^{AB}$ -МС срещу ЗДТ2;  $p^{AC}$ - МС срещу контроли;  $p^{BC}$ - ЗДТ2 срещу контроли; NS- несигнификантно

При пациентите с МС (групи А и В) се установяват статистически значимо по- високи плазмени нива на IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  и hsCRP спрямо контролната група лица.

При сравняване на получените резултати между изследваните с МС без ЗДТ2 (група А) и с МС и ЗДТ2 (група В) не се откриват сигнификантни различия в плазмените нива на изследваните цитокини и hsCRP (фиг.6).



Фиг.6 Плазмени нива на IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  и hs CRP сред изследваните пациенти с МС без ЗД (група А), с МС и ЗДТ2 (група В) и контроли (група С).

При анализиране на нивата на плазмените цитокини и hsCRP се установиха полови разлиия. Най-високи нива на IL-1 се отчетоха при мъжете с МС без ЗДТ2 (група А), като са сигнификантно по- високи спрямо тези при мъжете с МС и ЗДТ2 (група В) ( $p < 0,05$ ) и здравите (група С) ( $p < 0,05$ ).

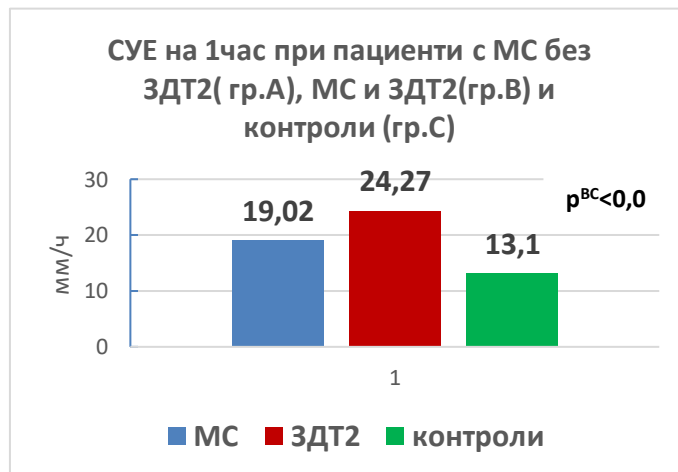
При сравнение на плазмените нива на П-6 по пол в отделните групи също при мъжете с МС без ЗДТ2 ( група А) се отчетоха сигнификантно най- високи нива на П-6 сравнено с мъжете с МС и ЗДТ2 МС и ЗДТ2 (група В) ( $p < 0,05$ ) и здравите (група С) ( $p < 0,05$ ).

Най- високи нива на TNF $\alpha$  имаха жените с МС и ЗДТ2, като различията не показаха статистическа значимост при сравняване с тези при жените от групата на МС без ЗДТ2 (група В).

Всички лица от женски пол ( гр. А, В и С) са с по- високи плазмени нива на hsCRP спрямо мъжете.

### **Значение на промените в СУЕ и левкоцитен брой в генезата на метаболитния синдром.**

Установиха се статистически значими различия в средните стойности на СУЕ на 1вия час между изследваните лица от активна група В ( $24,27 \pm 5,62$ ) и контролните лица от група С ( $13,1 \pm 9,39$ ); (фиг.7).



Фиг.7 СУЕ на 1 ви час при пациенти с МС без ЗДТ2 (гр. А), с МС и ЗДТ2(гр. В) и контроли.

От периферната кръвна картина беше проследен общия левкоцитен брой.

При всички участници в проучването общият левкоцитен брой е в рамките на стандартизираният референтен обхват. Най- високи нива се установиха сред пациентите с МС без ЗДТ2 (група А), които показаха статистически значими различия спрямо общия левкоцитен брой при здравите лица от контролната група (група С) (табл.7).

Табл.7 Общ левкоцитен брой в периферна кръв при пациенти с МС без ЗДТ2 (група А), с МС и ЗДТ2( група В) и контроли ( група С)

Параметри	МС без ЗДТ2 Група А (n=45)	МС и ЗДТ2 Група В (n=34)	Контроли Група С (n=21)	Сигнификантност ( $P < 0,05$ )

Общ левкоцитен брой $\times 10^9/\text{л}$	8,14 $\pm$ 0,56	7,47 $\pm$ 0,65	6,89 $\pm$ 0,49	$p^{\text{AB}}$ NS(0,12) $p^{\text{AC}}$ <0,05 $p^{\text{BC}}$ NS(0,2)
--	-----------------	-----------------	-----------------	--

Общ левкоцитен брой над горен референтен обхват ( $10 \cdot 10^9/\text{л}$ ) беше установен при 11 (24,4%) пациенти с МС без ЗДТ2 (група А), при 6 (17,6%) пациенти с МС и ЗДТ2 (група В) и съответно при 2 (9,5%) от здравите лица в контролната група (група С).

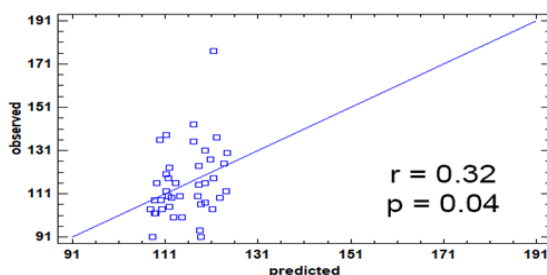
**IV.1.4 Взаимовръзки между плазмените нива на изследваните цитокини (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) и изследваните параметри на нискостепенното хронично възпаление (hsCRP, СУЕ, общ левкоцитен брой,) с параметрите на въглехидратна обмяна, инсулиновите индекси и висцералното затлъстяване.**

**Зависимости между изследваните цитокини (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) и проучените маркери на субклинично възпаление (hsCRP, СУЕ, общ левкоцитен брой) със затлъстяването, отразено чрез ИТМ и обиколка на талията.**

В групата на пациентите с МС без ЗДТ2 (гр. А) се установиха зависимости между :

- Между ИТМ и нивата на hsCRP се установи умерена, статистически значима линейна корелационна зависимост с корелационен коефициент на Пийърсън  $r=0,33$  и  $p=0,03$ .
- Статистически значима, линейна умерена корелационна зависимост се отчете между обиколката на талията и нивата на hsCRP с корелационен коефициент на Пийърсън  $r=0,32$  и  $p=0,04$ . (фиг.8)

Корелационна зависимост между талия и CRP сред пациенти с МС(гр.А)

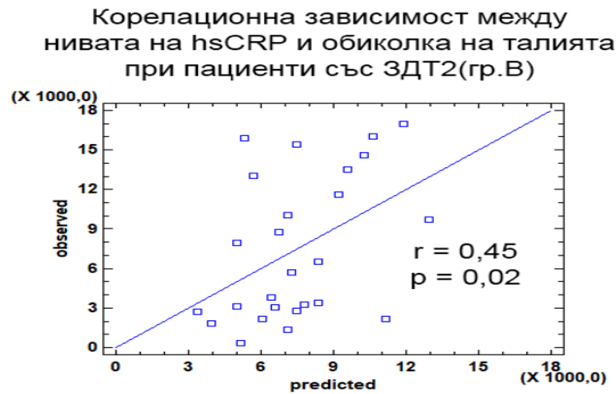


Фиг.8 Корелационна зависимост между талия и нива на hsCRP при пациенти с МС без ЗДТ2 (гр.А).

-Между висцералното затлъстяване, отразено чрез ИТМ и обиколката на талията и плазмените нива на изследваните цитокини (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), СУЕ и общ левкоцитен брой при лицата с МС без ЗДТ2 (група А) не се установиха статистически значими корелационни зависимости.

При изследваните лица МС и ЗДТ2 (гр. В) също се откриха корелационни зависимости, които са статистически значими:

- Между обиколката на талията и нивата на hsCRP: линейна, умерена зависимост с корелационен коефициент на Пийърсън  $r=0,45$  и  $p=0,02$  (фиг.9).



Фиг.9 Корелационен анализ между нивата на hsCRP и обиколката на талията при пациенти с МС и ЗДТ2 (гр. В)

- Между обиколката на талията и СУЕ: умерена положителна зависимост с корелационен коефициент на Пийърсън  $r=0,37$  и  $p=0,04$ .
- Между ИТМ и СУЕ: линейна умерена положителна зависимост с корелационен коефициент на Пийърсън  $r=0,37$  и  $p=0,03$ .
- Между ИТМ и плазмените нива на TNF- $\alpha$ : линейна умерена положителна корелация с корелационен коефициент на Пийърсън  $r=0,48$  и  $p=0,004$ .

При анализиране на взаимовръзката между висцералното затлъстяване, отразено чрез ИТМ и обиколката на талията с нивта на IL-1, IL-6 и общ левкоцитен брой при лицата с МС и ЗДТ2 ( група В) не се установиха статистически значими корелационни зависимости.

При здравите лица, използвани като контролна група (група С) се установи умерена, положителна линейна статистически значима корелационна зависимост само между обиколката на талията и СУЕ ( $r=0,44$  и  $p=0,05$ ); (табл.8).

Табл.8 Корелационни зависимости между изследваните цитокини (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  ) и маркери на субклинично възпаление (hsCRP, СУЕ, общ левкоцитен брой), ИТМ и обиколка на талията сред пациентите с МС без ЗДТ2 (гр.А), МС и ЗДТ2 (група В) и контролите(група С).

	<b>IL6 (гр.А)</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math> (гр.А)</b>	<b>hs CRP (гр.А)</b>	<b>СУЕ (гр.А)</b>	<b>Левкоцити (гр.А)</b>
<b>ИТМ ( гр.А)</b>	r=0,1051	r=-0,0776	<b>r=0,3271</b>	r=0,0560	r=0,0757
	p=0,4920	p=0,6124	<b>p=0,0345</b>	p=0,7214	P=0,6212
<b>Талия ( гр.А)</b>	r=0,1556	r=-0,0638	<b>r=0,3156</b>	r=0,0485	r=0,0089
	p=0,3074	p=0,6773	<b>p=0,0417</b>	p=0,7577	p=0,9536
	<b>IL6 (гр.В)</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math> ( гр.В)</b>	<b>hs CRP ( гр.В)</b>	<b>СУЕ (гр.В)</b>	<b>Левкоцити (гр.В)</b>
<b>ИТМ ( гр.В)</b>	r=0,1999	<b>r=0,4764</b>	<b>r=0,3005</b>	<b>r=0,3694</b>	r=0,2828
	p=0,2569	<b>p=0,0044</b>	p=0,1358	<b>p=0,0344</b>	p=0,1108
<b>Талия ( гр.В)</b>	r=0,2593	r=0,1095	<b>r=0,4453</b>	<b>r=0,3659</b>	r=0,2519
	p=0,1387	p=0,5374	<b>p=0,0226</b>	<b>p=0,0363</b>	p=0,1573
	<b>IL6 (гр.С)</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math> (гр.С)</b>	<b>hs CRP (гр.С)</b>	<b>СУЕ (гр.С)</b>	<b>Левкоцити (гр.С)</b>
<b>ИТМ ( гр.С)</b>	r=-0,2174	r=-0,1255	r=0,2907	r=0,1250	r=0,1633
	p=0,3439	p=0,5878	p=0,2136	p=0,5891	p=0,4795
<b>Талия ( гр.С)</b>	r=-0,0344	r=0,3739	r=0,1257	<b>r=0,4403</b>	r=0,0445
	p=0,8824	p=0,0950	p=0,5974	<b>p=0,0457</b>	p=0,8483

Зависимости между изследваните цитокини (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  ) и проучените маркери на субклинично възпаление (hsCRP, СУЕ, общ левкоцитен брой ) с гликемията и индексите на инсулиновата секреция и чувствителност (табл.11).

Табл.9 Корелационни зависимости между изследваните цитокини (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) и маркери на субклинично възпаление (hsCRP, СУЕ, общ левкоцитен брой), и кр. захар на 0 мин. и 120 мин от ОГТТ, НОМА-ИР и НОМА В сред пациентите с МС без ЗДТ2 (гр.А).

Група А	КЗ 0 мин	КЗ 120 мин	ИРИ	НОМА-ИР	НОМА В
<b>IL1</b>	r=0,0914	r=-0,1839	r=-0,0501	r-0,0585	r-0,0614
	p=0,5504	p=0,2497	p=0,7439	p=0,7025	p=0,6885
<b>IL6</b>	r=0,1644	<b>r=0,3381</b>	r=0,2393	r=-0,2786	r=0,1165
	p=0,3043	<b>p=0,0407</b>	p=0,1318	p=0,0777	p=0,4681
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	r=-0,1301	r=0,1700	r=0,0580	r=-0,0012	r=-0,1574
	p=0,4176	p=0,3144	p=0,7189	p=0,9942	p=0,3258
<b>hsCRP</b>	r=-0,1692	r=0,1253	r=0,2858	r=0,1958	<b>r=0,4047</b>
	p=0,2840	p=0,4534	p=0,0665	p=0,2139	<b>p=0,0078</b>

\*КЗ-кръвна захар

При пациентите със МС без ЗДТ2 (група А) се установяват позитивни корелации между:

1. Плазмените нива на IL-6 и кр. захар на 120 мин. в хода на ОГТТ; умерена статистически значима линейна корелационна зависимост с корелационен коефициент на Пийърсън  $r=0,34$ ;  $p=0,04$ .
2. Умерена, статистически значима позитивна корелационна зависимост се установи между острофазовият белтък на възпалението (hsCRP) и инсулиновата секреторна активност на  $\beta$  клетките (НОМА-В) ( $r=0,4$ ;  $p=0,01$ ).
3. Статистически значима положителна корелационна зависимост показаха също СУЕ на 1 час с ендогенен инсулин на гладно ( $r=0,45$ ;  $p=0,002$ ), с нива на инсулинова резистентност (НОМА-ИР) ( $r=0,43$ ;  $p=0,004$ ) и инсулиновата секреторна активност на  $\beta$  клетките (НОМА-В) ( $r=0,35$ ;  $p=0,001$ ).

Табл.10 Корелационни зависимости между плазмените нива на изследваните цитокини (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) и параметрите на нискостепенното възпаление (hsCRP, СУЕ, общ левкоцитен брой) с параметрите на въглехидратната обмяна и инсулиновите индекси



при пациентите с МС и ЗДТ2 (гр.В).

