

До
Председател на Научно Жури,
определено със Заповед №2028/26.07.2022
на Ректор на МУ-Плевен
Проф. Д. Димитров, дм

Рецензия

от проф. д-р Мария Миткова Орбецова,
Научна специалност "Ендокринология и болести на обмяната"
Началник Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“,
Ръководител Катедра по Ендокринология, МФ, МУ - Пловдив

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен "Доктор"
на д-р **Силвия Симеонова Ганева-Тодорова**,
Медицински Факултет, Медицински Университет – Плевен

Тема: "Промени в плазмените нива на цитокините и лимфоцитните субпопулации при
пациенти с метаболитен синдром"
Докторска програма „Ендокринология“

Научен ръководител доц. д-р Катя Тодорова, дм
Научен консултант доц. д-р Цветан Луканов, дм

I. Процедурни изисквания

Избрана съм за външен член на Научно Жури със Заповед №2028/26.07.2022 на Ректор на МУ-Плевен. Рецензията е изготвена в съответствие с изискванията на Правилник за устройството и дейността на МУ-Плевен. Докторант на самостоятелна подготовка д-р **Силвия Симеонова Ганева-Тодорова** по докторска програма „Ендокринология“ в професионално направление 7.1. Медицина, от област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, към Катедра по Кардиология, пулмология, ендокринология и ревматология на МФ при МУ-Плевен, представя всички необходими за рецензиране материали в съответствие с Регламент за придобиване на ОНС „доктор“, както следва:

- Дисертационен труд;
- Автореферат;
- Автобиография с подпис на докторанта;
- Копие от диплома за висше образование;
- Копия от дипломи за придобити специалности;
- Списък на научните публикации по темата на дисертацията;
- Справка от НАЦИД;
- Други документи, свързани с хода на процедурата.

II. Биографични данни на докторанта

Д-р Силвия Ганева-Тодорова е възпитаник на ПМГ "Васил Друев", гр. Велико Търново. Завършва висше образование "медицина" в МУ-Плевен през 1998 г.. Придобива специалност по Вътрешни болести през 2005 г., и по Ендокринология и болести на обмяната през 2012 г.

От 2017 г. има Диплом по магистърска степен "Обществено здраве и здравен мениджмънт".

От 1998 г. до 1999 г. работи във Вътрешно отделение на ОБ, гр. Никопол. От 1999 г. работи в УМБАЛ "Георги Странски" – до 2003 г. в Отделение по Токсикология, впоследствие и до момента в Клиника по Ендокринология. От 2010 г. е асистент по Ендокринология.

III. Актуалност на темата

Метаболитният синдром поради нарастващата си честота, дължаща се на пандемията от затлъстяване и нездравословния начин на живот в съвременното общество, се превръща в основен рисков фактор за заболяемост и смъртност. Оттам и огромното му социално-икономическо значение. Маснатата тъкан понастоящем се приема за активно секретиращ орган с важно влияние върху възпалителните и имунни процеси, кръвосъсирването, регулацията на съдовия тонус, липидния и глюкозен метаболизъм и инсулиновата чувствителност. Плазмените нива на медиатори и продукти на възпалението (CRP и цитокини-IL-6, TNF- α) може да се използват клинично както като прогностични маркери за развитие на захарен диабет тип 2 сред пациентите с висцерално затлъстяване, така и като независими рискови фактори за развитие на сърдечно-съдови заболявания при метаболитен синдром и захарен диабет тип 2. Докато установяването на макрофагиална инфилтрация в маснатата тъкан доказва участието на вродения имунитет в развитието на нискостепенното хронично локално и генерализирано възпаление при затлъстяване, наличието на активирани Т-лимфоцити в маснатата тъкан доказва участието на придобития имунитет в процесите на възпалението при висцерално затлъстяване и инсулинова резистентност.

В литературата съществуват твърде малък брой проучвания, отразяващи връзката между промените в левкоцитните популации и лимфоцитни субтипове (като маркери за патологичен клетъчен имунитет) и метаболитния синдром и те са с разнопосочни резултати.

