МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
КЛИНИКА ПО ЕНДОКРИНОЛОГИЯ,
УМБАЛ „АЛЕКСАНДРОВСКА”

Д-р Емануела Цветкова Захариева

ИМУНОЛОГИЧНИ ФАКТОРИ В РАЗВИТИЕТО НА ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И НЕГОВИТЕ ХРОНИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “доктор”

Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление 7.1. Медицина
Научна специалност „Ендокринология“ (Шифър - 03.01.16)

Научен ръководител: Проф. Д-р Здравко Асенов Каменов, д.м.н.

София, 2018

Дисертационният труд е представен на 205 стандартни печатни страници, онагледен с 34 фигури и 51 таблици. В библиографията са включени 724 заглавия, от които 9 на кирилица и 715 на латиница. Във връзка с дисертационния труд са реализирани общо 9 публикации, 5 от които са с импакт фактор, и 5 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедра по вътрешни болести на Медицински факултет с извлечение от Протокол № 8/14.12.2017г. и е насочен за защита пред научно жури в състав:

1. Проф. д-р Здравко Асенов Каменов, дмн - МУ-София
2. Проф. д-р Цветалина Иванова Танкова, дмн -МУ-София
3. Проф. д-р Мария Миткова Орбецова, дм – МУ-Пловдив
4. Проф. д-р Жулиета Борисова Геренова, дмн – МУ-Стара Загора
5. Доц. д-р Нарцис Нисим Калева-Ходжева, дм- МУ-Пловдив

Резервни членове:

1. Проф. д-р Михаил Ангелов Боянов, дмн – МУ-София
2. Доц. д-р Митко Димитров Митков, дм – МУ-Пловдив

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури, назначено от ректора на Медицински Университет – София на 18.04.2018 г. от 14.00 часа в аудитория „ Проф. Константин Чилов“.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ-София.

Съдържание

1. ВЪВЕДЕНИЕ 5

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 6

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 7

3.1. Изследвани лица 7
3.2. Използвани методи 8

4. РЕЗУЛТАТИ 14

4.1 Изходни характеристики на включените участници. 14
4.2 Диабет-асоциирани антитела при лица със ЗД2 и връзката им с метаболитните и инфламаторни показатели 21
4.3 IL-18 34
4.4 Повърхностна експресия на периферни моноцити 45
4.5 Изследване на TLR2 и TLR4 54
4.6 Генотипиране 68

5. ОБСЪЖДАНЕ 77

6. ИЗВОДИ 88

7. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ 90

8. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА 92

Често използвани съкращения

ДАН	Диастолно артериално налягане
ЗД	Захарен диабет
ЗД1	Захарен диабет тип 1
ЗД2	Захарен диабет тип 2
ИТМ	Индекс на телесна маса
МС	Метаболитен синдром
НГГ	Нарушена гликемия на гладно
НВТ	Нарушен въглехидратен толеранс
ОГТТ	Орален глюкозо толерансен тест
ОТ	Обиколка на талията
ОХ	Общ холестерол
ПГГ	Плазмена глюкоза на гладно
ППГ	Постпрандиална плазмена глюкоза
ДАН	Диастолно артериално налягане
САН	Систолно артериално налягане
ТГ	Триглицериди
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reactive protein
eGFR	Estimated Glomerular Filtration Rate
GAD65	Glutamic acid decarboxylase 65
GAD65A	Anti Glutamic acid decarboxylase 65 antibodies
HDL	High density lipoprotetin
IA-2	Insulinoma associated autoantigen 2
IA-2A	Anti Insulinoma associated autoantigen 2 antibodies
IL	Interleukin
LADA	Latent autoimmune diabetes of the adults
LDL	Low density lipoprotein
TLR	Toll-like receptor
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
sTLR	Soluble Toll-like receptor
VLDL	Very low density lipoprotein
ZnT8	Zinc Transporter 8
ZnT8A	Anti Zinc Transporter 8 antibodies

1. Въведение

Макар хипергликемията да е водеща отличителна особеност при захарен диабет (ЗД), оценката за риска от това заболяване, прогнозата за неговото развитие и прогресията към хронични съдови усложнения не зависят само от нея. Отдавна превантивните мерки и терапията при ЗД, независимо кой тип, е свързана с цялостния метаболитен профил на пациента.

През последните десетилетия се обърна особено внимание на мястото на имунната система в патогенезата на хроничните заболявания, включително и захарен диабет тип 2 (ЗД2). Характеризира се мястото на неспецифичния имунен отговор от повърхностната мембранна експресия на клетки на имунната система, през промяната в концентрацията на различни медиатори на възпалението на локално и системно ниво, до механизмите на потискане на инсулиновата чувствителност и влошаване на бета-клетъчната функция в развитието на ЗД2.

Натрупаха се доказателства, че хроничното ниско-степенно възпаление има място в метаболитния контрол. Цитокини и острофазови белтъци на възпалението намериха място като предиктори за риска от развитие на ЗД2. Антидиабетната терапия повлиява концентрацията на някои от тях независимо от хипогликемизиращия ефект, с чиято цел се използват.

Генетичният риск при ЗД2 е наблюдаван при полиморфизми, кодиращи цитокини и други протеини, участващи във възпалението, което прави ролята на имунната система в патогенезата на заболяването още по-комплексна. Смисълът от търсенето на полиморфизми, предопределящи предразположеността към него, се състои в анализирането на биологичния ефект от тези генетични варианти, на който да се базират следващите превантивни или терапевтични стратегии.

ЗД2 не остава изолиран и от специфичния имунен отговор, имайки предвид, че някои от пациентите с тази диагноза се оказват с латентен автоимунен диабет (Latent autoimmune diabetes of the adults – LADA). Диференциалната диагноза между двете заболявания може да бъде

предизвикателство въпреки клиничния ход и дори наличието на позитивно диабет-асоциирано антитяло когато то е единствено и с ниска концентрация. Въпреки това, ЗД2 и LADA обикновено се различават както по метаболитния си профил, така и по тежестта на съпътстващото хронично ниско-степенно възпаление.

2. Цел и задачи

Целта на дисертационния труд е да се оцени нивото на някои известни показатели, както и да се характеризира мястото на нови, потенциални маркери на свързаното със ЗД2 и предиабет хронично ниско-степенно възпаление в зависимост от присъствието на диабет-асоциирани антитела и наличието на генетични полиморфизми, кодиращи ключови елементи в имунния отговор.

За постигането на тази цел бяха поставени следните **задачи**:

1. Да се установи честотата на позитивни антитела срещу GAD65, IA-2, ZnT8 сред пациентите, включени с диагноза ЗД2, предиабет и контроли.
2. Да се сравни нивото на инфламаторни цитокини като IL-1β, IL-6, TNFα, IL-18 в зависимост от присъствието на диабет-асоциирани антитела.
3. Да се оцени на повърхностната експресия на TLR2, TLR4, CD36, CD64, CD163 от моноцити при пациенти със ЗД2.
4. Да се характеризира концентрацията на разтворимите фракции на някои от тези рецептори, като TLR2 и TLR4, при пациенти със ЗД2.
5. Да се оцени генотипната и алелна честота на полиморфизмите Asp299Gly, Thr399Ile в гена *TLR4* и Pro12Ala в гена *PPARG* при пациенти със ЗД2 и предиабет и да се потърси асоциация с хроничните микросъдови усложнения и нивото на инфламаторните маркери и моноцитната експресия в зависимост от генотипа.

3. Материали и методи

3.1. Изследвани лица

В проучването бяха включени лица на възраст между 36 и 64 години, отговарящи на следните включващи критерии:

3.1.1. Пациенти със ЗД2

- поставена диагноза ЗД2 с давност на заболяването до 10 години.

3.1.2. Пациенти с LADA

- поставена диагноза ЗД с давност на заболяването до 10 години,
- диагностициране на заболяването след 35 годишна възраст,
- анамнеза за липса на необходимост от лечение с инсулин за поне 6 месеца от диагностициране на заболяването,
- наличие на поне едно положително диабет-асоциирано антитяло.

3.1.3. Пациенти с нарушена гликемия на гладно и/или нарушен въглехидратен толеранс (предиабет)

- резултат от орален глюкозо-толерансен тест (ОГТТ) със 75 г глюкоза, показващ наличието на нарушена гликемия на гладно (НГГ) – плазмена глюкоза на гладно $\geq$ 5.6 и < 7.0 mmol/l; и/или нарушен въглехидратен толеранс (НВТ) с плазмена глюкоза на 120-та минута $\geq$7.8 и <11.1 mmo/l.