Група В	КЗ 6ч	КЗ 12ч	КЗ 15ч	КЗ 18ч	НвА1с	ИРИ	НОМА ИР	НОМА В
<b>IL-1</b>	r=-0,1037 p=0,5596	r=-0,2507 p=0,1814	r=-0,0430 p=0,8249	r=0,0099 p=0,9592	<b>r=-0,3782</b> <b>p=0,0431</b>	<b>r=0,5376</b> <b>p=0,0145</b>	<b>r=0,4161</b> <b>p=0,0481</b>	<b>r=0,5973</b> <b>p=0,0069</b>
<b>IL-6</b>	r=0,1144 p=0,1528	r=-0,1711 p=0,36	r=0,07 p=0,694	r=0,08 p=0,554	r=0,1144 p=0,55	r=0,1417 p=0,548	r=0,108 p=0,65	r=0,273 p=0,287
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	r=-0,0807 p=0,6500	r=-0,1194 p=0,5297	r=-0,0879 p=0,6502	r=0,0337 p=0,8623	r=-0,2330 p=0,2238	r=-0,2330 p=0,2238	r=0,0580 p=0,8081	r=0,273 p=0,258
<b>hsCRP</b>	r=-0,2215 p=0,2768	r=0,3599 p=0,0841	r=-0,3538 p=0,0977	<b>r=0,4419</b> <b>p=0,0347</b>	<b>r=0,4224</b> <b>p=0,0502</b>	r=-0,0199 p=0,9510	r=0,2645 p=0,4060	r=-0,1879 p=0,558
<b>СУЕ</b>	r=-0,2753 p=0,1210	r=0,1838 p=0,3309	r=0,2024 p=0,2924	r=0,0067 p=0,9724	r=0,1396 p=0,4702	r=-0,0561 p=0,8196	r=0,1150 p=0,6391	r=0,138 p=0,584
<b>левкоцити</b>	r=-0,1232 p=0,4947	r=0,1005 p=0,5973	r=0,3001 p=0,1138	r=0,1357 p=0,4828	r=0,0574 p=0,7675	r=0,2222 p=0,3605	r=0,2384 p=0,3257	r=0,266 p=0,285

\*КЗ-кръвна захар

При пациентите със МС и ЗДТ2 (група В) се установяват следните корелационни зависимости:

1. Позитивна, силна, статистически значима корелационна зависимост между плазмените нива на IL-1 и ендогенния инсулин на гладно (ИРИ) с корелационен коефициент на Пийърсън  $r=0,54$   $p=0,01$ .
2. Силна, положителна, статистически значима взаимовръзка се установи между плазмените нива на IL-1 и НОМА В ( $r=0,6$ ;  $p=0,007$ ).
3. Умерена, положителна корелация имаше и между серумните нива на IL-1 и индексът за ИР- НОМА ИР ( $r=0,42$ ;  $p=0,05$ ).
4. Нивата на hsCRP при тези пациенти показаха положителна, умерена корелация с постпрандиалната хипергликемия в 18ч ( $r=0,44$ ;  $p=0,03$ ) от КЗП и нивата на НвА1с ( $r=0,42$ ;  $p=0,05$ ).

На таблица 11 е видно, че има умерена позитивна корелация между плазмените концентрации на IL-1 и нивата на кръвна захар на 120 мин. в хода на ОГТТ ( $r=0,47$ ;  $p=0,03$ ) и негативна сигнификантна взаимовръзка между TNF- $\alpha$  и гликемията на 60 мин в хода на ОГТТ ( $r=-0,44$ ;  $p=0,04$ ) и между СУЕ и НвА1с ( $r=-0,52$ ;  $p=0,02$ ) при лицата от група С.

Табл.11 Корелационни зависимости между плазмените нива на изследваните цитокини (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) и параметрите на нискостепенното възпаление (hsCRP, СУЕ, общ левкоцитен брой) с параметрите на въглехидратната обмяна и инсулиновите индекси при контроли (гр.С).

Група С	КЗ 0мин.	КЗ 60мин	КЗ 120мин	НвА1с	ИРИ	НОМА-ИР	НОМА В
<b>IL-1</b>	R=0,01 P=0,96	R=0,38 P=0,09	<b>R=0,47</b> <b>P=0,03</b>	R=-0,03 P=0,89	R=-0,03 P=0,90	R=-0,03 P=0,90	R=0,28 P=0,22

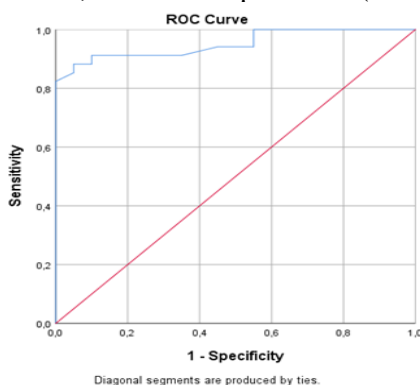
<b>IL-6</b>	R=-0,13	R=0,26	R=-0,19	R=0,16	R=0,02	R=-0,04	R=-0,02
	P=0,59	P=0,26	P=0,41	P=0,5	P=0,93	P=0,86	P=0,95
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	R=-0,11	<b>R=-0,44</b>	R=-0,03	R=-0,18	R=0,19	R=0,12	R=-0,06
	P=0,65	<b>P=0,04</b>	P=0,87	P=0,42	P=0,40	P=0,61	P=0,78
<b>hsCRP</b>	r=-0,29	r=-0,14	r=0,03	r=0,21	r=0,29	r=0,14	r=-0,11
	p=0,22	p=0,55	p=0,9	p=0,38	p=0,22	p=0,57	p=0,64
<b>CУЕ</b>	R=0,08	R=-0,23	R=0,15	<b>R=-0,52</b>	R=0,16	R=0,20	R=0,01
	P=0,73	P=0,32	P=0,51	<b>P=0,02</b>	P=0,5	P=0,39	P=0,965
<b>Левк.</b>	R=0,04	R=-0,04	R=0,05	R=-0,35	R=0,33	R=0,34	R=-0,00
	P=0,86	P=0,87	P=0,85	P=0,12	P=0,15	P=0,12	P=0,99

\*КЗ- кръвна захар

**Зависимости между изследваните цитокини (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) и проучените маркери на субклинично възпаление (hsCRP, CУЕ, общ левкоцитен брой) с плазмените нива на общ холестерол, ХДЛ- холестерол, ЛДЛ- холестерол и триглицериди.**

- Сред групата изследвани с МС без ЗДТ2 (група А) не се установиха статистически значими корелации.
  - При пациентите с МС и ЗДТ2 (група В) се установиха:
    - При оценка на корелационната зависимост между нивата на HDL-холестерол и hsCRP се установи статистически значима, силна, негативна линейна зависимост с корелационен коефициент на Пийърсън  $r = -0,45$  и  $p = 0,02$ .
    - Установи се силна, отрицателна, статистически значима зависимост и между нивата на HDL- холестерола и CУЕ в същата група пациенти ( $r = -0,5, p = 0,003$ ).
    - Силна статистически значима линейна корелация показаха изчислените плазмени нива на LDL – холестерола и общия левкоцитен брой ( $r = 0,44; p = 0,003$ ).
  - В контролната група (група С) сред здравите лица също не се установиха статистически значими корелации.
- Проведен бе логистичен регресионен анализ. Приложен бе методът на ROC- кривите за установяване на сигнификантна прагова стойност.

За възрастта се установи сигнификантна прагова стойност от **38,5 години** с 88,24% чувствителност и 95,00% специфичност (AUC 0,951,  $p = 0,000$ ); (фиг. 10)

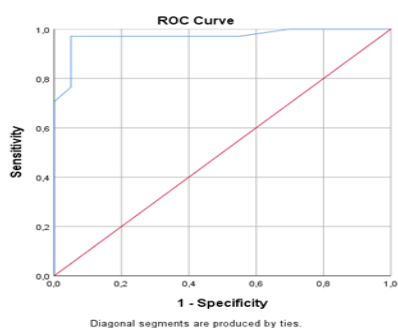


).

Фиг.10 ROC -крива на възрастта за определяне на праговите стойности при отграничаване на пациентите с и без МС и ЗДТ2.

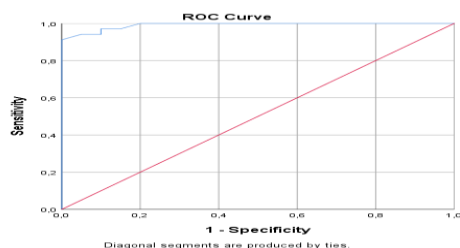
Сред включените в нашето проучване лица на възраст по- голяма или равна на 38,5 години рискът за развитие на ЗДТ2 сред пациентите с МС е 142,5 пъти по- висок спрямо по- младите (OR=142,5, 95% CI 14,79-1372,989; p<0,001). Нашите резултати потвърждават значението на възрастта като рисков немодифицируем фактор за развитие на ИР и ЗДТ2.

При изследваните от нас лица с **ИТМ  $\geq 26,5 \text{ кг/м}^2$**  (cut off-26,5; 97,10% чувствителност, 95,00% специфичност) рискът за развитие на ЗДТ2 е 627,0 пъти по- висок спрямо риска при тези с по- нисък ИТМ ( OR 627, 95% CI 37,049-10610, 933; p<0,001). Нашите резултати също така потвърждават водещата роля на затлъстяването, отразено чрез ИТМ, в развитието на ИР, нискостепенното- хронично възпаление и риска за развитие на ЗДТ2 (AUC 0,970, p=0, 000); (фиг.11).



Фиг.11 ROC -крива на ИТМ за определяне на праговите стойности при отграничаване на пациентите с и без МС и ЗДТ2.

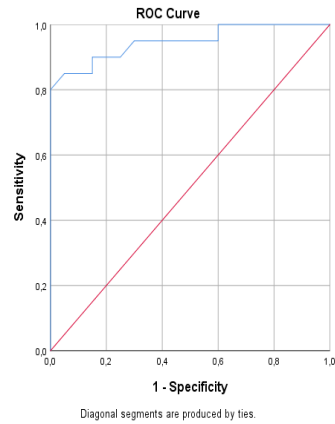
Определената прагова стойност на **обиколката на талията  $\geq$  на 97см.**, която разграничава пациентите с МС и ЗДТ2 от тези без МС и ЗДТ2, чрез метода на ROC кривите бе с много висока чувствителност (91,2%) и специфичност (100.0%), p<0,001 (AUC 0,991, p=0, 000);(фиг.12). Този физикален показател, като характеристика на висцералното затлъстяване при изследваните от нас пациенти не бе използван като фактор за оценка на шансовете за развитие на ЗДТ2 поради малкия обем на изследваните групи и невъзможност за прилагане на логистичния регресионен анализ.



Фиг.12 ROC -крива на обиколка на талията за определяне на праговите стойности при отграничаване на пациентите с и без МС и ЗДТ2.

Като силен предиктивен фактор за развитието на МС и ЗДТ2 се откри ИР, изразена чрез НОМА-ИР. Нива на прагова стойност на **НОМА-ИР  $\geq 2,39$**  с висока чувствителност

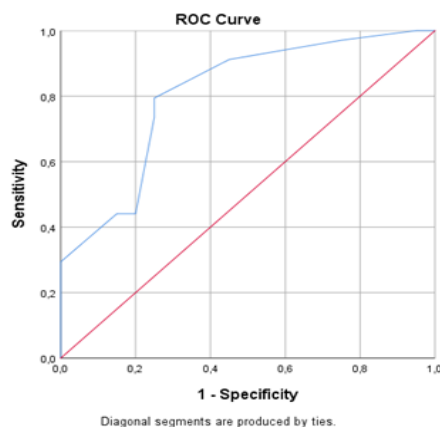
(85%) и специфичност (95%) (AUC 0,948,  $p=0,000$ ) разграничават пациентите с МС и ЗДТ2 от тези без ЗДТ2. При НОМА- ИР $\geq 2,39$  риска за развитие на ЗДТ2 се повишава със 108 пъти (OR-107,667, 95% CI 10,208-1135,585,  $p<0,001$ ) (фиг.13).



Фиг.13 ROC -крива на НОМА-ИР за определяне на праговите стойности при отграничаване на пациентите с и без МС и ЗДТ2.

Стойностите на систолното артериално налягане  $\geq 122,5\text{mmHg}$  с по-ниска, но приемлива чувствителност (79,4%) и специфичност (75,0%) разграничават пациентите със и без ЗДТ2. При посочената прагова стойност на систолното артериално налягане риска за развитие на ЗДТ2 е 12 пъти по-висок спрямо този при лицата с по-ниски нива на систолно артериално налягане (фиг.14).

Установената прагова стойност на диастолното артериално налягане  $\geq 82,5\text{mmHg}$  чрез метода на ROC кривите при по-ниска чувствителност (58%) и специфичност (85%) (AUC 0,807,  $p=0,000$ ) повишава вероятността за развитие на ЗДТ2 с 8 пъти (OR 8,095, 95% CI 1,987-32,979,  $p=0,004$ ) сред изучаваната група.



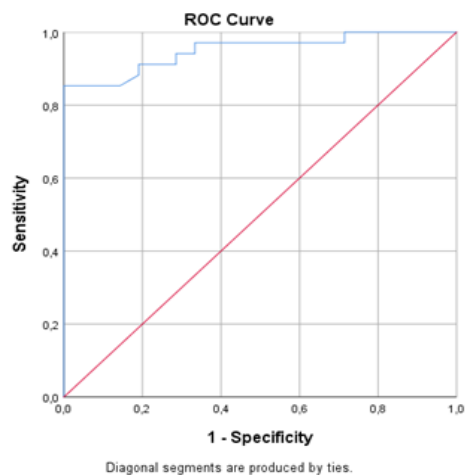
Фиг.14 ROC -крива на систолно артериално налягане за определяне на праговите стойности при отграничаване на пациентите с и без МС и ЗДТ2.

В логистичния регресионен анализ като независими променливи бяха включени и нивата на общ холестерол, LDL-холестерола и серумните триглицериди. В таблица 12 са отразени получените резултати. Не се установиха сигнификантни прагови стойности на HDL-холестерола в метода на ROC-кривите ( $p > 0,05$ ).

Табл.12 Резултати от логистичен регресионен анализ при изследване на серумни нива на общ холестерол, триглицериди и LDL-холестерол като независими фактори за развитие на ЗДТ2.