През последните години натрупаните научни данни за взаимовръзката между метаболизма и имунитета обособиха ново понятие „имуно-метаболизъм“. Обект на интерес в този аспект е изучаването на метаболитните промени, настъпващи след активация на клетките от имунния отговор. Назряла е необходимостта от изучаване на патогенетичните механизми, по които имунните клетки и метаболитните пътища се повлияват взаимно при затлъстяване и захарен диабет тип 2. В този смисъл дисертационният труд, който е посветен на изучаване промените в плазмените нива на цитокините и лимфоцитните популации при метаболитен синдром с и без изявен захарен диабет тип 2 е съвременен и актуален.

IV. Структура на дисертационния труд; цел и задачи; материал и методи; резултати и изводи

Дисертационният труд обхваща 184 стандартни машинописни страници и е правилно структуриран по отношение на изискуемите компоненти. Отделните глави и подглави са отразени прецизно в съдържанието, което внася яснота и прегледност на материала.

Направен е целенасочен *литературен обзор* (30 стр.) по разглеждания проблем като са застъпени общите положения по отношение на метаболитен синдром, захарен диабет и нискостепенно хронично възпаление, ролята на висцералното затлъстяване и бялата масна тъкан за инициране и поддържане на хроничното нискостепенно възпаление. Логично, акцент е поставен върху ролята на секретирания от висцералната масна тъкан цитокини (IL-1; IL-6; TNF α ; CRP) в развитието на инсулинова резистентност и имунна дисфункция метаболитен синдром и/или захарен диабет тип 2. Задълбочено е представена ролята на вродения и придобития имунитет в развитието на инсулинова резистентност и хипергликемия. Очертани са според литературните данни промените в общия и диференциален левкоцитен брой и лимфоцитната функция при пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2.

В резюме, обзорът е построен логично, съдържанието му е напълно във връзка с мотивацията и идейния замисъл на дисертационната разработка, очертава обсъждането на резултатите.

Така както е формулирана, *целта* от една страна 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, а от друга - да се анализира взаимовръзката им с различни клинично-лабораторни отклонения, включени като компоненти в характеристиката на метаболитния синдром.

Задачите произтичат от целта и са разделени на 2 основни части с по 4 подзадачи - за първата част на проучването, включваща пациенти с метаболитен синдром без захарен диабет

тип 2 и пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2 и за втората част на проучването, включваща пациенти с метаболитен синдром без захарен диабет тип 2, пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2 и пациенти със захарен диабет тип 1.

Методологията и дизайнът на проучването са прецизно и подробно описани. Всъщност, са проведени две проучвания със сравнителен характер, тип «случай-контрола» при пациенти с метаболитен синдром. Първото проучване включва изследване на цитокини (интерлевкин-1, интерлевкин-6, тумор некротичен фактор алфа) и маркери на възпалението (високо сензитивен С реактивен протеин) при 79 пациенти – 45 с метаболитен синдром без захарен диабет тип 2 и 34 с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2, както и 21 клинично здрави лица. Второто проучване включва изследване на лимфоцитни субпопулации (CD3, CD4, CD8, CD19) и Th/Ts съотношението при 96 пациенти с метаболитен синдром, от които 70 и със захарен диабет тип 2, 22 пациенти със захарен диабет тип 1 и 21 клинично здрави лица.

Прецизно са представени включващи и изключващи критерии за участие в проучването, диагностичните критерии за метаболитен синдром, захарен диабет тип 2 и тип 1. Методичните подходи, клинично-лабораторните, инструменталните и статистическите методи на изследване са съвременни и висококачествени, описани са с вещина.

Подробно са представени *резултатите* от извършените проучвания, богато илюстрирани с 51 таблици и 38 графики, което улеснява възприемането на подробните анализи. Изследваните пациенти с метаболитен синдром са с данни за висцерално затлъстяване, хиперинсулинемия, инсулинова резистентност и промени в β -клетъчната секреторна активност. При наличие на захарен диабет тип 2 с хипергликемия сред изследваните лица с метаболитен синдром се наблюдават по-високи нива на ендогенен инсулин на гладно, прогресираща инсулинова резистентност, отразена с НОМА-ИР индекс и намалена инсулинова секреция, отразена чрез НОМА-B%. Сред пациентите с метаболитен синдром без захарен диабет тип 2 (група А) не се наблюдават изразени различия в нивата на ендогенен инсулин на гладно и НОМА-ИР индекса спрямо възрастта, докато НОМА-B% прогресивно намалява при по-възрастните. Това показва добрия подбор на групите.