Изключващи критерии за трите групи пациенти бяха :

- Възраст под 36 и над 64 г,
- Декомпенсирани придружаващи ендокринни или сърдечносъдови, бъбречни, чернодробни заболявания, неоплазми,
- Остри и хронични възпалителни заболявания,
- Психични заболявания,

- Бременност,
- Нежелание за участие в проучването.

3.1.4. Контролна група

Контролната група включва клинично здрави мъже и жени на възраст между 36 и 64 г. с ИТМ < 30кг/м^2, набирани сред персонала на клиниката, клинично здрави лица, посетили консултативния кабинет на клиниката по Ендокринология с цел профилактика, лица, постъпили в клиниката за тънко-иглена аспирационна биопсия на щитовидната жлеза с еутиреоидна функция и цитологичен резултат колоидна струма без придружаващи заболявания, доброволци.

3.2. Използвани методи

3.2.1. Анамнеза и физикален статус

3.2.2. Стандартни лабораторни изследвания

- Пълна кръвна картина и СУЕ, а за участниците, при които е предвидена флоуцитометрия – и диференциална кръвна картина.
- Плазмена глюкоза на гладно (ПГГ). За участниците със ЗД2 – постпрандиална плазмена глюкоза (ППГ), измерена два часа след обедното хранене и HbA1c. За участниците с предиабетно състояние – плазмена глюкоза (ПГ) на втория час след ОГТТ.
- Липиден профил - общ холестерол (ОХ), HDL, LDL, VLDL, триглицериди(ТГ).
- Серумен креатинин и изчислена гломерулна филтрация – estimated glomerular filtration rate (eGFR) по формула на The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD):

186 x (креатинин, μmol/l / 88.4)$^{-1.154}$ x (възраст)$^{-0.203}$ (x (0.742 за жени).

3.2.3. При участниците със ЗД2 се проведе оценка на неврологичния статус за наличието на диабетна полиневропатия (ДПНП) полуколичествено чрез Neuropathy Disability Score и фундоскопия от офталмолог с цел скрининг за наличието на диабетна ретинопатия (ДРП).

3.2.4. Метаболитен синдром беше диагностициран съгласно критериите на IDF [International Diabetes Federation. The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. 2005].

3.2.5. Специализирани лабораторни изследвания

3.2.5.1. *Показатели за оценка на хроничното ниско-степенно възпаление в серум:*

- **С-реактивен протеин** (**CRP**) - Cardiac C-Reactive Protein (Latex) High Sensitive (Roche Diagnostics GmbH, Германия) за имунотурбидиметричен анализ усилен с частици чрез автоматичен анализатор Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics GmbH, Германия).
- **Interleukin 6 (IL-6)** - Електрохемилуминисцентен имунотест (ECLIA) (Roche Diagnostics GmbH, Германия), с анализатор Elecsys 2010 (Roche Diagnostics GmbH, Германия).
- **Tumor Necrosis Factor α (TNFα)** - Human TNFα ELISA kit (Diaclone, Франция).
- **Interleukin 1β (IL-1β)** - Human IL-1β ELISA kit (Diaclone, Франция).
- **Interleukin 18 (IL-18)** - Human IL-18 ELISA kit (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Япония).
- **разтворими фракции на TLR2 и TLR4 (soluble TLR2, TLR4 – sTLR2, sTLR4)** - Human TLR2 ELISA kit и Human TLR4 ELISA kit (Elabscience, САЩ).

3.2.5.2. *Диабет-асоциирани антитела*

- **анти GAD65 антитела (GAD65A)** - Anti-GAD (IgG) ELISA kit (Euroimmune Medizinische Labordiagnostika AG, Германия).

Референтни граници съгласно производителя:

< 10 U/ml – отрицателен; ≥ 10 U/ml – положителен

- **анти IA-2 антитела (IA-2A)** - Anti-IA2 (IgG) ELISA kit (Euroimmune Medizinische Labordiagnostika AG, Германия).

Референтни граници съгласно производителя:

< 10 U/ml – отрицателен; ≥ 10 U/ml – положителен

- **анти ZnT8 антитела (ZnT8A)** антитела в серум използвахме Anti-ZnT8 (IgG) ELISA kit (BioVendor – Laboratorní medicína a.s., Чехия).

Референтни граници съгласно производителя:

< 15 U/ml – отрицателен; ≥ 15 U/ml – положителен

***3.2.5.3**. Флоуцитометрия*

За определяне на моноцитните подтипове е използвана цяла венозна кръв взета с K3EDETA (етилен диамин тетраацетат). Пробите са съхранявани на стайна температура за не повече от 24ч. Приложено беше директно имунофлуоресцентно маркиране, като моноклоналните антитела бяха конюгирани с флуорохром както следва: CD36 FITC / CD163 PE / CD64 PerCP/ CD14 PeCF594 / CD16 PeCy7 / CD45 APC-H7 (BD Biosciences, САЩ) и CD282 (TLR2) APC / CD284 (TLR4) AF 700 (eBioscience, САЩ). Анлизът се осъществи на апарат FACSCanto II Flow Cytometer (Becton Dickinson, САЩ), а данните бяха обработени с FACSDiva v6.0 software (Becton Dickinson, САЩ).

С помощта на положителни контроли CD45/CD14 и физическите параметри на клетките беше очертан регион около моноцитната популация, която беше подложен на анализ. В зависимост от степента на гранулираност, експресията на CD14 и/или CD16, моноцитите бяха разделени на класически (CD14++CD16-), междинни (CD14++CD16+) и некласически (CD14+CD16++).

Резултатите за всеки подтип бяха представени като процент от общия брой бели кръвни клетки и като процент моноцити, еспресиращи съответния маркер спрямо общия брой моноцити във всеки отделен подтип.

***3.2.5.4**. Генотипиране*

За генетичен анализ се използва високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки. Венозната кръв се взема в пластмасова епруветка (с обем от 3 ml) съдържаща K_3 EDTA, като антикогулант. Кръвта беше взета на гладно и се съхранява при +4º С в продължение на максимум 48 часа преди изследването. Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв се осъществи чрез изсолване на белтъците. Проведе се полимеразна верижна реакция със следните праймери и компоненти на реакционната смес (таблици 1 и 2):

Таблица 1. Нуклеотидна последователност на използваните праймери.

Полиморфизъм	**Нуклеотидна последователност на праймерите**
***PPARG* Pro12Ala**	F 5'GCCAATTCAA GCCCAGTC3' R5'GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGC TTTCCG3'
***TLR4* Asp299Gly**	F 5'GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG3' R 5'GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC3'
***TLR4* Thr399Ile**	F 5'GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA3' R 5'ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGAGTTAAATGCT3'

Таблица 2. Компоненти на реакционната смес за осъществяване на амплификацията на полиморфния участък в анализираните гени.

Компоненти за реакционната смес за PCR	**Количество (µl)**
dd H2O	11.2
Буфер	1.5
дНТФ	0.6
Праймер F	0.3
Праймер R	0.3
Tag –полимераза	0.1
ДНК	1
Краен обем	15
ddH2O - двойно дестилирана вода, дНТФ – дезоксинуклеотид трифосфат	

Условията на амплификация са обобщени в таблица 3.

Таблица 3. Условия за амплификация при изследваите полиморфизми.

Полиморфизъм	Asp299Gly	Thr399Ile	Pro12Ala
Условия за амплификация	94^0C – 5 min.еднократно **30 цикъла:** 95ºC – 30 sec. 53ºC –60 sec. 72ºC – 1 min 72ºC – 5min.	94^0C – 5 min.еднократно **30 цикъла:** 95ºC – 30 sec. 60ºC –60 sec. 72ºC – 1 min 72ºC – 5min.	94^0C – 5 min.еднократно **30 цикъла:** 95ºC – 30 sec. 57ºC –30 sec. 72ºC – 1 min 72ºC – 5min.
Размер на PCR продукта	**249 б.д.**	**407 б.д.**	**270 б.д.**
б.д. – базови двойки			

Компонентите на реактивната смес и използваните ендонуклеази за целите на рестрикционния анализ са отразени в таблици 4 и 5. Анализът се провежда overnight на 37ºC. Разделянето на фрагментите се осъществява на 2.5% агарозен гел.

Таблица 4. Състав и количество на използваните реактиви и разтвори при рестрикционен анализ.

Полиморфизъм	Asp299Gly	Thr399Ile	Pro12Ala
PCR продукт	12 µl	12 µl	12 µl
Буфер	**NEB3 -** 2.5µl	**NEB4 -** 2.5µl	**NEB4 -** 2.5µl
BSA	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl
Рестриктаза	**Nco I** -0.4 µl	**Hinf I -** 0.3 µl	**BSTU I -**0.4 µl
dd H_2O	9.8 µl	10 µl	9.8 µl
Краен обем	25 µl	25 µl	25 µl
BSA - говежди серумен албумин , ddH2O- двойно дестилирана вода			

Таблица 5. Използвани при рестрикционния анализ ензими.