Променлива	Cut-off	чувствителност	специфичност	OR	95% CI Долна граница	95% CI Горна граница	Сигнификантност ( $P \leq 0.05$ )
Общ холестерол (ммол/л)	$\geq 4.975$	59.10%	90.00%	<b>11,848</b>	2,858	49,127	0.001
Триглицериди (ммол/л)	$\geq 1.21$	91.20%	73.70%	<b>28,933</b>	6,054	138,284	<0.001
LDL-холестерол (ммол/л)	$\geq 2.925$	86.20%	77.80%	<b>21,875</b>	4,725	101,283	<0.001

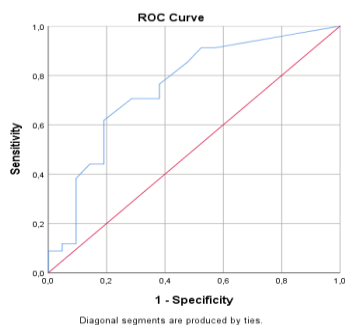
Проведен бе също регресионен анализ за да се оцени дали IL-1 може да има предсказваща стойност за риска за развитие на ЗДТ2. Определиха се нива  $\geq 10,25 \text{ pg/ml}$  (оптимална точка на пресичане) с 85,3% чувствителност и 100% специфичност, ( $p < 0,001$ ) разграничаващи лицата с МС и ЗДТ2 от тези без ЗДТ2 (AUC 0,95,  $p = 0,000$ ); (фиг.15).



Фиг.15 ROC -крива на IL-1 за определяне на праговите стойности при отграничаване на пациентите с и без МС и ЗДТ2.

Малкият брой изследвани пациенти обаче не позволява да се изчисли съотношението на шансовете за този фактор за развитието на ЗДТ2. Този резултат поставя въпроса за последващо изучаване на IL-1, като предиктивен фактор за развитие на ЗДТ2 в по-голям обем пациенти с МС.

Нива на IL-6  $\geq 0,85\text{pg/ml}$  с по-малка чувствителност (61%) и добра специфичност (81%) разграничават лицата със и без ЗДТ2 (AUC 0,753,  $p=0,002$ ); (фиг.16). При пациенти с нива на IL-6  $\geq 0,85\text{pg/ml}$  спрямо тези с по-ниски плазмени нива на този цитокин рискът за възникване на ЗДТ2 е 6,42 (OR-6,452, 95% CI 1,796-23,608;  $p<0,005$ ) пъти по-висок.



Фиг. 16 ROC -крива на IL-6 за определяне на праговите стойности при отграничаване на пациентите с и без МС и ЗДТ2.

За TNF- $\alpha$  и hsCRP установените cut off нива не показаха сигнификантност, което отхвърля приложението на тези лабораторни показатели в нашето проучване като самостоятелни информативни фактори на възпалението, разграничаващи лицата с МС и ЗДТ2 от здравите лица.

При използването на модел с повече от една промелива в логистичния регресионен анализ, с точност се оформиха като комплекс предиктивни фактори за развитието на ЗДТ2 диастолното артериално налягане ( $\geq 82,5\text{mmHg}$ ), нивата на IL-6 ( $\geq 0,85\text{pg/ml}$ ) и hsCRP ( $\geq 1,896\text{mg/l}$ ) (табл.13).

Табл.13.Регресионен логистичен анализ с модел от няколко променливи.

Показател	Средна стойност	Долен обхват	Горен Обхват	Значимост P≤0,05	Относителен риск	95% С.І.	
						Долна граница	Горва граница
Диастолно АН	2,590	,935	7,666	,006	<b>13,324</b>	2,131	83,319
П-6	1,958	,816	5,764	,016	<b>7,088</b>	1,433	35,067
hsCRP	2,338	1,007	5,393	,020	<b>10,360</b>	1,440	74,529
	-2,967	1,054	7,918	,005	,051		

Чрез метода на ROC кривите се определиха сигнификантните прагови стойности на клинично- лабораторните параметри на МС и общия левкоцитен брой и изучаваните интерлевкини (табл.14)

Табл. 14 Резултати от логистичен регресионен анализ при изследване на клинично-лабораторни показатели и инфламаторни маркери като независими фактори за развитие на МС.

Променливи величини (фактори)	Cut-off	Чувствителност	Специфичност	Сигнификантност p≤0,05
Възраст	<b>38.5</b>	53.30%	95.00%	0,002
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )	<b>27.5</b>	100.00%	95.00%	<0,001
Талия (см.)	<b>98</b>	93.30%	100.00%	<0,001
Систолно АН (mmHg)	<b>117.5</b>	95.60%	60.00%	<0,001
Диастолно АН (mmHg)	<b>77.5</b>	93.30%	50.00%	<0,001
НОМА- ИР	<b>2.41</b>	77.80%	100.00%	0,001
НОМА В	<b>145.99</b>	77.78%	75.00%	0,005

Общ холестерол (mmol/l)	<b>4.975</b>	59.10%	90.00%	0,004
ХДЛ- холестерол (mmol/l)	<b>0.985</b>	61.40%	84.70%	0,001
Триглицериди (mmol/l)	<b>1.075</b>	70.50%	68.400%	0,005
ЛДЛ-хол (mmol/l)	<b>2.905</b>	68.20%	72.20%	0,002
Левкоцити (x10 <sup>9</sup> /l)	<b>7.85</b>	55.60%	90.00%	0,004
IL-1 (pg/ml)	<b>10.05</b>	86.70%	100.00%	<0,001
IL-6 (pg/ml)	<b>0.85</b>	42.20%	81.00%	0,049
hsCRP (mg/l)	<b>1,699</b>	95.60%	38.10%	0,029

Получените резултати показаха, че с най- голяма диагностична точност и стойност при разграничаване на лицата с МС от тези без МС имат ИТМ, обиколката на талията и нивата на IL-1.

#### **Анализ на получените данни.**

При всички изследвани с МС ( група А и В) се отчитат статистически значимо повишени плазмени нива на изследваните цитокини спрямо здравите лица в контролната група (С).

Нивата на IL-1 са по- високи при МС без ЗДТ2 (групаА), сравнено с МС и ЗДТ2 ( като тези различия са статистически несигнификантни. Установиха се полови различия в плазмените нива на IL-1. Статистически достоверно най- високи нива на този интерлевкин показаха мъжете с МС без ЗДТ2 (група А). Само при ЗДТ2 се доказаха линейни позитивни корелационни зависимости между IL-1, ендогенния инсулин на гладно (ИРИ), нивата на инсулинова резистентност (НОМА-ИР) и инсулиновата секреторна активност (НОМА В). Нива на IL-1  $\geq 10,25$ pg/ml са определената cut off стойност която разграничава лицата без и със ЗДТ2.



Най- високи **концентрации на IL-6** се установиха отново сред пациентите с МС без ЗДТ2 (група А), като различията не бяха статистически достоверни с отчетените плазмени нива на този цитокин при МС и ЗДТ2 (група В). Както и при IL-1, мъжете с МС без ЗДТ2 (група А) имаха сигнификантно по- високи нива на IL-6. Получените резултати показаха положителна линейна взаимовръзка между нивата на гликемията на 120 мин. в хода на ОГТТ с плазмените концентрации на IL-6. При включените в нашето проучване лица с нива на IL-6  $\geq 0,85\text{pg/ml}$  спрямо тези с по-ниски плазмени нива на този цитокин рискът за възникване на ЗДТ2 е около 7 пъти по- висок.

**Нива на TNF-  $\alpha$**  са статистически незначимо по- високи при изследваните с МС и ЗДТ2 (група В), спрямо тези с МС без ЗДТ2 (група А). При ЗДТ2 (група В) се установиха позитивна корелационна зависимост между обиколката на талията и плазмените концентрации на този изследван цитокин.

Доказаните позитивни корелации между нивата на IL-1 с инсулиновите нива и индекси, на IL-6 с нивата на глкемията и на TNF- $\alpha$  с обиколката на талията дават основание да се обсъжда ролята на интерлевкините в поддържането на нискостепенното хронично възпаление и влиянието им в активиране на последващи имунологични процеси в хода на МС и развитието на ЗДТ2. Сред нашите пациенти се установиха нива на IL-6 с предсказваща роля на риска за развитието на ЗДТ2 с добра диагностична точност и ограничена диагностична ценност и нива на IL-1 с отлична диагностична точност и ценност.

Установиха се статистически по- високи нива на **hsCRP** при лицата с МС (група А и В) спрямо контролната група. Измерените нива на hsCRP в групата с МС без ЗДТ2 (група А) са статистически незначимо по- високи спрямо тези при МС и ЗДТ2 (група В). При всички включени в проучването лица (групи А, В и С) се отчетоха по- високи стойности на **hsCRP** за жените. Позитивна сигнификантна корелация се наблюдава между обиколката на талията при МС. За изследваните с МС без ЗДТ2 ( група А) се наблюдава и умерена позитивна взаимовръзка между плазмените нива на острофазовия възпалителен протеин-CRP и  $\beta$  секреторната активност, отразена чрез НОМА-В индекса. С развитието на ЗДТ2 ( група В) при МС се проявява сигнификантна позитивна корелация на серумната концентрация на hsCRP с постпрандиалната гликемия и HbA1c. При острофазовият протеин не се установи сигнификантност като самостоятелен предсказващ елемент за развитието на МС и ЗДТ2. Присъствието му с нива  $\geq 1,66\text{mg/l}$  във всички многофакторни предсказващи модели определя ролята му като допълнителен маркер, а не като критерии за развитието на МС и ЗДТ2.

Подобно на другите възпалителни маркери **СУЕ на 1 час** сред пациентите с МС ( група А и В) е повишена, сравнено със здравите лица от контролната група (група С), като различията са статистически значими само спрямо пациентите с МС и ЗДТ2 (група В). При изследваните с МС без ЗДТ2 (група А) резултатите показаха сигнификантни позитивни взаимовръзки между отчетената СУЕ и нивата на ендогенен инсулин (ИРИ), инсулиновата резистентност (НОМА-ИР) и панкреасната секреторна  $\beta$  клетъчна активност (НОМА В). За разлика от тях при пациентите със ЗДТ2 (група В) се отчетоха статистически значими корелации между промените в СУЕ и липидния профил.

Получените резултати не показаха отклонения в **общият левкоцитен брой** сред лицата с МС без ЗДТ2( група А) и с МС и ЗДТ2( група В). В различен брой лица от трите групи се установяват отклонения над горния референтен обхват, като най-високо процентен дял се наблюдава при лицата с МС без ЗДТ2 (група А). Установи се негативна, статистически

значима корелация между общият левкоцитен брой с нивата на гликемията на гладно и позитивна с ендогенния инсулин на гладно, изчислената инсулинов секреция(НОМА В) и плазмените нива на LDL-холестерола в групата с МС без ЗДТ2( група А).

### **Обсъждане и дискусия:**

Получените от нас данни доказват съществуването на нискостепенно хронично възпаление при МС, което протича с повишена плазмени концентрация на интерлевкини и hsCRP.

Класически неспецифични лабораторни маркери за активен възпалителен процес са левкоцитозата и ускорена СУЕ. В условия на нискостепенно хронично възпаление, каквото съществува при МС, общия левкоцитен брой е в референтни граници.

Измерването на общият левкоцитен брой и промените в левкоцитните популации се определят от много автори като полезен независим маркер за  $\beta$  клетъчна дисфункция и инсулинова резистентност. По данни на Twig и съавтори при нива над  $6,91 \times 10^9/\text{л}$  нарастването на общите левкоцити с  $1,0 \times 10^9/\text{л}$  повишава с 7,6% риска за развитието на ЗД. В нашето изследване общия левкоцитен брой сред пациентите с МС без ЗДТ2 (гр.А) е  $8,14 \pm 1,87 \times 10^9/\text{л}$ , като най-голям дял в тази група са лицата със стойности на общия левкоцитен брой над референтния обхват. В нашето изследване се установиха нива на левкоцитите в периферна кръв  $\geq 7,89 \times 10^9/\text{л}$ , разграничаващи лицата с МС от здравите. Не се установиха сигнификантни прагови стойности на общия левкоцитен брой в периферна кръв за отграничаване на пациентите със ЗДТ2. Този резултат би могъл да подкрепя хипотезата, че нискостепенното хронично възпаление възниква още с развитието на висцералното затлъстяване и ИР при МС. За използването на този неспецифичен възпалителен показател като прогностичен маркер за развитие на ЗДТ2 сред българска популация е необходимо провеждането на последващи проучвания, които да обхвалят много по-голяма брой лица за изучаване.

За промените в СУЕ на 1 час, като показател за диагностика на нискостепенното хронично възпаление не съществува много информация в научната литература. Установена е положителна корелация между ускорената СУЕ и броя изявени компоненти на МС сред пациенти с висцерално затлъстяване. В нашето проучване сред лицата МС без ЗДТ2 (гр.А) се установява положителна корелация на СУЕ с ендогенния инсулин на гладно (ИРИ) и индексите на инсулинова секреция и чувствителност. Най-ускорена СУЕ се отчита в групата със ЗДТ2, където е изявена и хипергликемията. Тези резултати подкрепят съвременните знания за участието на неспецифичното нискостепенно възпаление при висцерално затлъстяване в изявата и разпространението на ИР при МС.

Нашите резултати показват повишени нива на IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$  сред пациенти с МС и ЗДТ2. В проведеното от нас проучване се доказаха позитивни корелации между нивата на IL-1 с инсулиновите нива и инсулиновите индекси, на IL-6 с нивата на глкемията и на TNF- $\alpha$  с обиколката на талията, които свидетелстват за ролята на интерлевкините в патогенезата на МС и влиянието им в активиране на последващи имунологични процеси в хода на МС и развитието на ЗДТ2. Тези данни съвпадат с резултатите от някои други изследвания и са в противовес със съобщените резултати от други проучвания. Изолирано IL-1 не се доказва като сигнификантен фактор, който може да има предсказваща роля в риска за развитие на ЗДТ2, което се определя вероятно от недостатъчния брой пациенти включени в изследването. От друга страна определената сигнификантна прагова стойност за нивата на IL-6 повишава риска за развитие на ЗДТ2 с около 7 пъти спрямо по-ниските нива. В

съчетание обаче с другите променливи като възраст, ИТМ, обиколка на талията, артериално налягане и липиден профил включени в изучаване на риска за развитие на ЗДТ2 те придобиват диагностична стойност, като диагностичната стойност за IL-1 е по-голяма спрямо тази на IL-6.

Връзката между повишената експресия на TNF- $\alpha$ , висцералното затлъстяване и развитието на ИР е широко изучавана от 1993 година насам. Известна е модулиращата му роля относно вътреклетъчния инсулинов сигнал в хепатоцитите и миоцитите, супресивния ефект върху PPAR- $\gamma$  активността и GLUT-4 синтезата, стимулиране на сериновата фосфорилацията на инсулин-рецепторен субстрат 1 (IRS-1). Повишената секреция на TNF- $\alpha$  води до намалена инсулинова чувствителност и повишава липолизата в адипоцитите. Установените в нашето изследване повишени нива на TNF- $\alpha$  и положителната корелация с ИТМ и обиколката на талията при лицата с МС без ЗДТ2 са с потвърдителен характер спрямо съществуващата до момента в литературата информация.