Намерени са повишени нива на IL-1, IL-6 и TNF- α сред пациентите с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2, доказват се позитивни корелации между нивата на IL-1 с инсулиновите нива и инсулиновите индекси, на IL-6 с нивата на гликемията и на TNF- α с обиколката на талията, които свидетелстват за ролята на интерлевкините в патогенезата на метаболитен синдром и влиянието им в активиране на последващи имунологични процеси в хода на метаболитен синдром и развитието на захарен диабет 2.

Някои по-важни резултати и изводи по отношение на втората част на проучването са следните: общият левкоцитен, лимфоцитен и гранулоцитен брой в периферната кръв на пациентите с метаболитен синдром без захарен диабет тип 2, с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2, със захарен диабет тип 1 и здрави лица не показва отклонения извън установения референтен обхват. Пациентите с метаболитен синдром без захарен диабет тип 2, с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2, със захарен диабет тип 1 са със статистически по-висок моноцитен брой сравнено със здравите лица. С установен най-висок общ левкоцитен брой са пациентите със захарен диабет. Установява се статистически по-висок абсолютен лимфоцитен и моноцитен брой при лицата с метаболитен синдром спрямо здравите контроли. Резултатите от флуцитометричния анализ на лимфоцитните субпопулации показват сигнификантно по-висок абсолютен брой на общите неспецифични T(CD3+) и Th (CD4 +) лимфоцити и статистически достоверно по-нисък абсолютен брой на Ts (CD8+) лимфоцити при всички лица с метаболитен синдром и захарен диабет тип 1 спрямо здравите контроли. Както пациентите с метаболитен синдром, така и тези със захарен диабет тип 1 са с понижен B (CD19+) лимфоцитен брой, сравнено със здравите лица, като различията са статистически значими само с резултатите получени за изследваните с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2 и захарен диабет тип 1. Абсолютният брой на NK (CD3-/ CD16+56+) в периферната кръв на участниците в изследването с метаболитен синдром е сигнификантно по-висок спрямо абсолютния брой на същите имунокомпетентни клетки при здравите лица.

Анализът на влиянието на промените в имунокомпетентните кръвни елементи върху гликемията на гладно, нивата на HbA1c, ендогенната инсулинова секреция на гладно, инсулиновата резистентност и β -клетъчната секреторна активност при здравите лица показват сигнификантни положителни корелации между абсолютния брой на Ts (CD8+), B (CD19+) лимфоцити и NK (CD3-/CD16+ 56+) клетките с нивата на кръвна захар на гладно. Намерена е линейна, негативна статистически значима корелация между абсолютния брой на Ts (CD8+) лимфоцити с ИРИ и НОМА-B%. В групата на метаболитен синдром без захарен диабет тип 2 се установяват положителни взаимовръзки между абсолютния брой на Ts (CD8+), серумните нива на общия холестерол и триглицериди и негативна с калкулирания LDL-холестерол, а в групата на метаболитен синдром със захарен диабет тип 2 се установяват негативни зависимости между нивата на HDL-холестерола с общия левкоцитен, лимфоцитен и моноцитен брой в периферната кръв. Позитивна сигнификантна корелация се открива между серумните нива на триглицеридите и общ левкоцитен, лимфоцитен, моноцитен брой, общи неспецифични T(CD3+) и Th (CD4+) лимфоцити.

Резултатите при изследваните пациенти със захарен диабет тип 1, подобно на тези със захарен диабет тип 2, показват негативни зависимости между нивата на HDL-холестерола с общия левкоцитен, лимфоцитен и моноцитен брой в периферната кръв и позитивна сигнификантна корелация между серумните нива на триглицеридите и общия левкоцитен, лимфоцитен и моноцитен брой. За разлика от пациентите с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2 в тази група се открива също силна позитивна взаимовръзка между нивата на серумните триглицериди и абсолютния брой на NK(CD 3-/ CD16+ 56+) клетки и негативна такава с броя на B (CD19+) лимфоцитите в периферната кръв.

Забележка: Резултатите от двете проучвания са представени поотделно, смесено с обсъждането, което е доста кратко. Би следвало да се изведе отделно и да се разшири съобразно литературните източници. Формулировката “Обсъждане и дискусия“ е тавтология.

Библиографията е изчерпателна и актуална, отговаря на изискванията - включва 210 базисни и съвременни литературни източника, основно на латиница, 6 на кирилица.