Полимор-физъм	**Рестрикт аза**	**Секвенционна последователност**	**Див тип (б.д.)**	**Нов тип (б.д.)**
***PPARG* Pro12Ala**	BSTU I	5'GCCAATTCAA GCCCAGTC3' 5'GATATGTTTGCAGACAGT GTATCAGTG AAGGAATCGCTTTCCG3'	270	227+43
***TLR4* Asp299Gly**	Nco I	5'GATTAGCATACTTAGACT ACTACCTCCATG3' 5'GATCAACTTCTGAAAAAG CATTCCCAC3'	249	223+26
***TLR4* Thr399Ile**	Hinf I	5'GGTTGCTGTTCTCAAAGT GATTTTGGGAGAA3' 5'ACCTGAAGACTGGAGAGT GAGAGTTAAATGCT3'	407	378+29
б.д. – базови двойки				

От участниците от всички групи е взета венозна кръв на гладно (след поне 8 часа гладуване през нощта) чрез венепункция в епруветки с К3ЕДТА – за провеждане на флоуцитометрия и генетичен анализ; и в епруветки за отделяне на серум с клот активатор. Последните са подложени на центрофугиране в рамките на половин час след венепункцията на 4000 оборота/мин в продължение на 15 мин. Отделеният серум е разпределен в конични епруветки Епендорф с капаче и е съхранен при -80ºС до провеждане на предвидените изследвания. Епруветките, предвидени за флоуцитометрия, са съхранявани на стайна температура и в рамките на деня са доставени в съответната лаборатория. Епруветките за генетичен анализ са съхранявани на +4ºС за не повече от 48 часа преди доставянето в лабораторията.

4. Резултати

4.1 Изходни характеристики на включените участници.

В проучването бяха включени общо 234 души, от които 128 със ЗД2, 14 пациента с LADA, 54 лица с предиабетно състояние и 38 контролни участници (Таблица 6). От всички участници с предиабет 44.44% бяха с НГГ, 42.59% - с НВТ, а при 12.96% се установиха и двете.

Пациентите със ЗД2 и предиабетно състояние бяха със значително по-неблагоприятни антропометрични показатели като ИТМ и обиколка на талията, по-лош контрол на артериалното налягане в сравнение с участниците с LADA и контролите. Спрямо пациентите с LADA, лицата със ЗД2 и предиабет имаха по-неблагоприятни показатели от липидния статус (HDL, VLDL холестерол и триглицериди). HbA1c беше по-нисък при лицата със ЗД2 спрямо тези с LADA. Липидният статус при ЗД2 и предиабет се отличаваше от този на контролите само по отношение на нивото на триглицеридите. На тези данни съответства и разликата в честотата на метаболитния синдром между изследваните групи, която беше най-висока при ЗД2, следвана от предиабет и сравнима при LADA и контролите.

Пациентите със ЗД2 и предиабет се различаваха значително от контролите по броя на белите кръвни клетки (white blood cells count – WBC) и скоростта на утаяване на еритроцитите (СУЕ). Освен това, констатирахме значима разлика между нивото на IL-6 и hs-CRP между ЗД2 и предиабет спрямо LADA и контролните участници. Нивото на IL-6 се различаваше значително и между ЗД2 и предиабет.

В нивото на TNFα не констатирахме сигнификантна разлика между групите. Нивото на IL-1β беше измеримо само при 18 от всички пациенти със ЗД и 7 от контролните участници, поради което резултатите не бяха подложени на статистически анализ.

Таблица 6. Изходни характеристики на участниците.

	ЗД2 (n=128)	Предиабет (n=54)	LADA (n=14)	Контроли (n=38)
Възраст (г)	53.8±6.8*	51.7±8.2	50.1±7.9	52.3±4.2
Пол (ж/м)	70/58	44/10**‡	11/3	20/18
Hgb (g/l)	141.9±13.6	136.6±13.6*†	138.7±12.5	144.5±12.2
WBC(G/l)	7.7±2.2**	7.4±1.7**	6.7±1.9	6.5±1.9
СУЕ (mm/h)	10.2±6.3**	11.2±6.8**	8.4±6.5	5.7±3.5
МС (%)	85.2**^^	72.2**†^^	14.3‡	18.4
Акт. пушач(%)	42.2	28.6	31.5	52.6
ИТМ (kg/m^2)	32.7±6.6** ^^	35.9±6.6**‡^^	24.9±3.5‡	23.7±3.3
Обиколка талия (cm)	103.7±14.5**^^	105.3±12.7**^^	85.4±9.3‡	88.3±13.2
САН (mmHg)	135.8±19.2**^^	134.0±17.3**^^	112.9±12.5‡	119.0±16.1
ДАН (mmHg)	83.9±9.8**^^	83.7±9.0**^^	73.2±9.1‡	74.6±10.1

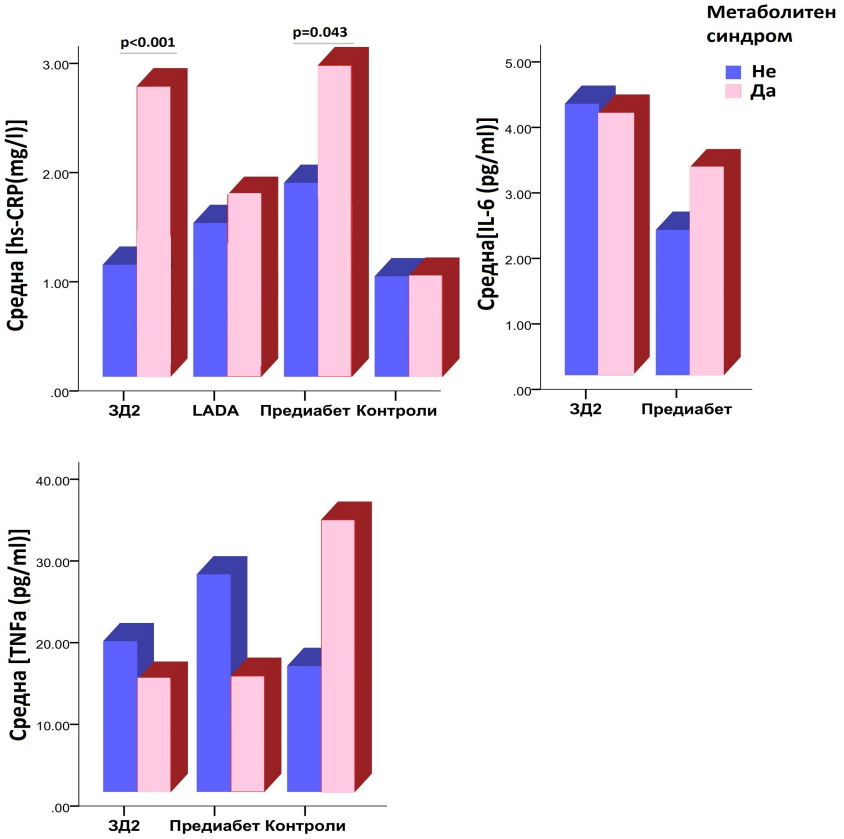
*p<0.05 спрямо контролите; **p<0.01 срямо контролите; †p<0.05 спрямо Ab-ЗД2; ‡ p<0.01 спрямо Ab-ЗД2; ^p<0.05 спрямо LADA; ^^p<0.01 спрямо LADA; МС- метаболитен синдром

Таблица 6 (продължение). Изходни характеристики на участниците.

	ЗД2 (n=128)	Предиабет (n=54)	LADA (n=14)	Контроли (n=38)
HbA1c (%)	8.0±1.9^^	-	9.4±1.2‡	-
ПГГ (mmol/l)	8.0±2.9**	5.6±0.7**‡^^	7.8±2.6*	5.1±0.4
ППГ (mmol/l)	8.4±3.3	-	9.5±4.2	-
ПГ на 120та мин от ОГТТ	-	7.7±1.6	-	-
ОХ (mmol/l)	5.2±1.2	5.3±1.2	5.0±1.1	5.3±0.9
HDL (mmol/l)	1.3±0.4^^	1.2±0.4^^	1.8±0.5‡*	1.3±0.6
LDL (mmol/l)	3.0±1.0	3.4±1.0^	2.4±1.2	3.3±1.0
VLDL (mmol/l)	0.8±0.4^^	1.7±0.8^^	0.4±0.1‡	0.7±0.5
ТГ (mmol/l)	1.9±1.0**^^	1.3±1.2**^^	1.1±1.0‡	1.3±1.2
eGFR(ml/min /1.73m^2)	95.0±24.5**	85.5±21.3‡^	100.1±22.7**	82.0±15.5
Hs-CRP (mg/l)	2.4±1.6**^	2.4±1.7**^	1.4±1.4†*	0.9±1.3
IL-6 (pg/ml)	4.0±4.8**^^	2.9±4.3**†^^	<1.5‡	<1.5
TNFα (pg/ml)	14.6±16.7	17.2±14.5	13.5±18.0	16.2±18.1

*p<0.05 спрямо контролите; **p<0.01 срямо контролите; †p<0.05 спрямо Ab-ЗД2; ‡ p<0.01 спрямо Ab-ЗД2; ^p<0.05 спрямо LADA; ^^p<0.01 спрямо LADA;

Нивото на hs-CRP, IL-6 и TNFα се различаваше статистически само по отношение на първия показател при ЗД2 и предиабет в зависимост от това дали участниците покриват критериите за метаболитен синдром или не (Фигура 1).