Съотношението Тг/ХДЛ е изчислено и анализирано от нас като сурогатен маркер за оценка на чернодробната ИР и атерогенния риск. Включените в контролната група здрави лица са с нормално телесно тегло, без данни за ИР и смесена дислипидемия, поради което съотношението на Тг/ХДЛ се прие само за атерогенен маркер при налични анамнестични данни за фамилна обремененост относно сърдечно-съдови заболявания. При всички пациенти с МС се установи ИР, по-високи нива на серумни триглицериди и по-ниски на ХДЛ холестерол спрямо контролната група. Поради това, че съществуващите клинично-лабораторни отклонения описващи МС са известни сърдечно-съдови рискови фактори, съотношението Тг/ХДЛ холестерол се прие за сурогатен маркер описващ ИР. Пациентите с МС (от двете групи) показаха статистически по-високи стойности на изследвания атерогенен индекс Тг/ХДЛ-холестерол спрямо контролната група лица. При изследваните от нас пациенти с МС със ЗДТ2 (група В) съотношението Тг/ХДЛ-хол. е над 2.0, статистически незначимо е по-високо от това за лицата с МС без ЗДТ2 (група А) и кореспондира със завишените плазмени нива на общ холестерол, ЛДЛ-холестерол, триглицериди. Тези резултати са в подкрепа на еволюцията на ЗДТ2 с прогресия на инсулиновата резистентност, дисфункция в инсулиновата секреция в хода на развитие на хипергликемията. За индекса Тг/ХДЛ холестерол стойност над 1.8 се приема за индикатор на ИР. Получените от нас резултати съвпадат с тези посочени в проучването на McLaughlin и сътр.

Секрецията на hsCRP е част от неспецифичния физиологичен острофазов отговор към възпалителни, инфекциозни и тъканно увреждащи процеси и се смята, че сам по себе си не може да бъде диагностичен критерий. Като неспецифичен маркер на възпалението, той се влияе от множество фактори като наличие на затлъстяване или артериална хипертония, тютюнопушене, прием на естрогени или наличието на менопауза при жените. При изследваните от нас пациенти с МС (група А и В) се наблюдават завишени нива на hsCRP над 5 mg/l, което определя и висок риск за сърдечно-съдови инциденти. Не се установяват статистически значими различия в измерените плазмени концентрации на изследвания острофазов протеин между лицата с МС без ЗДТ2 (група А) и тези с МС и ЗДТ2 (група В). Всички лица с МС, включени в нашето изследване са с висцерално затлъстяване и се установи очаквано позитивна статистически значима корелация между ИТМ и обиколката на талията с установените нива на hsCRP, което би обяснило липсата на различия в получените резултати относно възпалителния протеин, независимо от гликемията, като свързващото звено е наличието на нискостепенно хронично възпаление в мастната тъкан. Вероятно поради факта, че нивата на hsCRP се повлияват от множество

фактори при МС, в проведеното от нас изследване не се установиха сигнификантни прагови стойности на острофазовия протеин отграничаващи пациентите с МС и ЗДТ2 от здравите лица.

При здравите лица в контролната група в нашето проучване също се установиха нива на hsCRP над 3mg/l, което дефинира висок сърдечно-съдов риск сред тях. Получените резултати са за сметка на повишените нива на hsCRP сред жените в тази група. В кохортното мултиетническо проучване за изучаване на атеросклерозата (MESA), обхващащо 6814 лица без известни сърдечно-съдови заболявания се установява също до над 40% по-високи нива на hsCRP сред жените във всички етноси, независимо от ИТМ. Получените резултати за hsCRP при жените от контролната група сочат повишен сърдечно-съдов риск, но е необходимо тези резултати да бъдат интерпретирани комплексно. При контролната група не се установяват други налични известни клиничко-метаболитни рискови маркери, не са изключени от анализа лицата с нива на hsCRP над 10mg/l, както и жените приемащи естроген-съдържащи орални контрацептиви. Вероятно и генетичния полиморфизъм в CRP генът, който определя различията в продукцията както на CRP, така и на IL-1 и IL-6 би могъл да обясни така получените от нас резултати.

#### **IV.2 ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛИМФОЦИТНИ СУБПОПУЛАЦИИ В ПЕРИФЕРНА КРЪВ НА ПАЦИЕНТИ С МС БЕЗ ЗД (група А), ПАЦИЕНТИ С МС И ЗДТ2 (група В), КОНТРОЛНА ГРУПА ЗДРАВИ ЛИЦА (група С) и ПАЦИЕНТИ СЪС ЗДТ1 (група D)**

**IV.2.1. Резултати от сравнителен количествен и качествен анализ на общият и диференциран левкоцитен профил и лимфоцитните кръвни субпопулации между различните групи лица (пациенти с МС без захарен диабет, пациенти с МС и ЗДТ2 и пациенти със ЗДТ1).**

**Изследване на общ и диференциален левкоцитен брой сред изследваните лица с МС без ЗДТ2 (група А), с МС и ЗДТ2 (група В), със ЗДТ1 (група D) и контроли (група С).**

Табл. 15 Общ и диференциален левкоцитен брой на изследваните пациенти с МС без ЗДТ2 (гр. А), МС и ЗДТ2 (гр. В), ЗДТ1(гр. D) и контроли (гр. С).

Показател (референтни стойности)	МС без ЗДТ2 <b>Група А</b> (n=26)	МС и ЗДТ 2 <b>Група В</b> (n=70)	Контроли <b>Група С</b> (n=21)	ЗДТ1 <b>Група D</b> (n=22)	Сигнификантност (p<0.05)
<b>Общ левкоцитен брой</b> (3,5-10.0 x10 <sup>9</sup> /l)	6,78±1,8	7,28±1,85	6,89±1,07	6,91±1,32	P <sup>AB</sup> NS; p <sup>AC</sup> NS p <sup>BC</sup> NS; P <sup>AD</sup> NS P <sup>BD</sup> NS; P <sup>CD</sup> NS

<b>Лимфоцити</b> (1,2-3,2 x10 <sup>9</sup> /l)	2,55±0,79	2,34±0,647	2,04±0,64	2,35±0,69	P <sup>AB</sup> NS <b>P<sup>AC</sup>&lt;0,05</b> P <sup>BC</sup> NS; p <sup>AD</sup> NS p <sup>BD</sup> NS; p <sup>CD</sup> NS
<b>Моноцити</b> (0,3-0,8 x10 <sup>9</sup> /l)	0,37±0,11	0,45±0,15	0,28±0,09	0,45±0,12	<b>P<sup>AB</sup>&lt;0,05;</b> <b>P<sup>AC</sup>&lt;0,05</b> <b>p<sup>BC</sup>&lt;0,05;</b> <b>p<sup>AD</sup>&lt;0,05</b> p <sup>BD</sup> NS; p <sup>CD</sup> <0,05;
<b>Гранулоцити</b> (1,2-6,8 x10 <sup>9</sup> /l)	3,84±1,23	4,5±1,4	4,41±1,5	4,13±0,98	<b>P<sup>AB</sup> &lt;0,05</b> p <sup>AC</sup> NS; p <sup>BC</sup> NS p <sup>AD</sup> NS p <sup>BD</sup> NS; p <sup>CD</sup> NS

*P<sup>AB</sup>-MC срещу ЗДТ2; p<sup>AC</sup>- MC срещу контроли; p<sup>BC</sup> -ЗДТ2 срещу контрол; p<sup>AD</sup>-MC срещу ЗДТ1; p<sup>BD</sup>- ЗДТ2 срещу ЗДТ1; p<sup>DC</sup>- ЗДТ1 срещу контроли.*

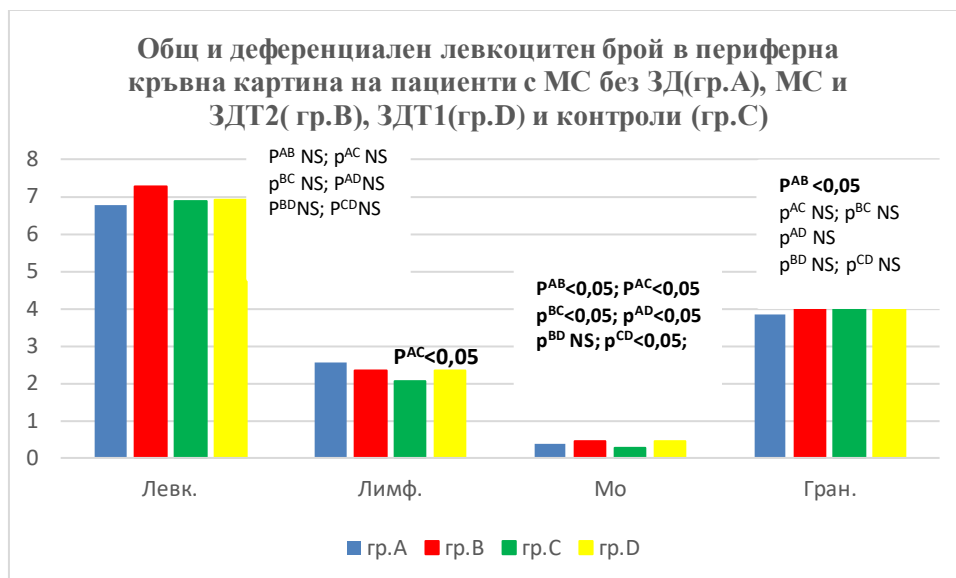
При всички изследвани пациенти не се откриват отклонения в абсолютния левкоцитен, лимфоцитен и гранулоцитен брой извън референтния обхват.

Сравнено с участниците от другите групи, здравите контроли са с най- нисък лимфоцитен брой, като статистически значими са тези различия спрямо пациентите с MC без ЗДТ2 (група А). Наблюдава се и по- нисък абсолютен моноцитен брой (0,28±0,09x10<sup>9</sup>/l) както спрямо долната референтна граница (0,3-0,8x10<sup>9</sup>/l), така и спрямо всички изследвани групи (А, В и D).

Пациентите с MC без ЗДТ2 ( група А), сравнено с изследваните с MC и ЗДТ2 (група В) показват по- нисък моноцитен брой (0,37±0,11ср. 0,45±0,15; p<0,05). Сравнението на гранулоцитния брой между двете групи на MC с и без Т2ЗД доказва сигнификантно по-ниско гранулоцитно ниво в гр.А (3,84±1,23ср. 4,5±1,4; p<0,05).

Получените резултати на общ левкоцитен ( 6,91±1,32 x10<sup>9</sup>/л ), абсолютен лимфоцитен (2,35±0,69 x10<sup>9</sup>/л), моноцитен (0,45±0,12 x10<sup>9</sup>/л) и гранулоцитен брой(4,13±0,98 x10<sup>9</sup>/л) при изследваните лица със ЗДТ1(група D) не се различаваха сигнификантно от същите получени при пациентите с MC и ЗДТ2 (група В).

Сравнението на средните стойности на лимфоцитите доказва, че нивата на лимфоцитите са по-високи при пациентите с MC и ЗД (гр. А, В и гр.D) сравнено с контролната група (гр. С). Установява се, че само при пациентите с MC без ЗДТ2( гр.А) тези различия са статистически достоверни (2,55±0,79 ср. 2,04±0,64;p<0.05) (фиг.17).



Фиг. 17 Общ и диференциален левкоцитен брой в периферна кръвна картина на пациенти с МС без ЗДТ2 (гр.А), ЗДТ2 (гр.В), ЗДТ1 (гр.Д) и контроли (гр.С)

Стойностите на общия левкоцитен брой в 95-ти персентил за МС без ЗДТ2 (гр. А) бяха  $10,7 \times 10^9/\text{л}$ ; за МС със ЗДТ2 (гр. В)-  $10,9 \times 10^9/\text{л}$ , за ЗДТ1 (гр.Д)  $8,6 \times 10^9/\text{л}$  и  $8,3 \times 10^9/\text{л}$ . за контролна група лица (гр. С).

При изследване на общия и диференциален левкоцитен брой по възрастови групи не се установи добре изразена тенденция на промяна в тези параметри с промяна на възрастта. Не се отчетоха и статистически значими корелации между възрастта и изследваните кръвни елементи за участниците в проучването от всички групи.

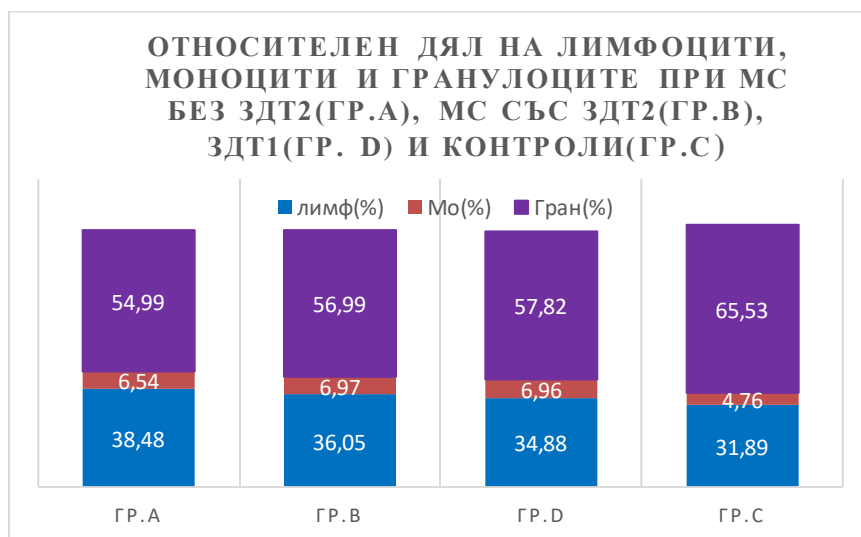
В табличен и графичен вид е представено разпределението като относителен дял на левкоцитните подтипове, измерено в проценти (табл. 16, фиг. 18).

Табл. 16 Относителен дял на лимфоцити, моноцити и гранулоцити от общия левкоцитен пул при изследваните групи пациенти.