V. Приноси

Ценни са приносите с *оригинален характер* - за първи път у нас е проведено изследване на лимфоцитни популации чрез флуцитометричен анализ при пациенти с метаболитен синдром и нормогликемия и пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2 за доказване на налична взаимовръзка между метаболитни нарушения и имунна дисфункция. За първи път в България е направен опит за определяне на прагова стойност на нивата на плазмените цитокини и лимфоцитни популации като предсказващи риска от развитие на захарен диабет тип 2.

От приносите с *потвърдителен характер* може да се посочат: наличие на нискостепенно хронично възпаление сред пациентите с метаболитен синдром независимо от наличието или липсата на захарен диабет тип 2; завишени нива на серумни цитокини и hsCRP, като маркери на нискостепенното хронично възпаление при пациенти с метаболитен синдром; значима комплексна роля на ИТМ, обиколката на талията, инсулиновата резистентност завишените нива на IL-6 и възрастта като рискови фактори за развитие на захарен диабет тип 2; наличие на имунна дисфункция, отразена чрез промяна в имунокомпетентните лимфоцити при метаболитен синдром.

Важен *приложен принос* за клиничната практика е създаденият софтуерен продукт-калкулатор за индивидуална оценка на вероятността за наличие на заболяване – захарен диабет тип 2 по определени стойности на диастолично артериално налягане и нива на hsCRP и IL-6.

Приемам самооценката на д-р Силвия Ганева-Тодорова относно приносите на дисертационната разработка, както и разделянето им на оригинални и такива с потвърдителен характер.

VI. Публикационна активност

Във връзка с дисертационната разработка са представени 2 публикации в международни списания, 5 публикации в български списания, 7 участия в научни конгреси (2 международни) и участие в 2 научно-изследователски проекти. Първи автор е на 4 публикации и 6 конгресни участия. Тази научна активност подкрепя самостоятелното участие на докторанта в реализиране и оформяне на дисертационната разработка.

VII. Автореферат

Представеният автореферат е правилно структуриран, съдържа всички необходими компоненти и отразява основните аспекти от разработката, с което напълно отговаря на изискванията на Правилника на Медицински Университет-Плевен.

VIII. Заключение

Въз основа на гореизложеното, считам че дисертационният труд на д-р Силвия Симеонова Ганева-Тодорова "Промени в плазмените нива на цитокините и лимфоцитните субпопулации при пациенти с метаболитен синдром" е актуален, представлява завършена научно-изследователска разработка с приносен характер, отговаряща на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за устройството и дейността на Медицински Университет - Плевен за придобиване на образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност „Ендокринология”.

Препоръчвам на членовете на уважаемото Научно жури да дадат положителен вот за реализиране на процедурата по окончателна защита и присъждане на докторска степен.

09.08.2022 г.
Пловдив

Подпис:
/проф. д-р М. Орбецова/

To
Chairman of the Scientific Jury,
determined by Order No. 2028/26.07.2022
of the Rector of MU-Pleven
Prof. D. Dimitrov, MD, PhD

Review

by Prof. Dr. Maria Mitkova Orbetzova,
Scientific specialty "Endocrinology and metabolic diseases"
Head of the Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, "Sv. Georgy" University Hospital,
Head of the Department of Endocrinology, Faculty of Medicine, MU - Plovdiv

of a dissertation for the acquisition of an educational and scientific degree "Doctor"
of Dr. Silvia Simeonova Ganeva-Todorova,
Faculty of Medicine, Medical University - Pleven

Topic: "**Changes in the plasma levels of cytokines and lymphocyte subpopulations in patients with metabolic syndrome**"

Doctoral program: "**Endocrinology**"

Research supervisor: **Assoc. prof. Katia Todorova, MD, PhD,**
Scientific consultant: **Assoc. prof. Tsvetan Lukanov, MD, PhD**

I. Procedural requirements

I was elected as an external member of the Scientific Jury by Order No. 2028/26.07.2022 of the Rector of MU-Pleven. The review was prepared in accordance with the requirements of the Regulations for the organization and activities of MU-Pleven. Independent researcher in doctoral education **Dr. Silvia Simeonova Ganeva-Todorova**, doctoral program "**Endocrinology**" in professional direction 7.1. **Medicine**, from the field of higher education 7. **Health care and sports**, to the Department of Cardiology, Pulmonology, Endocrinology and Rheumatology of the Faculty of Medicine at the Medical University of Pleven, submits all materials necessary for review in accordance with the Regulation for the acquisition of the educational and scientific degree "doctor" as follows :

- Dissertation;
- Dissertation abstract;
- Autobiography signed by the doctoral student;
- Copy of diploma for higher education;
- Copies of diplomas for acquired specialties;
- List and copies of scientific publications on the subject of the dissertation;
- Reference from NACID;
- Other documents related to the procedure.