Фигура 1. Средно ниво на инфламаторни маркери при участниците в зависимост от наличието на метаболитен синдром

Единствено в групата със ЗД2 установихме положителна корелация между нивото на hs-CRP и броя критерии за метаболитен синдром (r = 0.249, p = 0.012). За останалите изследвани инфламаторни параметри не беше констатирана зависимост в нито една от групите (Таблица 7).

Таблица 7. Корелационни коефициенти между броя критерии за МС и инфламаторните параметри при участниците.

	ЗД2	**Предиабет**	**LADA**	**Контроли**
Hs-CRP (mmol/l)	**0.249***	0.240	-0.094	0.300
IL-6 (pg/ml)	-0.022	0.084	-	0.239
TNFα (pg/ml)	0.129	-0.430	0.204	0.466
*p<0.05				

Корелационният анализ с параметрите, участващи като критерии за диагнозата на метаболитния синдром, но и допълнителни антропометрични, липидни и метаболитни показатели, е отразен в таблица 8. При него се наблюдава водещата асоциация между IL-6, hs-CRP и антропометричните показатели и артериалното налягане сред пациентите със ЗД2, предиабет, но и контролите. Поради неизмеримо ниските стойности на IL-6 при LADA и контролите, корелационен анализ с негово участие не се извърши в тези групи.

Таблица 8. Корелационен анализ между инфламаторните параметри и клинични, антропометрични, липидни и гликемични показатели.

	ЗД2			Предиабет			LADA		Контроли	
	IL-6	**TNF**	**hs-CRP**	**IL-6**	**TNF**	**hs-CRP**	**TNF**	**hs-CRP**	**TNF**	**hs-CRP**
ИТМ (kg/m^2)	**0.302****	-0.209	**0.515****	**0.366****	-0.241	**0.438****	0.357	0.044	0.373	**0.336***
ОТ (cm)	**0.290****	-0.183	**0.537****	**0.324***	-0.403	**0.374***	0.036	-0.335	0.209	0.195
САН (mmHg)	**0.320****	-0.020	**0.205****	0.107	-0.197	0.142	-0.040	0.244	0.308	**0.393***
ДАН (mmHg)	**0.265****	-0.131	0.126	0.116	-0.436*	0.103	0.000	0.000	0.307	**0.412***
HbA1c (%)	0.097	-0.261	-0.056	-	-	-	0.000	0.112	-	-
ПГГ (mmol/l)	0.154	-0.112	0.131	-0.229	-0.076	0.134	-0.143	0.357	0.230	0.268
ППГ (mmol/l)	0.099	0.041	-0.020	-	-	-	-0.429	**0.622***	-	-

*p<0.05; **p<0.01

Таблица 8 (продължение). Корелационен анализ между инфламаторните параметри и клинични, антропометрични, липидни и гликемични показатели.

	ЗД2			Предиабет			LADA		Контроли	
	IL-6	**TNF**	**hs-CRP**	**IL-6**	**TNF**	**hs-CRP**	**TNF**	**hs-CRP**	**TNF**	**hs-CRP**
ОХ (mmol/l)	-0.150	0.102	-0.194	-0.181	0.141	-0.118	0.286	-0.002	0.099	0.042
HDL (mmol/l)	-0.033	-0.093	-0.177	-0.291	0.167	-0.200	-0.200	0.055	-0.491	-0.195
LDL (mmol/l)	-0.155	0.248	-0.203	-0.011	0.275	-0.199	0.257	0.258	0.033	0.022
VLDL (mmol/l)	-0.085	0.095	0.075	-0.036	-0.483	0.287	**0.880***	0.139	0.176	-0.099
ТГ (mmol/l)	-0.058	0.108	0.146	0.028	-0.356	0.149	**0.821***	0.106	0.387	0.175

*p<0.05; **p<0.01

4.2 Диабет-асоциирани антитела при лица със ЗД2 и връзката им с метаболитните и инфламаторни показатели

Честотата на изследваните антитела сред участниците е описана в таблица 9.

Таблица 9. Честота на диабет-асоциирани антитела при участниците.

Група участници	GAD65A, n (%)		IA-2A, n (%)		ZnT8A, n (%)	
	отр.	**пол.**	**отр.**	**пол.**	**отр.**	**пол.**
ЗД2	116 (90.6%)	12 (9.4%)	127 (99.2%)	1 (0.8%)	51 (100%)	0
LADA	0	14 (100%)	8 (57.1%)	6 (42.9%)	6 (85.7%)	1 (14.3%)
Предиабет	51 (96.2%)	2 (3.8%)	53 (100%)	0	15 (100%)	0
Контроли	38 (100%)	0	38 (100%)	0	13 (97.7%)	1 (7.1%)

Водещо по честота положително антитяло сред лицата, включени като участници със ЗД2, беше GAD65A. При всички участници с известен автоимунен диабет потвърдихме наличието на положителни GAD65A, а при 42.9% от тях се констатира и положително IA-2A на фона на нито един случай на положителни две антитела сред лицата със ЗД2 ($p = 0.016$). ZnT8A беше изследван при по-малък брой пациенти, но неговите стойности останаха под диагностичния праг, определен от производителя, сред лицата със ЗД2. Така честотата на положителни антитела сред лица с първоначална диагноза ЗД2 се определи като 10.16%, а при предиабет – 3.8% (Таблица 7).

Нивото на GAD65A при лица, диагностицирани със ЗД2 и лица, покриващи критериите за LADA, се различава статистически в полза на последните (Таблица 10). Нивото на IA-2A варира в изключително широк диапазон между 26 и 2356 IU/ml. За ZnT8A повърдихме високо ниво при единствения пациент в групата LADA (255.73IU/ml), при който и останалите антитела са над 200 IU/ml (GAD65A - 248.7 IU/ml; IA-2A - 2356 IU/ml). Резултатът бе положителен и за един от контролните участници, но в стойност по-близка до референтната граница – 22 IU/ml.

Таблица 10. Сравнителен анализ между стойностите на GAD65A при ЗД2 и LADA.

	GAD65A (IU/ml) при LADA (n=14)	**GAD65A (IU/ml) при Ab^+ЗД2 (n=12)**	***P***
M (SD)	192.94 (78.77)	109.06 (75.61)	0.014
Md	232.30	113.10	
Minimum	25.80	11.80	
Maximum	274.90	210.80	
M - Mean, SD – Standard Deviation, Md - Median			

Клиничните и биохимични характеристики на участниците със ЗД2 с отрицателни антитела (Ab-ЗД2), тези от тях, при които за първи път установяваме положително антитяло (Ab+ЗД2), пациентие с LADA и контролите са отразени в таблица 11. Възрастта при участниците със ЗД2 е по-висока от тази при контролите. Констатирахме по-добри метаболитни показатели (ИТМ, обиколка на талията, артериално налягане, HDL и VLDL-холестерол, триглицериди) и по-ниската честота на метаболитния синдром, но по-лош гликемичен контрол (HbA1c) сред пациентите с

LADA спрямо тези с отрицателни антитела. Но сравнителният анализ между участниците със ЗД2 с положителни и отрицателни антитела показа значителна разлика при по-малък брой показатели – само ИТМ, HDL холестерол, HbA1c и ППГ. Честотата на метаболитния синдром остана по-висока при пациенти с отрицателни антитела. Между участниците, при които за първи път установяваме положително антитяло, и лицата с известен автоимунен диабет констатирахме значителна разлика само в контрола на АН и VLDL-холестерола. Въпреки, че честотата на метаболитния синдром е по-висока при първите, разликата се оказа статистически незначителна. Тя е несигнификантна и за двете групи спрямо контролите (Таблица 11).