Реф.с-ти	МС Група А (n=26)	ЗДТ2 Група В (n=70)	ЗДТ1 Група Д (n=22)	Контроли Група С (n=21)	Сигнификантност $p < 0,05$
Лимфоцит (17-48%)	$38,48 \pm 7,14$	$36,05 \pm 7,67$	$34,88 \pm 7,5$	$31,89 \pm 7,5$	$p^{AC} < 0,05$ <b>(0,008);</b> $p^{BC}=0,51; p^{DC}=0,31$ $p^{AB} < 0,05$ <b>(0,005)</b> $p^{AD}=0,08;$ $p^{BD}=0,54$

Моноцити (4-10%)	6,54±1,22	6,97±1,39	6,96±1,89	4,76±1,49	$p^{AC} < 0,05$ <b>(0,00007)</b>  $p^{BC} < 0,05$ <b>(0,000000)</b>  $p^{DC} < 0,05$ <b>(0,000000)</b>  $p^{AD}=0,08$  $p^{AB} < 0,05$ <b>(0,005)</b>  $p^{BD}=0,54$
Гранулоцити (43-76%)	54,99±7,64	56,99±7,82	57,82±7,64	63,53±7,74	$p^{AC} < 0,05$ <b>(0,00002)</b>  $p^{BC}=0,08$ ; $p^{DC}=0,08$  $p^{AB}=0,01$ ; $p^{AD}=0,14$  $p^{BD}=0,61$

$p^{AB}$ -МС срещу ЗДТ2;  $p^{AC}$ - МС срещу контроли;  $p^{BC}$  -ЗДТ2 срещу контрол;  $p^{AD}$ -МС срещу ЗДТ1;  $p^{BD}$ - ЗДТ2 срещу ЗДТ1;  $p^{DC}$ - ЗДТ1 срещу контроли.



Фиг.18 Относителен дял на лимфоцити, моноцити и гранулоцити от общия левкоцитен пул при изследваните групи пациенти.

**Проследяване на промените в лимфоцитните субпопулации общи Т лимфоцити (CD3+), Th (Т хелпери; CD4+), Ts (Т цитотоксични/ спресори; CD8+), В лимфоцити (CD19+), НК клетки (CD3-/CD16+56+) сред изследваните лица.**

В табличен и графичен вид са отразени резултатите на относителния дял на лимфоцитните субпопулации в проценти: общи Т лимфоцити (CD3+), Th (Т хелпери; CD4+), Ts (Т цитотоксични/ спресори; CD8+), В лимфоцити (CD19+), НК клетки (CD3-/CD16+56+) от проведения флуцитометричен анализ на лимфоцити (табл.17, фиг.19).

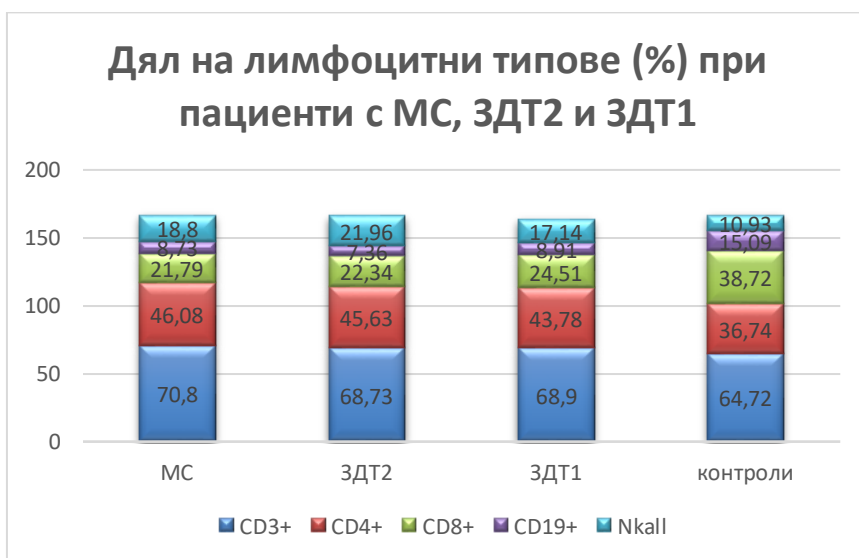
Табл.17 Дял на лимфоцитни субпопулации при пациенти с МС без ЗДТ2 (гр. А), МС със ЗДТ2 (гр. В), ЗДТ1(гр.Д) и контроли(гр. С).

Лимфоцити (Референтни стойности %)	МС <b>Група А</b> (n=26)	ЗДТ2 <b>Група В</b> (n=70)	ЗДТ1 <b>Група Д</b> (n=22)	Контроли <b>Група С</b> (n=21)	Сигнификантност (p<0.05)
Т-общи лимфоцити (CD3+) (67-76%)	70,8±3,68	68,73±1,86	68,98±5,15	64,72±0,62	p <sup>AC</sup> -NS; p <sup>BC</sup> NS p <sup>DC</sup> NS; p <sup>AD</sup> NS p <sup>BD</sup> NS; p <sup>AB</sup> NS
Th (CD4+) (36-46%)	46,08±3,63	45,63±2,75	43,78±4,10	36,74±0,23	<b>p<sup>AC</sup>&lt;0.05</b> <b>p<sup>BC</sup>&lt;0.05</b> <b>p<sup>DC</sup>&lt;0,05</b> p <sup>AD</sup> NS; p <sup>BD</sup> NS p <sup>AB</sup> NS;
Ts (CD8+) (31-40%)	21,79±2,69	22,34±2,1	24,51±3,99	38,72±0,77	<b>p<sup>AC</sup>&lt;0.05</b> <b>p<sup>BC</sup>&lt;0.05</b> <b>p<sup>DC</sup>&lt;0,05</b> p <sup>AD</sup> NS; p <sup>BD</sup> NS p <sup>AB</sup> NS;
В- лимфоцити. (CD19+)	8,73±1,82	7,36±0,97	8,91±2.37	15,09±0,38	<b>p<sup>AC</sup>&lt;0.05</b> <b>p<sup>BC</sup>&lt;0.05</b> <b>p<sup>DC</sup>&lt;0,05</b>



(11-16%)					$p^{AD}$ NS; $p^{BD}$ NS $p^{AB}$ NS
НК клетки (CD3- /CD16+56+) (9-15%)	18,88±6,78	21,96±8,85	17,14±6,98	10,93±0,69	$p^{AC}<0.05$ $p^{BC}<0.05$ $p^{DC}<0,05$ $p^{AD}$ NS; $p^{BD}$ NS $p^{AB}$ NS

$p^{AB}$  -МС ср. със ЗДТ2;  $p^{AC}$  – МС ср. с контроли;  $p^{BC}$  – ЗДТ2 ср. с контроли;  $p^{DC}$  - ЗДТ1 ср. с контроли;  $p^{AD}$ - МС ср. със ЗДТ1;  $p^{BD}$ - ЗДТ2 ср. със ЗДТ1



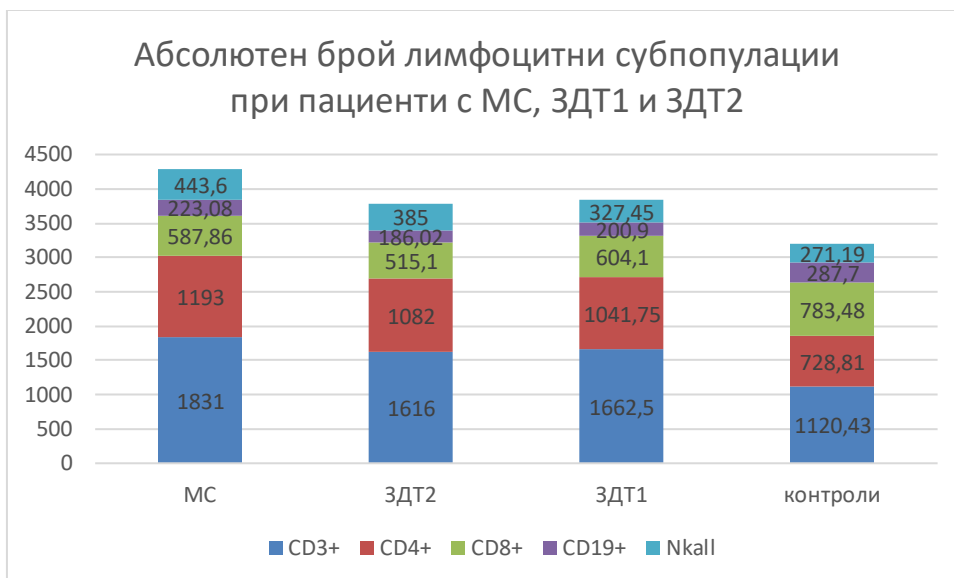
Фиг.19 Дял на лимфоцитни субпопулации при пациенти с МС без ЗДТ2 (гр. А), МС със ЗДТ2 (гр. В), ЗДТ1(гр.Д) и контроли (гр. С)

В табличен и графичен вид са отразени резултатите и на абсолютния брой лимфоцитните субпопулации: CD3+(общи Т лимфоцити), CD4+ (Тхелпери; Th), CD8+ (Т цитотоксични/ супресори; Ts), CD19+ (В лимфоцити), CD3-/CD16+56+ (НК клетки) от проведения флуоцитометричен анализ (Табл.18, фиг.20).

Табл.18 Абсолютен брой на лимфоцитни субтипове при пациенти с МС без ЗДТ2 (гр.А), с МС и ЗДТ2 (гр.В), контроли( гр.С) и ЗДТ1( гр.Д).

Лимф. Абс.брой	МС без ЗД	МС и ЗДТ2	ЗДТ1	Контроли	Сигнификантност
----------------	-----------	-----------	------	----------	-----------------

(брой клетки/ $\mu\text{l}$ )	Група А (n=26)	Група В (n=70)	Група D (n=22)	Група С (n=21)	(p<0.05)
Т-общи лимфоцити (CD3+) (1100-1700/ $\mu\text{l}$ )	1831 $\pm 290.18$	1616.59 $\pm 124.8$	1662.55 $\pm 302.76$	1120.43 $\pm 17.54$	$p^{AC} < 0,05$ $p^{BC} < 0,05$ $p^{DC} < 0,05$
Th (CD4+) (700-1100/ $\mu\text{l}$ )	1193 $\pm 178.82$	1082.44 $\pm 107.14$	1041.75 $\pm 185.69$	728.81 $\pm 17.54$	$p^{AC} < 0,05$ $p^{BC} < 0,05$ $p^{DC} < 0,05$
Ts (CD8+) (500-900/ $\mu\text{l}$ )	578.68 $\pm 137.53$	515.10 $\pm 67.25$	604.15 $\pm 153.47$	783.48 $\pm 36.92$	$P^{AC} < 0,05$ $P^{BC} < 0,05$ $p^{DC} < 0,05$
Th/Ts	2.33 $\pm 0.37$	2.36 $\pm 0.37$	2.02 $\pm 0.44$	1.02 $\pm 0.06$	$p^{AC} < 0,05$ $P^{BC} < 0,05$ $p^{DC} < 0,05$
В -лимфоцити (CD19+) (200-400/ $\mu\text{l}$ )	223.08 $\pm 57.79$	186.02 $\pm 26.07$	200.9 $\pm 56.32$	287.67 $\pm 23.53$	$p^{AC} < 0,05$ $P^{BC} < 0,05$ $p^{DC} < 0,05$
НК клетки (CD3- /CD16+56+ ) (200-400/ $\mu\text{l}$ )	443.6 $\pm 157.7$	385.0 $\pm 86.82$	327.42 $\pm 119.78$	271.19 $\pm 19.0$	$P^{AC} < 0,05$ $P^{BC} < 0,05$ $p^{DC} = \text{NS (0,19)}$



Фиг.20 Абсолютен брой на лимфоцитни субтипове при пациенти с МС без ЗДТ2 (гр.А), с МС и ЗДТ2 (гр.В) и ЗДТ1(гр.Д).

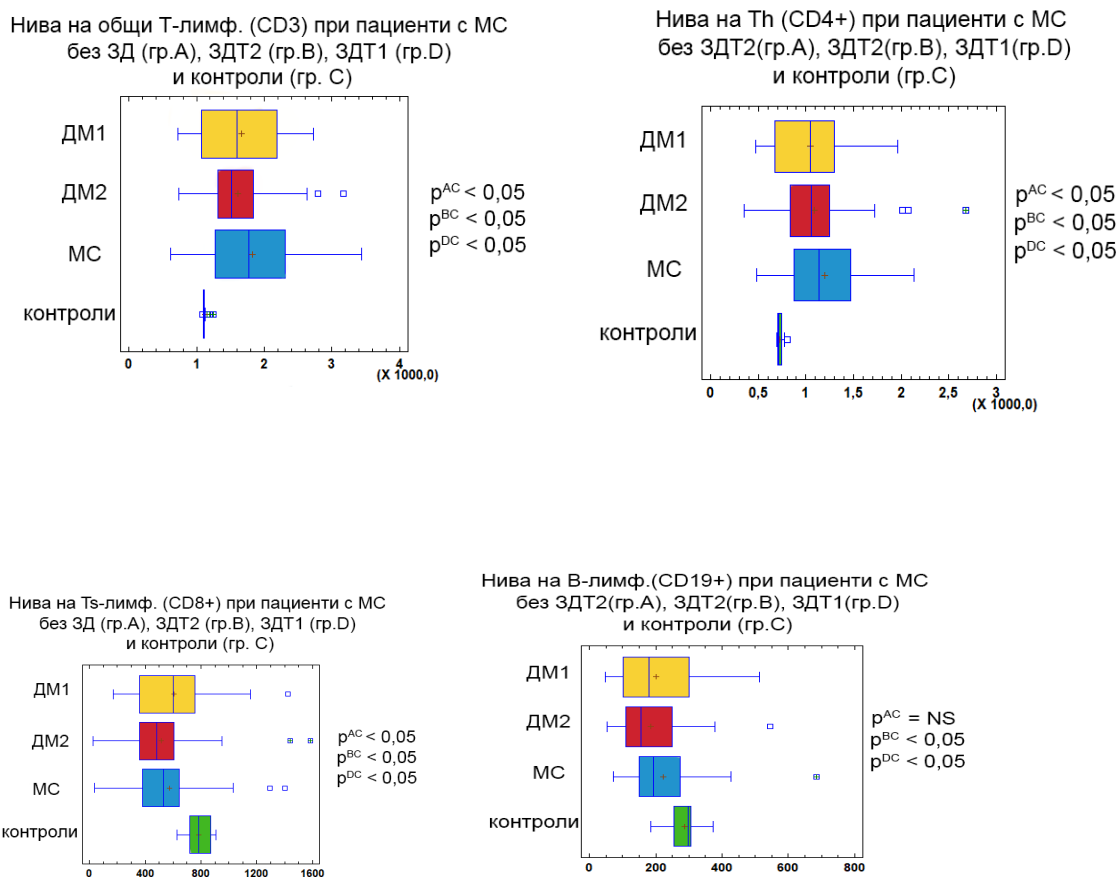
При здравите лица в контролната група (група С) не се установиха отклонения извън референтните граници в абсолютния брой на клетките от лимфоцитните популации. Изследваните с МС без ЗД (група А) и тези с МС и ЗДТ2 (група В) бяха със сигнификантно по- висок абсолютен брой на неспецифични Т лимфоцити (CD3+), Th(CD4+) и НК (клетки CD3-/CD16+56+) и статистически значимо по- нисък дял и абсолютен брой на Ts (CD8+) спрямо контролите (група С).