II. Biographical data of the doctoral candidate

Dr. Silvia Ganeva-Todorova is a graduate of PMG "Vasil Drumev", Veliko Tarnovo. She graduated from higher education "medicine" at MU-Pleven in 1998. She acquired a specialty in Internal Medicine in 2005, and in Endocrinology and Metabolic Diseases in 2012. In 2017 Dr. Ganeva obtained a Master's Degree in Public Health and Health Management.

From 1998 to 1999, she has been working at the Internal Department of the State Hospital in the town of Nikopol. Since 1999 she has been working at the "Georgi Stranski" University Hospital - until 2003 at the Department of Toxicology, subsequently and until now at the Clinic of Endocrinology.

In 2010 she became an assistant in Endocrinology.

III. Relevance of the topic

Metabolic syndrome, regarding its increasing incidence due to the obesity pandemic and unhealthy lifestyles in modern society, is becoming a major risk factor for morbidity and mortality. Hence its enormous socio-economic importance. Adipose tissue is currently recognized as an actively secreting organ with an important influence on inflammatory and immune processes, blood coagulation, regulation of vascular tone, lipid and glucose metabolism, and insulin sensitivity.

Plasma levels of mediators and products of inflammation (CRP and cytokines-IL-6, TNF- α) can be used clinically both as prognostic markers for the development of type 2 diabetes among patients with visceral obesity, and as independent risk factors for development of cardiovascular diseases in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. While the establishment of macrophage infiltration in adipose tissue proves the involvement of innate immunity in the development of low-grade chronic local and generalized inflammation in obesity, the presence of activated T-lymphocytes in adipose tissue proves the involvement of acquired immunity in the processes of inflammation in visceral obesity and insulin resistance.

There are very few studies in the literature reporting the relationship between changes in leukocyte populations and lymphocyte subtypes (as markers of pathological cellular immunity) and the metabolic syndrome, and these have heterogeneous results.

In recent years, accumulated scientific data on the interrelationship between metabolism and immunity have singled out a new concept of "immuno-metabolism". An object of interest in this aspect is the study of metabolic changes occurring after activation of cells by the immune response. The need to study the pathogenetic mechanisms by which immune cells and metabolic pathways interact in obesity and type 2 diabetes mellitus is ripe. In this sense, the dissertation, which is dedicated to studying the changes in the plasma levels of cytokines and lymphocyte populations in metabolic syndrome with and without overt type 2 diabetes mellitus is modern and up-to-date.

IV. Structure of the dissertation; purpose and objectives; material and methods; results and conclusions

The dissertation covers 184 standard typewritten pages and is properly structured in terms of required components. The individual chapters and subchapters are precisely reflected in the content, which brings clarity and transparency to the material.

A targeted *literature review* (30 pages) was made on the problem under consideration, and the general conditions regarding metabolic syndrome, diabetes mellitus and low-grade chronic inflammation, the role of visceral obesity and white adipose tissue in initiating and maintaining chronic low-grade inflammation were advocated. Logically, emphasis is placed on the role of cytokines secreted by visceral adipose tissue (IL-1; IL-6; TNF α ; CRP) in the development of insulin resistance and immune dysfunction, metabolic syndrome and/or diabetes mellitus type 2. The role of innate and acquired immunity in the development of insulin resistance and hyperglycemia is thoroughly presented.. Changes in the total and differential leukocyte count and lymphocyte function in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus were outlined according to literature data.

In summary, the overview is structured logically, its content is fully related to the motivation and conceptual design of the dissertation development, outlines the discussion of the results.

As formulated, the *aim* on the one hand is to investigate the levels of cytokines: interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and lymphocyte subpopulations in peripheral blood as markers of low-grade chronic inflammation and immune response in patients with metabolic syndrome, and on the other - to analyze their interrelationship with various clinical and laboratory impairments, included as components in the characteristics of the metabolic syndrome.