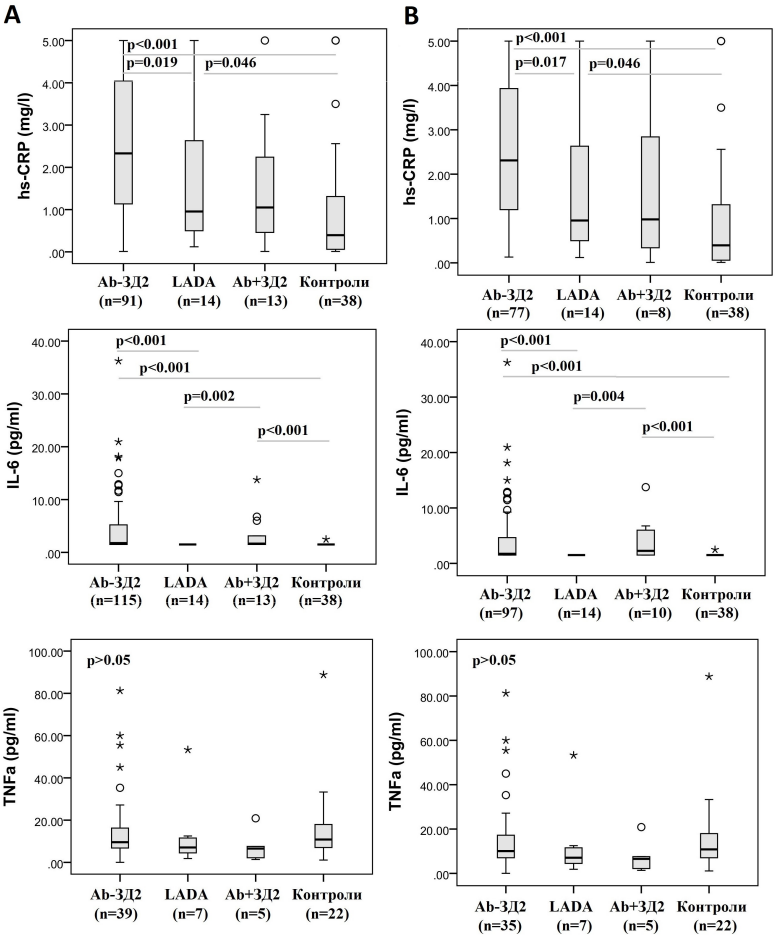
Нивото на инфламаторните показатели е сравнено и на фигура 2. Статистическа разлика беше констатирана спрямо hs-CRP и IL-6. Двата показателя са значително по-високи при пациенти със ЗД2 с отрицателни антитела както спрямо лицата с известен автоимунен диабет, така и спрямо контролите. Спрямо участниците с новооткрити положителни антитела разликата остана незначителна.

Нивото на IL-6 обаче е по-високо при последните спрямо лицата, включени като LADA, както и спрямо контролите (Фигура 2). За TNFα не установихме значителни разлики в нивото сред отделните групи. Резултатите се запазиха и след провеждане на анализа само сред лица, които не приемат ацетил салицилова киселина (Фигура 2).

Таблица 11. Клинични и биохимични характеристики на участниците след разделянето им на Ab-ЗД2 и Ab+ЗД2.

	Ab-ЗД2 (n=115)	Ab+ЗД2 (n=13)	LADA (n=14)	Контроли (n=38)
Възраст (г)	53.8±6.7*	54.5±7.9*	50.1±7.9	52.3±4.2
Пол (ж/м)	64/51	6/7	11/3	20/18
Възраст при пост. диагноза (г)	49.4±7.4	50.7±8.7	45.9±8.4	-
Давност на ЗД (г)	4.4±3.2	3.8±2.4	3.3±2.5	-
МС (%)	89.6**^^	46.2‡	14.3‡	18.4
Акт. пушач(%)	40.0	53.8	28.6	52.6
ИТМ (kg/m^2)	33.2±6.4**^^	28.5±7.1†*	24.9±3.5‡	23.7±3.3
ОТ (cm)	104.4±14.0**^^	96.8±17.4	85.4±9.3‡	88.3±13.2
САН (mmHg)	136.8±19.5**^^	127.3±13.9^	112.9±12.5‡	119.0±16.1
ДАН (mmHg)	84.0±1.0**^^	83.1±8.6*^	73.2±9.1‡	74.6±10.1
HbA1c (%)	7.9±1.9^^	8.9±1.7†	9.4±1.2‡	-
ПГГ (mmol/l)	7.8±2.7**	9.5±4.2**	7.8±2.6*	5.1±0.4
ППГ (mmol/l)	8.1±3.1	11.3±3.5 ‡	9.5±4.2	-
ОХ (mmol/l)	5.2±1.1	5.7±1.4	5.0±1.1	5.3±0.9
HDL (mmol/l)	1.3±0.4^^	1.7±0.6†*	1.8±0.5‡*	1.3±0.6
LDL (mmol/l)	3.0±0.9	3.1±1.5	2.4±1.2	3.3±1.0
VLDL (mmol/l)	0.8±0.3^^	0.8±0.5^	0.4±0.1‡	0.7±0.5
ТГ (mmol/l)	1.9±1.0**^^	1.8±1.2	1.1±1.0‡	1.3±1.2
eGFR (ml/min/ 1.73m^2)	94.6±24.9**	98.9±20.2**	100.1±22.7**	82.0±15.5
Hs-CRP (mg/l)	2.50±1.60**^	1.61±1.52	1.44±1.39†*	0.92±1.27
IL-6 (pg/ml)	4.1±5.0**^^	3.5±3.6**^^	<1.5‡	<1.5
TNFα (pg/ml)	15.5±17.4	7.7±7.8	13.5±18.0	16.2±18.1

*p<0.05 спрямо контролите; **p<0.01 срямо контролите; †p<0.05 спрямо Ab-ЗД2; ‡ p<0.01 спрямо Ab-ЗД2; ^p<0.05 спрямо LADA; ^^p<0.01 спрямо LADA; МС-метаболитен синдром



Фигура 2. Инфламаторни показатели при А) всички изследвани участници; В) след изключване на пациентите, приемали ацетил-салицилова киселина.

Приеманата антидиабетна, антихипертензивна и липидо-понижаваща терапия е обобщена в таблица 12. Отразената терапия е тази, при която пациентите са включени в проучването. При две от лицата, попаднали в група Ab+ЗД2, е започнато инсулино-лечение по време на хоспитализацията поради лош гликемичен контрол на фона на провежданата антидиабетна терапия. В случаите, в които е налице припокриване на лечение с инсулин и инсулинов секретагог (СУП, Инкретин-базирана терапия), се касае за използването на базален инсулин в схемата на лечение.

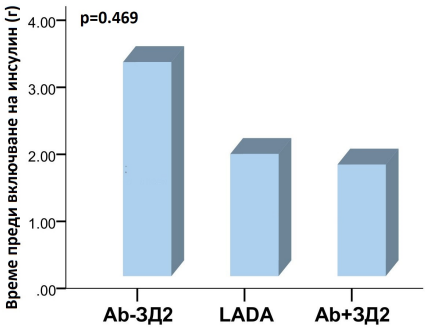
Таблица 12. Провеждано лечение при пациентите със ЗД.

Медикаменти	Ab-ЗД2	Ab+ЗД2	LADA
		Да/не (% да)	
Инсулин	23/92(20.0)^^‡	9/4(69.2)**^	14/0(100.0)**†
Метформин	87/28(75.7)^	7/6(53.8)	6/8(42.9)*
СУП	33/82 (28.7)	2/11 (15.4)	1/13 (7.1)
ДПП-4 инхибитор	13/102(12.2)	1/12(7.7)	2/12(14.3)
GLP-1 агонист/аналог	2/113(1.7)	1/12(7.7)	0/14(0)
Акарбоза	6/109(5.2)	0/13(0)	0/14(0)
Статин	23/92(20.0)	3/10(23.1)	2/12(14.3)
Фибрат	8/107(7.0)	0/13(0)	0/14(0)
ACE инхибитор	36/79(31.3)	5/8(46.2)^	1/13(7.1)†
ARB	31/84(27.0)^†	0/13(0)*	0/14(0)*
Бета блокер	53/62(46.1)^^	6/7(46.2)^	1/13(7.1)†**
Блокер на калциевите канали	33/82(28.7)	2/11 (15.4)	1/13(7.1)
Диуретик	48/67(41.7)^	4/9(30.8)	2/12(14.3)*

*p<0.05 спрямо Ab-ЗД2; **p<0.01 спрямо Ab-ЗД2; ^p<0.05 спрямо LADA; ^^p<0.01 спрямо LADA; †p<0.05 спрямо Ab+ЗД2; ‡p<0.01 спрямо Ab+ЗД2.