Отчете се по- нисък абсолютен В (CD19+) лимфоцитен брой в активните групи (групи А, В, С), като различията бяха статистически значими между лицата с МС без ЗДТ2 (група А) и здравите (група С).

При сравняване на получените резултатите между двете активни групи с МС (групи А и В) не се откриха сигнификантни различия в дела и абсолютната стойност на анализирания лимфоцитни субпопулации, въпреки че, пациентите с МС без ЗДТ2 имаха по- висок брой на общи Т-лимфоцити (CD3+), Th лимфоцити (CD4+), В- лимфоцити (CD19+) и НК клетки на  $\mu\text{l}$  периферна кръв.

Всички изследвани със ЗДТ1 (група D) също имат статистически достоверно по- висок дял и абсолютен брой на Th (CD4+) и по- нисък дял и абсолютен брой на Ts (CD8+) и В (CD19+) лимфоцити спрямо здравите лица (група С). При тях се установи и статистически незначим по- висок дял и брой НК клетки сравнено с контролната група.

При сравняване на резултатите на пациентите със ЗДТ2 и ЗДТ1 не се установиха сигнификантни различия в резултатите от проведения флоуцитометричен анализ на лимфоцитните субпопулации (Фиг.21).



Фиг.21 Сравнителен анализ (средна стойност и медиана) в нивата на лимфоцитни субпопулации при пациенти с МС без ЗДТ2 (гр.А), със ЗДТ2(гр.В), ЗДТ1(гр.Д) и контроли (гр.С).

Изчисленото съотношение Th/Ts при пациентите с МС ( $2,33 \pm 0,37$ ), ЗДТ2 ( $2,36 \pm 0,37$ ), при ЗДТ1 ( $2,02 \pm 0,44$ ) е по-високо спрямо приетото за референтно (от 1,0 до 1,5) и спрямо това на контролната група здрави лица ( $1,02 \pm 0,06$ ).

При анализиране на получените резултатите за абсолютен брой на лимфоцитните субпопулации по пол, не се регистрираха сигнификантни различия, които да сочат влияние на пола върху изследваните параметри.

### VI.2.2 Взаимовръзки между общия левкоцитен, моноците, гранулоцитен брой и лимфоцитните субпопулации, ИТМ и обиколка на талията.

С цел да бъде изследвана вероятна връзка между висцералното затлъстяване и промените в левкоцитните и лимфоцитни клетъчни типове се извърши корелационен анализ между ИТМ, обиколката на талията, левкоцитните типове и лимфоцитните субпопулации при пациентите с МС без ЗДТ2 (група А), с МС и ЗДТ2 (група В), със ЗДТ1 (група Д) и здравите контроли (табл.19 и табл.20).

Табл.19 Корелационен анализ между ИТМ, обиколката на талията и левкоцитните типове при пациентите с МС без ЗДТ2 (група А), с МС и ЗДТ2 (група В), със ЗДТ1 (група

D) и здравите контроли (група C)

	Общ. левкоцити	Лимфоцити	Моноцити	Гранулоцити
<b>ИТМ гр. А</b> (кг/м <sup>2</sup> )	r=-0,05	r=-0,19	r=-0,14	r=0,05
	p=0,81	P=0,36	P=0,51	P=0,82
<b>Талия гр. А</b> (см.)	r=-0,01	r=-0,27	r=-0,17	r=0,10
	p=0,95	p=0,18	p=0,44	p=0,64
<b>ИТМ гр. В</b> (кг/м <sup>2</sup> )	r=0,15	r=-0,1	r=0,19	r=0,18
	p=0,21	p=0,44	p=0,15	p=0,17
<b>Талия гр. В (см.)</b>	r=0,16	r=-0,04	r=0,19	r=0,16
	p=0,19	p=0,77	p=0,15	p=0,23
<b>ИТМ гр. D</b> (кг/м <sup>2</sup> )	r=0,31	r=0,24	r=0,11	r=0,08
	p=0,19	p=0,3	p=0,35	p=0,73
<b>Талия гр. D (см.)</b>	r=0,28	r=0,05	r=-0,03	r=-0,01
	p=0,25	p=0,83	p=0,91	p=0,68
<b>ИТМ гр. С</b> (кг/м <sup>2</sup> )	r=0,16	r=-0,16	r=-0,27	r=-0,34
	p=0,48	p=0,48	p=0,24	p=0,13
<b>Талия гр. С (см.)</b>	r=0,04	r=-0,17	r=-0,22	r=-0,1
	p=0,85	p=0,46	p=0,33	p=0,67

Табл.20 Корелационен анализ между ИТМ, обиколката на талията и лимфоцитните субпопулации при пациентите с МС без ЗДТ2 (група А), с МС и ЗДТ2 (група В), със ЗДТ1 (група D) и здравите контроли (група С)

	<b>Общи Тлимф. (CD3)</b>	<b>Th (CD4+)</b>	<b>Ts (CD8+)</b>	<b>В лимфоцити (CD19+)</b>	<b>НК клетки (CD3-/CD16 +56+)</b>
<b>ИТМ гр. А (кг/м<sup>2</sup>)</b>	r=-0,19; p=0,35	r=-0,21; p=0,56	r=-0,12 p=0,56	r=-0,19 p=0,36	r=0,2 p=0,58
<b>Талия гр. А (см.)</b>	r=-0,26 p=0,21	r=-0,21 p=0,31	r=-0,18 p=0,4	<b>r=-0,37</b> <b>p=0,05</b>	r=0,33 p=0,36
<b>ИТМ гр.В (кг/м<sup>2</sup>)</b>	r=-0,06 p=0,65	r=0,05 p=0,69	r=-0,15 p=0,24	r=-0,010 p=0,46	r=-0,17 p=0,4
<b>Талия гр.В (см.)</b>	r=-0,1 p=0,44	r=-0,05 p=0,72	r=-0,08 p=0,52	<b>r=-0,6</b> <b>p=0,05</b>	r=0,07 p=0,7
<b>ИТМ гр.Д (кг/м<sup>2</sup>)</b>	r=0,12 p=0,62	r=0,08 p=0,74	r=0,13 p=0,61	r=0,1 p=0,67	<b>r=0,78</b> <b>p=0,004</b>
<b>Талия гр.Д (см.)</b>	r=-0,07 p=0,79	r=0,01 p=0,95	r=-0,11 p=0,64	r=0,28 p=0,24	<b>r=0,44</b> <b>p=0,01</b>
<b>ИТМ гр. С (кг/м<sup>2</sup>)</b>	r=-0,13 0,58	r=0,31 0,17	r=0,42 0,05	r=-0,09 0,70	r=0,1 0,66
<b>Талия гр.С (см.)</b>	r=0,07 p=0,75	r=0,13 p=0,56	<b>r=0,56</b> <b>p=0,008</b>	r=0,25 p=0,27	r=-0,09 p=0,71

При здравите лица използвани като контролна група (група С) се установи линейна силна положителна корелационна зависимост между обиколката на талията и абсолютния брой на Ts (CD8+) лимфоцити (r=0,56; p= 0,008).

Статистически значима негативна корелация се установи между обиколката на талията и абсолютния брой на В-лимфоцитите (CD19+) както за изследваните с МС без ЗДТ2 (група А) ( $r=-0,37$ ;  $p=0,05$ ) така и за тези с МС и ЗДТ2 (група В) ( $r=-0,6$ ;  $p=0,05$ ).

Позитивна, силна линейна корелация се установи между абсолютния брой на НК клетките (CD3-/CD16+CD56+) и ИТМ ( $r=0,78$ ;  $p=0,004$ ) при участниците със ЗДТ1 (група D). Силна положителна корелационна връзка показаха и абсолютния брой на НК клетките (CD3-/CD16+CD56+) с обиколката на талията ( $r=0,44$ ;  $p=0,01$ ) в същата група изследвани.

### **VI.2.3 Взаимовръзки между общия и диференциален левкоцитен брой, лимфоцитните субпопулации и промените в гликемията, инсулиновата секреция и чувствителност.**

При пациентите с МС без ЗДТ2 (група А) не се установиха статистически значими корелации между общия левкоцитен брой, нивата на моноцити, гранулоцити и лимфоцитни субтипове в периферната кръв с нивата на кръвна захар на гладно, ендогенен инсулин на гладно, НОМА-ИР и НОМА В.

Резултатите от проведения корелационен анализ в групата на МС и ЗДТ2 (група В) не показаха също статистически значими корелационни зависимости между нивата на кръвна захар на гладно, ИРИ, НОМА ИР, НОМА В с общия и диференциален левкоцитен брой.

Слаба позитивна линейна зависимост се установи между общият левкоцитен брой и нивата на HbA1c сред тях ( $r=0,02$ ;  $p=0,04$ ). Също така силна, положителна статистически значима корелация се отчете между HbA1c и абсолютния брой на НК клетките в  $\mu\text{l}$  периферна кръв ( $r=0,46$ ;  $p=0,04$ ).

Резултатите от анализа за взаимовръзката между промените на левкоцитите и лимфоцитните субпопулации в периферната кръв с гликемията на гладно и нивата на HbA1c сред пациентите със ЗДТ1 (група D) не показаха статистически значима сигнификантност.

Подобно на изследваните пациенти с МС (група А и В) при контролите (група С) също не се установиха статистически значими корелационни зависимости между общия и диференциален левкоцитен брой с нивата на кръвна захар на гладно, ИРИ, НОМА- ИР и НОМАВ.

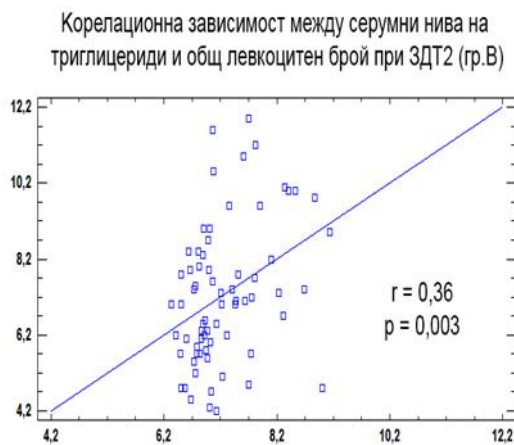
В контролната група (група С) се отчете умерена положителна, статистически значима корелационна зависимост между абсолютния брой на Ts (CD8+) и гликемията на гладно ( $r=0,41$ ;  $p=0,05$ ) и сигнификантна негативна между абсолютния брой на Ts (CD8+) с ендогенния инсулин на гладно ( $r=-0,47$ ;  $p=0,03$ ) и с индекса на  $\beta$ -клетъчна секреторна активност, отразена чрез НОМА В ( $r=-0,57$ ;  $p=0,006$ ). Статистически значима силна, положителна корелационна зависимост се установи и между гликемията на гладно и броя НК клетки в  $\mu\text{l}$  периферна кръв.

### **IV.2.4 Взаимовръзки между общия и диференциален левкоцитен брой, лимфоцитните субпопулации и плазмените нива на общ холестерол, ХДЛ-холестерол, LDL- холестерол и триглицериди.**

При пациентите с **МС без ЗДТ2 (група А)** не се установиха сигнификантни корелации между изследваните липидни параметри, общия и дефернциален левкоцитен брой.

Абсолютния брой на Тs (CD8+) лимфоцити показва сигнификантна линейна положителна корелационна зависимост с нивата на общ холестерол ( $r=0,4$ ;  $p=0,05$ ) и серумни триглицериди ( $r=0,36$ ;  $p=0,05$ ) и отрицателна корелация с нивата на LDL- холестерола ( $r=-0,47$ ;  $p=0,03$ ) при изследваните с МС без ЗДТ2 (група А).

Резултатите в групата на **МС и ЗДТ2 (група В)** показаха статистически значима, слаба обратна корелация между нивата на ХДЛ- холестерол и общ левкоцитен ( $r=-0,33$ ;  $p=0,004$ ), лимфоцитен ( $r=-0,3$ ;  $p=0,02$ ) и моноцитен ( $r=-0,3$ ;  $p=0,02$ ) брой в периферната кръв. Отново слаба, положителна, но статистически значима корелация се установи между серумните нива на триглицеридите с общите левкоцити ( $r=0,36$ ;  $p=0,003$ ) (фиг. 22), с лимфоцити ( $r=0,3$ ;  $p=0,02$ ), моноцити ( $r=0,27$ ;  $p=0,004$ ) и гранулоцити ( $r=0,28$ ;  $p=0,03$ ).



Фиг.22 Корелационен анализ между серумни нива на триглицериди и общ левкоцитен брой при пациенти с МС и ЗДТ2 (гр.В).

От корелационния анализ между липидните нива и лимфоцитните популации при ЗДТ2 (група В) се откри статистически значима линейна корелация между серумните нива на триглицеридите с абсолютния брой общи Т-лимф. (CD3+) ( $r=0,33$ ;  $p=0,001$ ) и Th (CD4+) лимфоцити ( $r=0,34$ ;  $p=0,009$ ) в периферната кръв.

При **пациентите със ЗДТ1** се установих статистически значими слаби негативни корелационни зависимости между нивата на ХДЛ холестерол и общ левкоцитен ( $r=-0,33$ ;  $p=0,004$ ), лимфоцитен ( $r=-0,3$ ;  $p=0,02$ ) и моноцитен ( $r=-0,3$ ;  $p=0,02$ ) брой.

Нивата на серумните триглицериди също показаха статистически значими позитивни корелационни зависимости с общ левкоцитен ( $r=0,36$ ;  $p=0,003$ ), моноцитен ( $r=0,3$ ;  $p=0,02$ ), лимфоцитен ( $r=0,3$ ;  $p=0,02$ ) и гранулоцитен ( $r=0,28$ ;  $p=0,03$ ) брой при тези пациенти.



Резултатите от корелационния анализ между липидния профил и абсолютния брой на лимфоцитните подтипове в  $\mu\text{L}$  периферна кръв демонстрираха умерена, негативна статистически значима взаимовръзка между нивата на ХДЛ- холестерол и броя на В-лимфоцитите ( $r=-0,44$ ;  $p=0,05$ ) както и силна сигнификантна такава между нивата на серумните триглицериди и броя на NK клетките ( $r=0,60$ ;  $p=0,04$ ).