The *tasks* derive from the objective and are divided into 2 main parts with 4 sub-tasks each - for the first part of the study including patients with metabolic syndrome without type 2 diabetes and patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes and for the second part of the study including patients with metabolic syndrome without type 2 diabetes mellitus, patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus, and patients with type 1 diabetes mellitus.

The *methodology and design* of the study are precisely and thoroughly described. In fact, two comparative case-control studies were conducted in patients with metabolic syndrome. The first

study included the examination of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha) and markers of inflammation (high-sensitivity C-reactive protein) in 79 patients - 45 with metabolic syndrome without type 2 diabetes and 34 with metabolic syndrome and type 2 diabetes as well as 21 clinically healthy individuals. The second study included the examination of lymphocyte subpopulations (CD3, CD4, CD8, CD19) and the Th/Ts ratio in 96 patients with metabolic syndrome, 70 of whom also had type 2 diabetes, 22 patients with type 1 diabetes and 21 clinically healthy individuals.

Inclusion and exclusion criteria for participation in the study, diagnostic criteria for metabolic syndrome, type 2 and type 1 diabetes mellitus are presented in details. Methodological approaches, clinical-laboratory, instrumental and statistical research methods are modern and of high quality, and are expertly described.

The results of the conducted studies are presented in detail, richly illustrated with 51 tables and 38 graphs, that facilitates the perception of the detailed analyses. The studied patients with metabolic syndrome have evidence of visceral obesity, hyperinsulinemia, insulin resistance and changes in β -cell secretory activity. In the presence of type 2 diabetes mellitus with hyperglycemia, higher fasting endogenous insulin levels, progressive insulin resistance reflected by NOMA-IR index and reduced insulin secretion reflected by NOMA-B% were observed among the subjects with metabolic syndrome. Among patients with metabolic syndrome without type 2 diabetes mellitus (group A), no marked differences in fasting endogenous insulin levels and NOMA-IR index were observed according to the age, while NOMA-B% progressively decreased in the elderly. This confirms the good selection of the groups.

Increased levels of IL-1, IL-6 and TNF- α were found among patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes, positive correlations were demonstrated of IL-1 levels with insulin levels and insulin indices, of IL-6 with levels of glycemia and of TNF- α with waist circumference, which testify to the role of interleukins in the pathogenesis of metabolic syndrome and their influence in the activation of subsequent immunological processes in the course of metabolic syndrome and the development of diabetes mellitus 2.

Some of the more important results and conclusions regarding the second part of the study are as follows: the total leukocyte, lymphocyte and granulocyte counts in the peripheral blood of patients with metabolic syndrome without type 2 diabetes mellitus, with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus, with diabetes mellitus type 1 and healthy subjects showed no deviations outside the established reference range. Patients with metabolic syndrome without diabetes mellitus type 2, with metabolic syndrome and diabetes mellitus type 2, and with diabetes mellitus type 1 had a statistically higher monocyte count compared to healthy individuals. Patients with diabetes mellitus were found to have the highest total leukocyte count. A statistically higher absolute lymphocyte and monocyte count was found in individuals with metabolic syndrome compared to healthy controls. The results of flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations showed a significantly higher absolute number of total non-specific T(CD3+) and Th (CD4+) lymphocytes and a statistically significantly lower absolute number of Ts (CD8+) lymphocytes in all subjects with metabolic syndrome and diabetes type 1 diabetes versus healthy controls.

Both patients with metabolic syndrome and those with type 1 diabetes mellitus had lower B (CD19+) lymphocyte counts compared to healthy subjects, the differences being statistically significant only with the results obtained for subjects with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus and type 1 diabetes mellitus. The absolute number of NK cells (CD3-/CD16+56+) in the peripheral blood of the participants with metabolic syndrome was significantly higher compared to the absolute number of the same immunocompetent cells of the healthy subjects.