От таблицата се вижда, че статистически значима е разликата в лечението само по отношение на инсулина и метформина от антидиабетната терапия, както и за някои медикаменти в антихипертензивната терапия. Разликата в използването на липидо-понижаваща терапия в отделните групи е несигнификантна.

Сравнителният анализ по отношение на времето от поставянето на диагноза ЗД до включването на инсулин показа най-дълъг период при участниците с отрицателни антитела, но разликата между трите групи остана стастически несигнификантна (фигура 3).



Фигура 3. Сравнителен анализ за периода от поставяне на диагноза ЗД до включване на инсулинолечение.

Предвид критериите, въз основа на които са включени участниците с LADA, общо 11 (8.59%) от установените в настоящия анализ случаи на положителни антитела сред пациентите със ЗД2 също могат да бъдат класифицирани като LADA.

Повторихме анализа сред участниците, които не приемат метформин (Таблица 13). Резултатите са на базата на малък брой пациенти с положителни антитела.

Концентрацията на hs-CRP при лицата, при които за първи път установяваме положително антитяло, отново не се различаваше от тази при останалите групи диабетици, докато нивото на IL-6 е по-високо отколкото при LADA. Запази се липсата на статистически

значима разлика в нивото на IL-6 при лица с отрицателни антитела и новооткрити положителни. Тези резултати се констатират на фона на вече сравними ИТМ и честота на метаболитния синдром при лицата, включени в групата ЗД2, които се оказват с положителни или отрицателни антитела (Таблица 13).

Таблица 13. Сравнителен анализ между участниците след изключване на лицата, приемали метформин преди изследването.

	Ab-ЗД2 (n=28)	Ab+ЗД2 (n=6)	LADA (n=8)	Контроли (n=38)
Възраст (г)	52.8±6.9	57.3±4.3*	51.1±8.5	52.3±4.2
Пол (ж/м)	12/16^	2/4	7/1†	20/18
Възраст при диагн. на ЗД (г)	48.4±8.1	53.3±5.3	45.7±9.9	-
Давност на ЗД (г)	4.4±4.0	4.1±4.8	3.9±2.9	-
МС (%)	71.4^^**	33.3	0‡	18.4‡
ИТМ (kg/m^2)	29.7±7.4^**	24.5±5.3	23.4±3.0†	23.7±3.3
ОТ (cm)	100.2±13.6^^**	88.8±13.9	79.6±5.9‡	88.3±13.2
САН (mmHg)	138.9±20.5^^**	122.5±15.4	109.4±14.3‡	118.8±15.5
ДАН (mmHg)	84.5±9.8^^**	70.6±9.4	70.6±9.4‡	74.5±9.8
HbA1c (%)	8.9±2.1	9.2±1.9	9.6±1.3	-
ПГГ (mmol/l)	8.6±2.9**	7.9±2.1**	7.9±2.1**	5.1±0.4
ППГ (mmol/l)	8.8±3.5	12.7±4.5	9.8±4.1	-
ОХ (mmol/l)	5.4±1.1	5.9±1.9	5.6±1.4	5.3±0.9
HDL (mmol/l)	1.3±0.3^^	1.9±0.6†*	2.0±0.4‡**	1.3±0.6
LDL (mmol/l)	3.1±1.0	3.4±2.1	2.5±1.3	3.3±1.0
VLDL (mmol/l)	0.8±0.3^^	0.6±0.3	0.1±0.4‡*	0.7±0.5
ТГ (mmol/l)	1.8±0.8^^**	1.6±0.9	1.1±0.9‡	1.3±1.2
eGFR(ml/min/1.73 m^2)	96.4±22.5**	91.8±18.8	90.9±17.1	82.0±15.5
Hs-CRP (mg/l)	2.13±1.65**	0.98±0.91	1.57±1.56	0.92±1.27
IL-6 (pg/ml)	3.8±3.7^^**	3.8±4.9**	<1.50‡	<1.5

*p<0.05 спрямо контролите; **p<0.01 срямо контролите; †p<0.05 спрямо Ab-ЗД2; ‡ p<0.01 спрямо Ab-ЗД2; ^p<0.05 спрямо LADA; ^^p<0.01 спрямо LADA

При корелационния анализ между цитокините, hs-CRP и показателите за оценка на метаболитния риск сред участниците с отрицателни антитела се запази зависимостта между инфламаторните параметри и антропометричните показатели и артериалното налягане, които бяха регистрирани и при първоначалния анализ при ЗД2 (Таблица 8). За IL-6 обаче те се губят при лицата с новоустановени положителни антитела, но персистира зависимостта, касаеща hs-CRP (Таблица 14). Такива зависимости не се наблюдаваха при пациентите с LADA (Таблица 8).

Таблица 14. Корелационен анализ между инфламаторните параметри и клинични, антропометрични, липидни и гликемични показатели.

	Аб-ЗД2		**Аб+ЗД2**	
	IL-6	**hs-CRP**	**IL-6**	**hs-CRP**
ИТМ (kg/m^2)	**0.285****	**0.436****	0.393	**0.943****
ОТ (cm)	**0.293****	**0.476****	0.284	**0.799****
САН (mmHg)	**0.320****	0.156	0.331	0.390
ДАН (mmHg)	**0.256****	0.082	0.356	0.372
ОХ (mmol/l)	-0.104	-0.156	-0.556*	-0.287
HDL (mmol/l)	-0.048	-0.132	0.040	-0.517
LDL (mmol/l)	-0.108	**-0.224***	-0.521	0.150
VLDL (mmol/l)	-0.087	0.048	-0.167	0.000
ТГ (mmol/l)	-0.064	0.122	-0.139	0.036
HbA1c (%)	0.140	-0.020	-0.327	0.118
ПГГ (mmol/l)	0.151	0.112	0.274	0.437
ППГ (mmol/l)	0.142	0.037	-0.238	0.027

*p<0.05, **p<0.01

Сравнителният анализ на клиничните и метаболитни параметри, IL-6 и hs-CPR сред всички включени диабетици с положителни

антитела в зависимост от нивото (под или над 200 IU/ml) на антителата и броя на положителните такива показа по-ниска честота на метаболитния синдром, по-добри антропометрични, липидни показатели и контрол над артериалното налягане при наличието на по-високи стойности на GAD65A и присъствието на поне две позитивни антитела. Въпреки това статистическа значимост се регистрира само по отношение на диастолното артериално налягане и плазмената глюкоза според броя на антителата и по отношение на триглицеридите в зависимост от нивото на GAD65A. Hs-CRP се оказа по-ниско при наличието на едно антитяло и при ниско ниво на GAD65A, но разликата беше незначителна. IL-6 обаче беше по-висок при тези пациенти и то сигнификантно при лицата с ниско ниво на GAD65A спрямо тези с високо (Таблица 15).

Участниците с положително едно антитяло и концентрация над GAD65A по-ниска от 200 IU/ml се доближаваха метаболитно повече до пациентите с високи антитела и наличието на поне две положителни такива отколкото до диабетиците с отрицателни антитела (Таблица 15).

.

Таблица 15. Сравнителен анализ на показателите при диабетиците с положителни антитела в зависимост от броя антитела и нивото на GAD65A.

		Според нивото		Според броя положителни Ат	
	GAD65A /-/	**GAD65A<200IU /ml (n=18)**	**GAD65A>200IU/ ml (n=9)**	**1+Ат (n=21)**	**2 и повече + Ат (n=6)**
МС (%)	89.6	38.9*	11.1	33.3*	12.5
ИТМ (kg/m^2)	33.2±6.4	28.0±6.4*	24.0±3.0	26.8±6.4*	26.0±3.1
ОТ (cm)	104.4±14.0	94.4±16.5*	83.7 ±5.8	92.4±15.4*	85.2±10.2
САН (mmHg)	136.8±19.9	122.8±113.9*	113.9±16.9	121.7±15.4	113.3±12.1
ДАН (mmHg)	84.0±10.0	80.0±9.1	73.9±11.1	79.8±10.1	71.7±7.5^
HbA1c (%)	7.9±1.9	9.2±1.5*	9.1±1.4	9.1±1.5*	9.5±1.4
ПГГ (mmol/l)	7.8±2.7	9.1±4.0	7.6±2.1	9.3±1.5	9.5±1.4^
ППГ (mmol/l)	8.1±3.1	10.0±4.0*	10.9±4.0	11.4±3.3*	6.1±3.3^
ОХ (mmol/l)	5.2±1.1	5.5±1.6	5.1±1.0	5.4±1.3	5.0±1.8
HDL (mmol/l)	1.3±0.4	1.7±0.5*	1.9±0.6	1.7±0.6*	1.7±0.4
LDL (mmol/l)	3.0±0.9	2.8±1.5	2.5±1.2	2.9±1.4	2.0±0.9
VLDL (mmol/l)	0.8±0.3	0.7±0.5*	0.4±0.1	0.6±0.5*	0.4±0.1
ТГ (mmol/l)	1.9±1.0	1.7±1.1	0.8±0.2†	1.4±1.0*	1.4±0.9
Hs-CRP (mg/l)	3.66±2.33	1.29±1.35*	1.93±1.52	1.46±1.29*	1.70±1.91
IL-6 (pg/ml)	4.1±5.0	2.9±3.1	<1.5†	2.7±2.9	<1.5