При здравите лица от контролната група (група С) нивата на LDL- холестерола показваха сигнификантна корелация с абсолютния брой на лимфоцитите от автоматичния хематоанализер ( $r=0,47$ ;  $p=0,04$ ) и Th от флоуцитометричното изследване ( $r=-0,51$ ;  $p=0,02$ ).

В обобщена таблица (табл.21) са представени установените статистически значими (силни и умерени) корелационни зависимости между клинично- лабораторните параметри характеризиращи МС, левкоцитни типове и лимфоцитни класове в изследваните от нас пациенти.

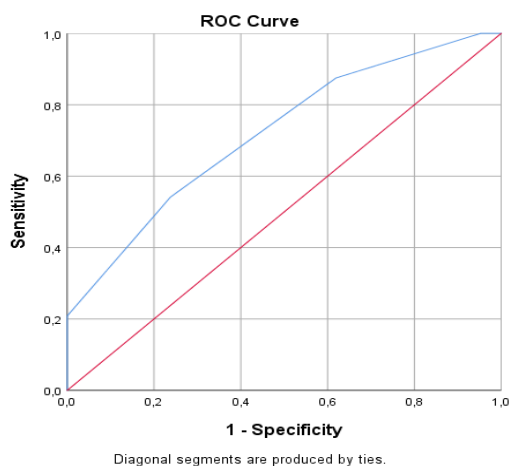
Табл. 21 Установени статистически значими корелационни зависимости в изследваните групи

	ИТМ	талия	Гл.на гладно	АХ	Общ хол.	HDL- хол.	LDL- хол.	Тригл.	ИРИ	НОМА ИР	Н В
МС без ЗДТ2		В лимф./-			Ts/+		Ts/-	Ts/+			
МС и ЗДТ2		В лимф./-				Левк./- Лимф./- Моно/-		Левк./+ Лимф./+ Моно./+ Гранулоцити/+ Th/+			
ЗДТ1	NK Кл./+	NK Кл./+				Левк./- Лимф./- Моно/- В-lym/-		Левк./+ Лимф./+ Моно/+ Гранулоцити/+ NK/+			
Контроли		Ts/+	Ts/+				Лимф./+		Ts/-		T

			<b>B/+</b>				<b>Th/-</b>			
			<b>NK/+</b>							

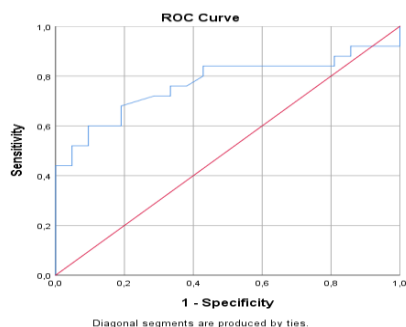
Проведе се логистичен регресионен анализ за да се оцени дали общия и диференциален левкоцитен брой и лимфоцитни класове в периферната кръв могат да имат предиктивна стойност относно риска за развитие на ЗДТ2. Приложен бе методът на ROC-кривите за установяване на прагови стойности. Сигнификантни прагови стойности се установиха за: Моноцити- $0,35 \times 10^9$ /л (54,2% чувствителност, 76,2% специфичност;  $p < 0,001$ ), общи Т лимф.( CD3+)-1257/ $\mu$ l (80% чувствителност, 100% специфичност;  $p < 0,001$ ), Th (CD4+)-811/ $\mu$ l (84% чувствителност, 100% специфичност;  $p < 0,001$ ), Ts(CD8+)-621,5/ $\mu$ l (72% чувствителност, 100% специфичност;  $p < 0,002$ ), В-лимф. (CD19+)-219,5/ $\mu$ l (60% чувствителност, 90,5% специфичност;  $p = 0,002$ ), NK клетки (CD3-/CD16 +56+)-310/ $\mu$ l (70% чувствителност, 85,7% специфичност;  $p = 0,010$ ).

Резултатите в нашето изследване показаха, че при лицата с нива на Мо  $\geq 0,35 \times 10^9$  /л в периферна кръв шанса за развитие на ЗДТ2 се увеличава **около 4 пъти** (OR-3,782, 95% CI 1,045-13,680;  $p = 0,043$ ) спрямо изследваните с по-нисък абсолютен моноцитен брой (AUC 0,710,  $p = 0,012$ ); (фиг.23).



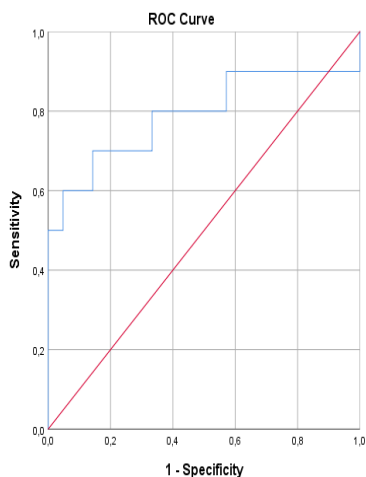
Фиг.23 ROC -крива на моноцити за определяне на праговите стойности при ограничаване на пациентите с и без МС и ЗДТ2.

При пациентите с установени нива на В (CD19+)-лимфоцити  $< 219,5$  клетки в  $\mu$ l кръв, шансовете за развитие на ЗДТ2 нарастват с над **14 пъти**, спрямо тези с по-високи нива на В-лимфоцитите (OR-14,25, 95% CI 2,703-75,116;  $p = 0,02$ ); (AUC 0,770,  $p = 0,002$ ) (фиг.24).



Фиг. 24 ROC -крива на В (CD19+)-лимфоцити за определяне на праговите стойности при отграничаване на пациентите с и без МС и ЗДТ2.

Също така резултатите от нашето изследване определиха, че лицата с нива на НК (CD3-/CD16 +56+) клетки  $\geq 310,5/\mu\text{l}$  в периферна кръв са също с **14 пъти** по- висок риск а развитие на ЗДТ2 ((OR-14, 95% CI 2,262-86,662;  $p=0,005$ ); (AUC 0,790,  $p=0,01$ ) (фиг.25).



Фиг.25 ROC -крива на НК (CD3-/CD16 +56+) клетки за определяне на праговите стойности при отграничаване на пациентите с и без МС и ЗДТ2.

Чрез ROC анализа се потърси диагностичната точност и диагностичната стойност на установените сигнификантни променливи: моноцити, общи Т- лимфоцити, Th, Ts, В-лимфоцити и НК – клетки.

#### IV.2.5 Обсъждане и дискусия:

Направените изследвания по отношение на общия левкоцитен брой не показаха отклонения извън възприетия горен референтен обхват сред изследваните от нас лица. При здрави възрастни общият левкоцитен брой зависи от множество различни фактори като пол, възраст, диета, тютюнопушене, инфекции, травма, стрес. Здравите лица имат по- ниски стойности на общ левкоцитен брой в сравнение с пациентите с МС без ЗДТ2 и с МС и ЗДТ2, но без статистически значими различия в отделните групи. Тези данни доказват наличието на системен хроничен възпалителен процес и активация на имунната система, който има отношение към патогенезата на МС и ЗДТ2. Както за МС, така и за ЗДТ2 е известно, че протичат със субклинично възпаление. Със статистически значимо

по- висок левкоцитен брой в периферната кръв са и пациентите със ЗДТ1 спрямо здравите лица, което свидетелства за наличието на хронично протичащ имунологичен процес и при ЗДТ1.

Всички пациенти с МС са с повишен лимфоцитен и моноцитен клетъчен брой спрямо здравите лица. Нискостепенното хронично възпаление и последващата активация на имунната система при МС се зараждат във висцералната мастна тъкан. Изследваните лица с МС без ЗДТ2 и тези с МС и ЗДТ2 са идентични по ИТМ и обиколка на талията, като маркери за висцерално затлъстяване, което е вероятна причина за получените идентични резултати при тях.

При всички участници в проучването с МС се отчита и статистически значимо по- висок абсолютен моноцитен брой спрямо здравите лица. Тези данни могат да намерят обяснение с факта, че при затлъстяване моноцитите са кръвните елементи, които повишават абсолютния си брой и мигрират в интерцелуларното пространство на мастната тъкан, където се трансформират в макрофаги. Заедно с макрофагите те са основните антиген представящи клетки и стимулират Th (CD4+) лимфоцити да продуцират инфламаторни цитокини. Установи се от нас сигнификантна прагова стойност на моноцитите в периферна кръв над  $\geq 0,35 \times 10^9$  /л с по-ниска чувствителност, но добра специфичност, при която шанса за развитие на ЗДТ2 с се увеличава **около 4 пъти**. При ЗДТ2 се наблюдава сигнификантно по- висок брой на моноцитите, без да има различия в броя на Th (CD4+) сравнено с МС без ЗДТ2. Едно от възможните обяснения на този факт е последващото ангажиране на моноцититните клетки в атеросклеротичния съдов процес, който акцелерира в хода на хроничната хипергликемия и ЗДТ2.

Независимо от различията във възрастта, ИТМ, обиколката на талията и продължителността на заболяването, пациентите със ЗДТ2 и ЗДТ1 са с идентични стойности на артериалното налягане, нивата на HbA1c, липиден профил, общ и диференциален левкоцитен брой. За ЗДТ1 е известно, че е органично специфично Т-клетъчно медирано автоимунно заболяване, протичащо абсолютен инсулинов дефицит и имуномедирана  $\beta$ - клетъчна апоптоза. Получените сходни резултати за ЗДТ2 поставя въпроса за възможното влияние на хипергликемията и дислипидемията върху промените в левкоцитния брой, лимфоцитните популации и имунната дисфункция при МС и ЗДТ2.

Както при здраве, така и при болестни процеси нивата на левкоцитите в периферна кръв се влияят от възрастта и множество други ендогенни и екзогенни фактори. Именно това многофакторно повлияване и малкия брой участници в отделните групи на нашето изследване може да се посочат като вероятна причина да не се установи възрастово обусловена тенденция в промените на общия и деференциран левкоцитен брой при всички изследвани от нас лица. Тенденция за възрастово породени различия има само за отделни лимфоцитни подтипове само при пациентите с МС без ЗДТ2.

Полови различия в нивата на общи левкоцити, лимфоцити, лимфоцитни субпопулации, моноцити и гранулоцити има само сред пациентите със ЗДТ1. При жените в тази група

се отчете по- висок брой на анализирани кръвни клетки. Средната възраст на включените в проучването пациенти със ЗДТ1(41,23±4,42 години) и предполагаемо физиологично по- високите естрогенови нива на изследваните в тази група жени биха могли да обуславят такъв резултат. Известно е, че X хромозомата експресира няколко гена, включени в имунологичните процеси (за Toll-like рецепторите, цитокинови рецептори, гени повлияващи Т и В клетъчната лимфоцитна активност) и естрогеновите нива повлияват имунната система посредством хормоналните рецептори върху имунните клетки.

В студия на Yang и колектив обхващаща 4579 възрастни над 60 години също е установен по- висок левкоцитен ( $5,74 \pm 1,35 \times 10^9$  /л), лимфоцитен ( $1,78 \pm 0,56 \times 10^9$ /л) и моноцитен ( $0,32 \pm 0,12 \times 10^9$ /л ) брой сред възрастните с МС сравнено с тези без МС. Установени са и полови различия, въпреки различната расова принадлежност на изследваните лица. Така представени промените в общия и диференциален левкоцитен брой са свидетелство за налични възпалително- имунни процеси при МС, но не могат да опишат причинно-следствената връзка с висцералното затлъстяване и метаболитните компоненти, характеризиращи МС.

Неспецифичните Т (CD3+) лимфоцити са основния цитологичен субстрат за клетъчно медиация специфичен имунитет. След антигенна стимулация те се диференцират в основните клетъчни модулатори на адаптивната имунна система: Th (CD4+ ) и Ts (CD8+) лимфоцити. В проведеното от нас проучване делът и абсолютния брой на неспецифични общи Т лимфоцити (CD3+) и Th (CD4+ ) е сигнификантно по-висок, а на Ts (CD8+) статистически достоверно по- нисък при лицата с МС ( МС без ЗДТ2 и МС и ЗДТ2) и ЗДТ1 спрямо делът и абсолютния брой на същите лимфоцитни популации при здрави лица.

Няма статистически достоверни различия в абсолютния брой на неспецифичните Т(CD3+) лимфоцити, Th (CD4+ ) и Ts (CD8+) лимфоцити между пациентите с МС без ЗДТ2 и МС и ЗДТ2. Не се откриха статистически различия между лимфоцитните субпопулации от флоуцитометричния анализ на пациентите със ЗДТ1 и ЗДТ2. Тези резултати демонстрират системен възпалителен процес и активиран клетъчен имунитет при МС, ЗДТ2 и ЗДТ1. Независимо от сходните промени в абсолютния брой на Т-лимфоцитите в периферната кръв, патогенетичните механизми довели до наблюдаваните резултати са различни при МС и ЗДТ1.

При физиологични условия развитието на имунния отговор е съпроводен с повишена експресия на инсулинови рецептори и глюкозни транспортери по клетъчната повърхност на активирани Т-лимфоцити за енергино обезпечаване на повишените им метаболитни нужди. Съществуващата ИР при затлъстяване и МС може да повлияят негативно Т-клетъчно медиация отговор при възпаление. Наблюдаваното нарастване на фракцията на Th (CD4+ ) е свидетел за активен имунен отговор, без да може да опише дали той е с проинфламаторен или антиинфламаторен компенсаторен феномен в контекста на

хроничното нискостепенно възпаление при висцерално затлъстяване. Известно е че Th (CD4+ ) са хетерогенна група от Th1 и Th17 с проинфламаторен ефект, Th2 и Treg лимфоцити с антиинфламаторен ефект. За Ts (CD8+) се счита, че оказват регулативна роля върху макрофагиалната активност и имат про-възпалителната роля в мастната тъкан при висцерално затлъстяване. Вероятно ниските абсолютни стойности на Ts (CD8+) лимфоцитни популации в периферната кръв при нашите пациенти с МС е отражение на повишената им миграция във висцералната мастна тъкан.

Получените от нас резултати са подобни на получените от O'Rourke и колектив при изследване на Т- лимфоцитни промени в периферна кръв на затлъстели. Вероятно настъпилите промени са и необратими. По литературни данни повишеното съотношение на Th/Ts, което се наблюдава и при нашите пациенти, се запазва при жени със затлъстяване и след редукция на теглото посредством бариатрична хирургия.