Analysis of the influence of changes in immunocompetent blood cells on fasting glycemia, levels of HbA1c, endogenous fasting insulin secretion, insulin resistance and β -cell secretory activity in healthy subjects showed significant positive correlations between the absolute number of Ts (CD8+), B (CD19+) lymphocytes and NK (CD3-/CD16+ 56+) cells with fasting blood glucose levels. A linear, negative statistically significant correlation was found between the absolute number of Ts (CD8+) lymphocytes with IRI and NOMA-B%. In the metabolic syndrome group without type 2 diabetes mellitus, positive correlations were found between the absolute number of Ts (CD8+), serum levels of total cholesterol and triglycerides, and negative one with calculated LDL-cholesterol,

while in the group of metabolic syndrome with type 2 diabetes mellitus a negative correlation between HDL-cholesterol levels and total leukocyte, lymphocyte and monocyte counts in peripheral blood was found. A positive significant correlation was found between serum triglyceride levels and total leukocyte, lymphocyte, monocyte count, and total non-specific T(CD3+) and Th (CD4+) lymphocytes.

The results in the patients with type 1 diabetes mellitus, similar to those with type 2 diabetes mellitus, showed negative relationship between HDL-cholesterol levels and total leukocyte, lymphocyte and monocyte counts in peripheral blood, and a positive significant correlation between serum triglyceride levels and total leukocyte, lymphocyte and monocyte count. In contrast to patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus, in this group a strong positive correlation was also found between serum triglyceride levels and the absolute number of NK (CD 3-/ CD16+ 56+) cells and a negative one with the number of B (CD19+) lymphocytes in the peripheral blood.

Note: The results of the two studies are presented separately, interspersed with the discussion, which is quite brief. The latter should be brought out separately and expanded according to the sources. In the literature The wording "Discussion and debate" is a tautology.

The *bibliography* is comprehensive and up-to-date, meets the requirements - it includes 210 basic and modern sources, mainly in Latin, 6 in Cyrillic.

V. Contributions

Contributions of an *original nature* are valuable - for the first time in our country, a study of lymphocyte populations by flow cytometric analysis was carried out in patients with metabolic syndrome and normoglycemia and in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus to prove an existing relationship between metabolic disorders and immune dysfunction. For the first time in Bulgaria, an attempt was made to determine a threshold value for the levels of plasma cytokines and lymphocyte populations as predictors of the risk of developing type 2 diabetes mellitus.

Confirmatory contributions include: presence of low-grade chronic inflammation among patients with metabolic syndrome regardless of the presence or absence of type 2 diabetes; elevated levels of serum cytokines and hsCRP, as markers of low-grade chronic inflammation in patients with metabolic syndrome; significant complex role of BMI, waist circumference, insulin resistance, elevated IL-6 levels and age as risk factors for the development of type 2 diabetes; presence of immune dysfunction, reflected by a change in immunocompetent lymphocytes in metabolic syndrome.

An important applied contribution to clinical practice is the elaborated software product - a calculator for individual assessment of the probability of the presence of a disease - diabetes mellitus type 2 based on certain values of diastolic arterial pressure and levels of hsCRP and IL-6.

I accept Dr. Silvia Ganeva-Todorova's self-assessment regarding the contributions of the dissertation development, as well as their division into original and those of a confirmatory nature.

VI. Publication activity

In connection with the PhD thesis, 2 publications in international journals, 5 publications in Bulgarian journals, 7 participations in scientific congresses (2 international) and participation in 2 research projects have been presented. The doctoral student is the first author of 4 publications and 6 congress participations. This scientific activity supports the independent participation of the doctoral student in the realization and presentation of the thesis.

VII. Disseration abstract

The presented abstract of the PhD thesis is properly structured, contains all the necessary components and reflects the main aspects of the dissertation, which fully meets the requirements of the Rules of Medical University-Pleven.

VIII. Conclusion

Based on the above, I consider that the dissertation work of Dr. Silvia Simeonova Ganeva-Todorova "Changes in the plasma levels of cytokines and lymphocyte subpopulations in patients with metabolic syndrome" is up-to-date, it represents a completed research study of a contributing nature, meeting all requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria (LDASRB), the Regulations for the Implementation of LDASRB and the Regulations for the Organization and Activities of the Medical University - Pleven for the acquisition of the educational and scientific degree "Doctor" in the scientific specialty "Endocrinology".

I recommend the members of the respected Scientific Jury to give a positive vote for the implementation of the final defense procedure and the awarding of the doctoral degree.

09/08/2022
Plovdiv

Signature:

/prof. Dr. M. Orbetzova/