*P<0.05 спрямо GAD65A отрицателни пациенти; †P<0.05 при сравнение с участниците с ниво на GAD65A<200IU/ml; ^p<0.05 спрямо участниците с едно антитяло

В обобщение, честотата на антитяло положителните пациенти в групата на ЗД2 бяха 10.16%, като 8.59% могат да бъдат посочени като LADA, съдейки по посочените критерии. Пациенти с положителни антитела в групата със ЗД2 се различаваха от участниците, при които предварително беше известно, че покриват критериите за LADA, само по контрола на артериалното налягане и VLDL холестерола. Спрямо антитяло отрицателните случаи те имаха значителни разлики по отношение на антропометрични и липидни показатели, но те бяха много по-малко на брой от показателите, по които лицата с LADA се различаваха от антитяло негативните случаи на ЗД2. Въпреки, че са метаболитно по-близки до LADA, пациентите със ЗД2, при които установихме положителни антитела, се характеризираха със стойности на IL-6 и hs-CRP по-близки до антитяло отрицателните диабетици. Корелационните зависимости между IL-6 и hs-CRP от една страна и показателите за оценка на метаболитния риск от друга бяха най-много при пациентите с отрицателни антитела, следвани от тези при антитяло положителните случаи на ЗД2 и единични при LADA.

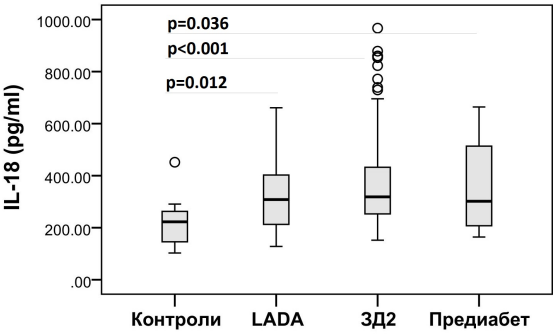
4.3 IL-18

В изследването бяха включени 76 души със ЗД2 и 24 пациента с LADA, 26 участника с предиабет, както и 14 контроли. Характеристиките на изследваните лица са обобщени в таблица 16.

Таблица 16. Характеристики на пациентите, при които е изследван IL-18.

	ЗД2 (n=76)	**LADA (n=24)**	**Предиабет (n=26)**	**Контроли (n=14)**
Възраст (г)	53.8±7.1	52.6±7.7	49.7±9.6	53.2±4.0
Пол (ж/м)	43/33*	16/8	21/5†	13/1†
Давност на ЗД (г)	4.4±3.1	3.4±2.3	-	-
Акт. пушач (%)	46.1	33.3	34.6	64.3
МС (%)	88.2*^	25.0†	65.4**†^	0.0‡
ИТМ (kg/m2)	33.1±6.6*^	26.0±5.1*†	34.6±5.7*^	21.7±1.9†^
ОТ (cm)	103.6±13.8*^	88.8±13.6*†	104.4±10.5*^	77.4±8.1†^
САН (mmHg)	136.3±19.4*^	117.1±13.3*†	133.9±16.8*^	109.3±10.0†^
ДАН (mmHg)	84.3±10.1*^	76.0±8.7†	83.1±8.8*^	70.7±8.3†
ПГГ (mmol/l)	8.2±2.9*	8.2±3.1*	5.6±0.7*†^	5.0±0.4†^
ППГ (mmol/l)	8.4±3.2^	10.4±4.1†	-	-
HbA1c (%)	7.9±2.0^	9.2±1.4†	-	-
ОХ (mmol/l)	5.2±1.1	5.4±1.5	5.3±1.4	4.9±0.7
LDL (mmol/l)	3.0±0.8	2.7±1.4	3.3±1.0	2.2±0.9
HDL (mmol/l)	1.3±0.3^	1.7±0.5†	1.2±0.3^	1.7±0.7
ТГ (mmol/l)	1.8±1.0*^	1.5±1.0†	1.8±0.8*^	1.1±1.1†
СУЕ (mm/h)	10.2±6.5**	7.1±5.8**	9.4±5.3^	5.0±3.2‡^^
hs-CRP (mg/l)	2.60±1.70*^	1.29±1.20†	1.96±1.75*	0.79±1.04†
IL-6 (pg/ml)	4.8±5.8*^	1.8±1.0†	2.21±1.9†	1.57±0.3†
IL-18 (pg/ml)	389.0±203.4*	327.0±144.5*	354.8±174.2*	219.9±91.0†^
*p<0.05 спрямо контроли; †p<0.05 спрямо ЗД2; ^p<0.05 спрямо LADA				

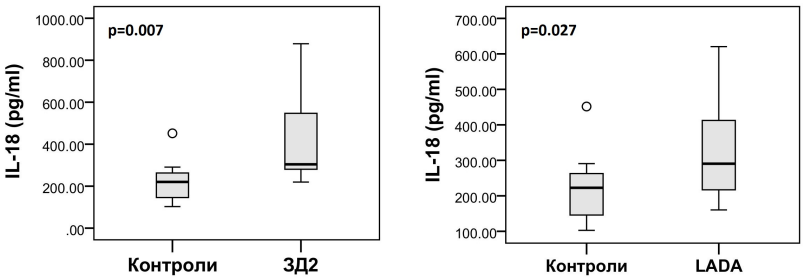
Установихме, че нивото на IL-18 е значително по-високо сред пациенти със ЗД2, LADA и предиабет спрямо контролите (Фигура 4).



Фигура 4. Ниво на IL-18 при анализираните групи.

Това наблюдение персистираше и при оценка на показателите при сравними по ИТМ случаи на ЗД2 (n = 10) и контроли (n = 13) (ИТМ = 22.5±1.1 срещу 21.5±1.7 kg/m^2, p=0.147; обиколка на талията = 82.2±7.9 срещу 77.8±8.3 cm, p = 0.50) – нивото на IL-18 остана по-високо при първата група (430.9±224.9 срещу 218.7±94.6 pg/ml) (Фигура 5).

Потвърждение на тази констелация наблюдавахме и при пациентите с LADA (n = 14) спрямо контролите (n = 14) когато антропометричните им показатели не се различаваха значително (ИТМ = 22.6±2.4 срещу 21.7±1.9 kg/m^2, p = 0.214, Обиколка на талията = 83.2±8.2 срещу 77.4±8.1 cm, p=0.054) – нивото на IL-18 остана по-високо при диабетиците (IL-18 = 326.4±134.7 срещу 219.9±91.0 pg/ml) (Фигура 5). Такова сравнение между контроли и предиабет не се осъществи поради високия ИТМ при последните.



Фигура 5. IL-18 при сравними по ИТМ пациенти и контроли.

Между двете диабетни групи не констатирахме значителна разлика (Фигура 4). Анализът беше проведен и при сравними по ИТМ пациенти, които не се различаваха и по отношение на гликемичния контрол, но въпреки това честотата на метаболитния синдром остана по-висока при ЗД2. Концентрацията на интерлевкина беше по-висока при ЗД2, но без статистическо значение (Таблица 17).

Таблица 17. Анализ между сравними по ИТМ пациенти със ЗД2 и LADA.

	ЗД2 (n=28)	LADA (n=20)	*P*
Възраст (г)	54.5±8.3	52.4±7.8	0.402
Пол (ж/м)	14/14	14/6	0.166
Давност на ЗД (г)	4.2±4.0	3.5±2.4	0.983
МС (%)	67.9	15.0	<0.001
ИТМ (kg/m2)	26.3±3.0	24.4±3.4	0.055
ОТ (cm)	92.3±8.7	85.2±8.9	0.013
САН (mmHg)	133.6±18.2	115.5±13.5	0.001
ДАН (mmHg)	83.2±10.9	75.3±8.8	0.013
ПГГ (mmol/l)	9.1±3.4	7.9±3.2	0.188
ППГ (mmol/l)	9.4±3.4	10.2±4.3	0.638
HbA1c (%)	8.7±2.2	5.3±1.4	0.228
ОХ (mmol/l)	5.3±1.2	5.3±1.3	0.788
LDL (mmol/l)	2.9±1.0	2.6±1.2	0.500
HDL (mmol/l)	1.3±0.4	1.8±0.5	0.002
ТГ (mmol/l)	1.7±0.8	1.2±0.7	0.006
hs-CRP (mg/l)	1.97±1.66	1.17±1.25	0.125
IL-6 (pg/ml)	4.4±5.1	1.6±0.3	0.002
IL-18 (pg/ml)	403.5±226.3	329.3±146.3	0.391

Нивото на IL-18 в групата с предиабет не се отличаваше значително спрямо това при ЗД2 на фона на сравними антропометрични показатели между двете групи (Фигура 4). Не се различаваше и спрямо лицата с LADA (фигура 4), но на фона на по-неблагоприятни антропометрични показатели (Таблица 16).