Нашите резултати също показват повишена Th активност и активиран автоимунен процес, отразена с повишеното съотношение на Th/Ts при изследваните лица с МС без ЗДТ2 и със ЗДТ2.

В (CD19+) лимфоцитите са основния клетъчен субстрат на придобитият хуморален имунитет. Наред с Т лимфоцитите те инфилтрират висцералната мастна тъкан при затлъстяване. Могат да модулират имунната система на много нива чрез антигенна презентация, секреция на цитокини и продукция на антитела. Описани са множество нарушения както при циркулиращите, така и при тъканно- фиксирани В лимфоцити при висцерално затлъстяване. При изследваните от нас индивиди с МС (МС без ЗДТ2 и МС и ЗДТ2) и със ЗДТ1 се установиха статистически значимо по- нисък брой В лимфоцити в периферната кръв, сравнено със здравите контроли. В групата с МС вероятно този резултат е следствие от дисбаланс между подтиповете В лимфоцитни популации с нарастване на броя на фиксирани имунокомпетентни клетки в мастната тъкан, ангажирани в имунния отговор при хроничното нискостепенно възпаление. В нашето изследване понижения абсолютен брой на В лимфоцитите в периферна кръв статистически значимо е и фактор за нарастване на риска за развитие на ЗДТ2 с над 14 пъти. При лицата с МС без ЗДТ2 и тези с МС и ЗДТ2 се установиха статистически достоверни негативни взаимовръзки с параметрите описващи висцералното затлъстяване ИТМ и обиколката на талията. Съществуват експериментални студии, които описват също инфилтриране на мастната тъкан с В лимфоцити, участието им в развитието на ИР, отключването на възпалителен отговор при богата на масти диета и ИР, както и секреция на патологични IgG, които спомагат за разпространение на ИР в периферните тъкани. Този получен от нас резултат е в унисон с проучването на De Furiaa и сътрудници. Те също докладват нисък дял и абсолютен брой на CD19+ експресиращи (В лимф.) лимфоцити и негативна корелация с ИТМ при пациенти с ИР и висцерално затлъстяване.

Парадоксално в нашето проучване не се установяват повишен брой В-лимфоцитни клетки в периферната кръв на пациентите със ЗДТ1. В научната литература имунохистохимично е описано преобладаване на инфилтрация с цитотоксични Т лимфоцити (CD8+), по-малко В лимфоцити и макрофаги на островните клетки при инсулит. Продукцията на специфичните за ЗДТ1 антитела също зависят от В лимфоцитната активност и са с определена клинично-диагностична характеристика, свързана с възрастта на изява на заболяването и се променят с времето. Включените от нас лица със ЗДТ1 са с голяма давност на заболяването, което вероятно променя характеристиката на протичащия имунологичен процес, повишава влиянието на локални метаболитни и цитокинови фактори. За разлика от изследванията на руски колектив в сходна по обем група пациенти със ЗДТ2 и ЗДТ1, в нашето проучване не са изследвани циркулиращите имуноглобулинови фракции и присъствието на специфични антитела в кръвта, което ограничава възможността за интерпретация на ниските В-лимфоцити при ЗДТ1.

Нашите резултати показват повишен брой и на NK клетки като елемент на вродения имунитет в периферна кръв при пациентите с МС (без ЗДТ2 и със ЗДТ2) сравнено със здравите контроли. Тези данни потвърждават известните в литературата сведения за участието им в развитието на ИР и ЗДТ2 чрез продукцията на множество цитокини.

Отговор на въпроса дали описаните промени в левкоцитните и лимфоцитни типове са причина или следствие за развитие на МС и ЗДТ2 се потърси чрез анализиране на взаимовръзката между тези промени и елементите на МС. През 2013 изследователи от Украйна също изучават влиянието на затлъстяването и ИТМ при МС и ЗДТ2 върху промените в лимфоцитния състав. Получените от нас резултати са твърде подобни на техните.

Установените в настоящето проучване негативни корелации между В-лимфоцитния брой и обиколката на талията само сред пациентите с МС (без ЗДТ2 и със ЗДТ2) са отражение на протичащото в мастната тъкан възпаление и на отделящите се от адипоцитите възпалителни цитокини. Включените в нашето изследване пациенти в двете групи са идентични спрямо ИТМ и обиколка на талията. Kanneganti и сътр. разкриват механизмите чрез които затлъстяването нарушава нормалната тъканна архитектура, антигенна презентация и левкоцитната диференциация, оказва влияние върху общия левкоцитен брой и лимфоцитни субтипове в периферната кръв.

Сред клинично здравите лица, използвани като контролна група се наблюдава положителна взаимовръзка между ИТМ и обиколката на талията с общия брой на Ts в периферната кръв. Вероятно при нарастване на ИТМ и обиколката на талията, в условия на нискостепенно възпаление, се осъществява миграция от периферната кръв към висцералната мастна тъкан и активация на различни типове имунокомпетентни клетки.

Анализът за възможна взаимнообусловенност на промените в общия и диференциален левкоцитен брой и лимфоцитните популации с промените в липидния профил при изследваните лица показва множество и най- силно изявени взаимовръзки.

За ЗДТ2 е характерно наличието на повишени нива на липиди и неестерифицирани мастни киселини в плазмата. Излишъкът от липидо- съдържащи нутриенти може да засегне функцията на имунокомпетентните клетки. Като доказателство на горното твърдение служат получените от нас положителни корелации между нивата на общ холестерол и серумни триглицериди с общ Ts брой сред пациентите с МС без ЗДТ2, както и негативна корелация с нивата на HDL холестерола. В групата на лицата с МС и ЗДТ2 се наблюдава положителна взаимовръзка между серумните триглицериди и общия левкоцитен брой, лимфоцитите и моноцитите в периферна кръв и негативна с нивата на HDL. Липсата на установени корелационни зависимости между левкоцитните нива и диференциалния лимфоцитен профил с гликемията, нивата на ендогенен инсулин и индексите на ИР и инсулинова секреторна активност при всички с МС вероятно подсказва ролята на липидните нарушения като водещи за промените в имунокомпетентните клетъчни типове в еволюцията и патогенетичните механизми, отговорни за развитието на ИР в условия на нискостепенно хронично възпаление и висцерално затлъстяване.

От друга страна получените сигнификантни прагови стойности на общи лимфоцити, Th и Ts, разграничаващи лицата със ЗДТ2 и здравите с много добра или добра диагностична тоност и невъзможността да се изчисли риска за развитие на ЗДТ2 поставя въпроса за провеждането на последващи изследвания в по- голям обем популация. Резултатите от тези изследвания биха описали по- детайлно промените, които настъпват в имунната система като патогенетичен елемент в развитието на ЗДТ2.

## **V. ОСНОВНИ ИЗВОДИ:**

V.1 Метаболитният синдром е състояние протичащо с нискостепенно хронично възпаление, при което има повишена секреция на плазмени цитокини (И-1, И-6, TNF- $\alpha$ ) и повишени нива на hsCRP.

V.2 Интерлевкините, като възпалителни цитокини, участват във хроничния възпалителен процес, характерен при МС, независимо от нивата на гликемията.

V.3 Налични са парциални полови и възрастови различия в плазмените концентрации на изследваните цитокини и маркери на нискостепенното хронично възпаление сред пациентите с висцерален обезитет.

V.4 Съществува положителни взаимовръзки между нивата на възпалителните цитокини в кръвта при МС, инсулиновите нива и ИР.



V. 5 Плазмените цитокини IL-1 и IL-6 имат диагностична стойност в изучаване на риска за развите на ЗДТ2.

V.6 При пациентите с МС е налична имунна дисфункция, за което свидетелстват увеличен абсолютен брой на общи Т-лимф. (CD3+), Th (CD4+) и NK клетки, намалени Ts (CD8+) и B (CD19+) лимфоцити в периферна кръв, повишено съотношение на Th/Ts.

V.6. Не се установяват различия в типа промени на лимфоцитните популации при пациенти със ЗДТ2 и ЗДТ1.

V.7. При пациентите с МС и ЗДТ2 основни фактори във формирането на имунна дисфункция и промяна в общия левкоцитен и лимфоцитен профил са ИТМ и обиколката на талията.

V.8. При пациентите с МС по- голямо значение за развитието на имунна дисфункция и промените в периферните лимфоцитни популации имат понижените нива на HDL холестерол и хипертриглицеридемията, а не хипергликемията.

## **VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:**

### **VI.1. ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР**

VI.1.1 За първи път в България е проведено изследване на лимфоцитни популации чрез флоуцитометричен анализ при пациенти с метаболитен синдром и нормогликемия, както и при пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2 за доказване на налична взаимовръзка между метаболитни нарушения и имунна дисфункция.

VI.1.2 За първи път в България се прави опит за определяне на прагова стойност на нивата на плазмените цитокини и лимфоцитни популации като предсказващи риска от развитие на Захарен диабет тип 2.

### **VI.2 ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР**

VI.2.1 Потвърди се наличието на нискостепенно хронично възпаление сред пациентите с метаболитен синдром независимо от наличието или липсата на захарен диабет тип 2.

VI.2.2 Потвърди се завишени нива на серумни цитокини и hsCRP, като маркери на нискостепенното хронично възпаление при пациенти с метаболитен синдром.

VI.2.3 Потвърди се комплексната ролята на ИТМ, обиколката на талията, инсулиновата резистентност завишените нива на IL-6 и възрастта катои рискови фактори за развитие на захарен диабет тип 2.

VI.2.4 Потвърди се наличието на имунна дисфункция, отразена чрез промяна в имунокомпетентните лимфоцити при метаболитен синдром.

### **VI.3 ПРИНОСИ С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР**

VI.3.1 Създаден е софтуерен продукт- калкулатор за индивидуална оценка вероятността за наличие на заболяване- ЗДТ2 по определени стойности на диастолично АН и нива на hsCRP и IL-6.

### **VII. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:**

#### **VII.1. Публикации в български списания:**

1. Г. Раянова, **С. Ганева**. Метаболитен синдром. Медицинска информация. 2013; XIII (9): 64-66.
2. Раянова, **С. Ганева**, К. Тодорова, Цв. Луканов, Св. Гечева. Нарушения във въглехидратната обмяна при пациенти с метаболитен контрол. Ендокринология. 2014; XIX(3):139-143.
3. **С. Ганева**, К. Тодорова, Луканов Цв. Имунна дисфункция и захарен диабет тип 2. Ендокринология. 2015; XX(1): 15- 17.
4. **Ganeva Silviya**, Todorova Katya, Lukanov Tsvetan, Rayanova Ginka, Blajeva Svetla e "Levels of lymphocytes subpopulations in peripheral blood among patients with diabetes" Acta Medica Bulgarica. 2021; XLVIII (1): 75-80.
5. **Silviya S. Ganeva**, Ginka H. Rayanova, Katya N. Todorova, Tzvetan H. Lukanov and Svetla O. Blazheva. The Role of triglyceride to HDL cholesterol ratio in sera as a clinical surrogate marker for cardiovascular risk and insulin resistance in patients with metabolic syndrome. J Biomed Clin Res. 2021; 12:162-168.

#### **VII.2. Публикации в международни списания:**

1. **Ganeva S.**, Todorova K., Lukanov Tsv., Rayanova G., Blajeva Sv., Tsvyatkovska Tsv. B-Lymphocytes level in Peripheral Blood among Patients with Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus Type 2 . SMU Medical Journal. 2017; 4(1), 13-25.
2. Rayanova Ginka, **Ganeva Silviya**, Todorova Katya, Lukanov Tsvetan, Blajeva Svetla. Levels of Adipokines – Adiponectin and Resistin in Patients with Metabolic Syndrome and Newly Diagnosed Diabetes Mellitus Type 2. SMU Medical Journal. 2017; 4(2): 140-152.

#### **VII.3. Участия в конгреси и научни конференции във връзка с дисертацията в България:**

1. **С. Ганева**, К. Тодорова, Г. Раянова, Цв. Луканов, Св. Гечева. Нива на серумни интерлевкини (II-1, II-6), TNF- $\alpha$  и hsCRP при пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2. X Национален конгрес по ендокринология, Сборник резюмета, Пловдив, 11-14 април 2013,103.
2. **С. Ганева**, К. Тодорова, Г. Раянова, Цв. Луканов, Св. Гечева. Нива на серумни интерлевкини (II-1, II-6) и TNF- $\alpha$  при пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет

тип 2. VIII Национален конгрес на Българската диабетна асоциация с международно участие. Слънчев бряг, 23-26 септември 2014.

**3.С. Ганева**, К. Тодорова, Г. Раянова, Цв. Луканов, Св. Блажева, Н. Сирачка. Нива на В-лимфоцити в периферна кръв на пациенти с метаболитен синдром. Юбилеен Национален конгрес по ендокринология, 8-11 октомври, 2015, 81.

4. **Ganeva SS**, Rayanova GH, Todorova KN, Lukanov, TH, Blajeva SO. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood in patients with type 2 diabetes mellitus. Journal of Biomedical & Clinical Research 2019;12(1):41.

5. Rayanova GH, **Ganeva SS**, Todorova KN, Velkova AS, Lukanov, TH, Blajeva SO. The role of adiponectin and adipocytokines – interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrotic factor- $\alpha$  in the pathogenesis of metabolic syndrome. Journal of Biomedical & Clinical Research 2019;12(1):35-36. Abstracts from Jubilee Scientific Conference “45 years Medical University-Pleven”, 31 Oct-2 Nov, 2019.

#### **VII.4. Участия в конгреси и научни конференции във връзка с дисертацията в чужбина:**

1. **Ganeva S.**, Todorova K., Rayanova G., Velkova A., Lukanov T., Blajeva S. Levels of adipokines- adiponectin and leptin and adipocytokines- interleukin- 1, Interleukin- 6, Tumor necrosis factor-  $\alpha$  and C- reactive protein in patients with metabolic syndrome. 13<sup>th</sup> Congress of the central European diabetes association/33th international Dunabe symposium, 2019.

2 **Ganeva S.**, Todorova K., Lukanov T., Rayanova G., Blajeva S. Levels of lymphocytes subpopulations in peripheral blood among patients with diabetes mellitus type 2. 22<sup>nd</sup> European Congress of Endocrinology, 5-9 sept 2020.

#### **VIII. НАУЧНИ ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:**

1. Изследователски проект №8, 2012 година, МУ- Плевен: Изследване на маркери на възпалението при пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2.
2. Изследователски проект № 9, 2014 година, МУ Плевен: Изследване на лимфоцитни субпопулации при пациенти с метаболитен синдром и/или захарен диабет тип 2.