Корелационният анализ, касаещ IL-18 и антропометрични, метаболитни и инфламаторни показатели, е отразен в таблица 18. При него се установиха значителни зависимости, касаещи нивото на IL-18 и показатели, използвани

като критерии за оценка на метаболитния синдром според IDF, когато анализът се осъществи в цялата популация. Наблюдаваха се и положителни корелации с нивото на IL-6 и hs-CRP. Някои от тях се потвърдиха и сред показателите за оценка на гликемичния и липиден контрол, в рамките на изследваните със ЗД2. Сред антропометричните параметри установихме положителна корелация само с обиколката на талията при предиабетната група. Положителните корелционни зависимости между IL-18 и IL-6 и hs-CRP се потвърдиха и при ЗД2, но не и в останалите групи участници (Таблица 18).

Таблица 18. Корелационен анализ между IL-18 и клинични, метаболитни и инфламаторни показатели.

	Всички	**ЗД2 (n=76)**	**LADA (n=24)**	**Предиабет (n=26)**	**Контроли (n=14)**
ИТМ (kg/m2)	**0.236****	0.015	0.210	0.351	0.004
ОТ (cm)	**0.305****	0.073	0.297	**0.405***	0.064
САН (mmHg)	**0.196***	-0.037	0.289	0.041	0.527
ДАН (mmHg)	0.059	-0.094	0.133	-0.342	0.507
ПГГ (mmol/l)	**0.209***	0.075	-0.098	0.286	0.483
ППГ (mmol/l)	0.069	**0.244***	0.027	-0.349#	-
HbA1c (%)	-0.024	0.007	0.168	-	-
LDL (mmol/l)	-0.028	-0.141	0.134	-0.002	-0.500
HDL (mmol/l)	**-0.355****	**-0.377****	-0.392	-0.190	0.500
ТГ (mmol/l)	**0.185***	0.072	0.301	-0.106	-0.172
hs-CRP (mg/l)	**0.421****	**0.427****	0.832	0.345	0.164
IL-6 (pg/ml)	**0.270****	**0.398****	0.541	-0.067	-0.241

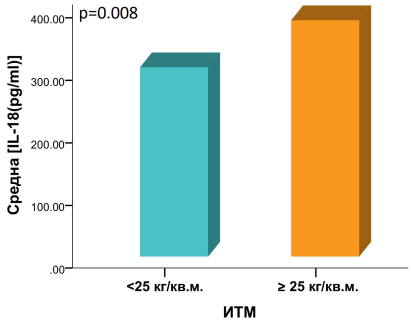
*p<0.05; **p<0.01; # плазмена глюкоза на 120-та мин от ОГТТ

Описаните корелации с IL-6 и hs-CRP при ЗД2 персистират и при пациентите, селектирани за анализ между участници със сравним ИТМ (Таблица 19). Описаните зависимости не се потвърждават при контролната група и групата с LADA (Таблици 18 и 19), където и честотата на метаболитния синдром е сигнификантно по-ниска (Таблици 16 и 17).

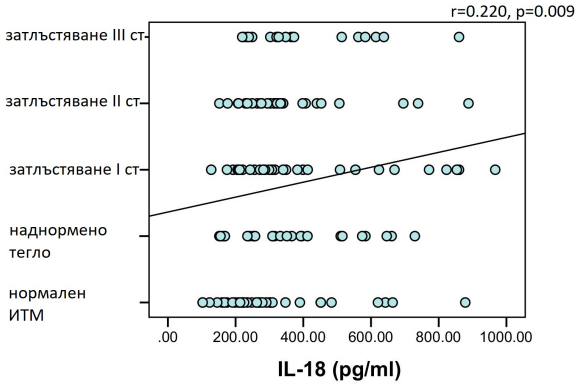
Таблица 19. Корелационен анализ между IL-18 и клинични, метаболитни и инфламаторни показатели при сравними по ИТМ лица.

	ЗД2 (n=28)	**LADA (n=20)**
ИТМ (kg/m2)	0.240	0.328
ОТ (cm)	0.219	0.379
САН (mmHg)	0.172	0.228
ДАН (mmHg)	0.080	0.067
ПГГ (mmol/l)	0.152	-0.261
ППГ (mmol/l)	0.290	-0.001
HbA1c (%)	0.059	0.157
LDL (mmol/l)	-0.099	0.059
HDL (mmol/l)	**-0.464***	-0.412
ТГ (mmol/l)	0.044	0.281
hs-CRP (mg/l)	**0.493***	0.128
IL-6 (pg/ml)	**0.408***	0.020
*p<0.05		

Въпреки, че не се установи корелация между нивото на IL-18 и ИТМ, то концентрацията на цитокина значително се различаваше между участниците с ИТМ<25 кг/м^2 и тези чийто ИТМ беше над тази стойност (Фигура 6). Нивото на IL-18 показва тенденция към нарастване в зависимост от тежестта на отклоненията в контрола на теглото, като корелираше положително с нарастването на степента на затлъстяване (фигура 7).



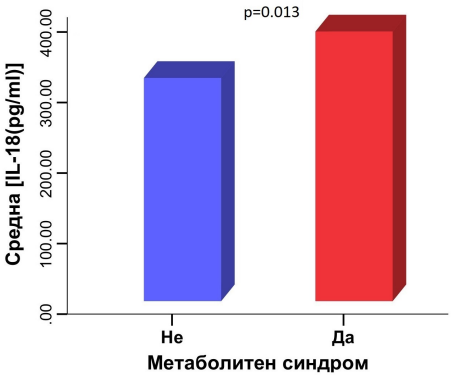
Фигура 6. IL-18 при нормален и повишен ИТМ при всички участници.



Фигура 7. Нивото на IL-18 корелира положително с нарастване степента на отклонения в ИТМ.

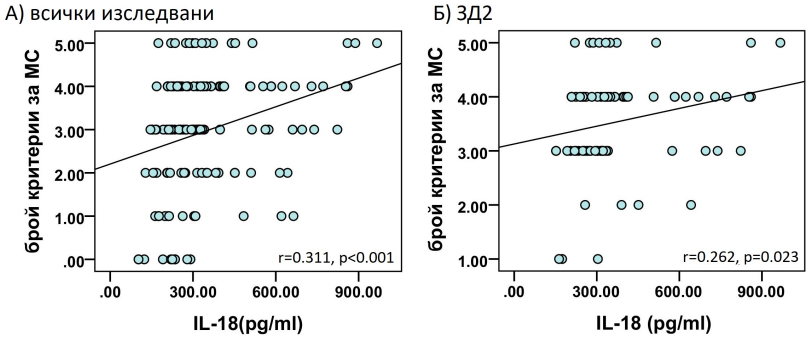
Предвид наблюдаваните зависимости между IL-18 и показатели, използвани в оценката на метаболитния риск, сравнихме нивото на интерлевкина в цялата изследвана популация в зависимост от наличието на

метаболитен синдром. То беше значително по-високо в негово присъствие (Фигура 8).



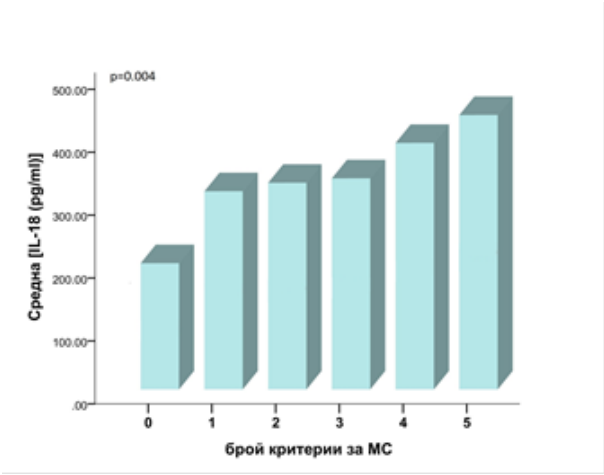
Фигура 8. Ниво на IL-18 в зависимост от наличието на метаболитен синдром.

Концентрацията на IL-18 в серума корелираше положително с броя на критериите за диагностицирането на синдрома – както в общата популация, така и в рамките на ЗД2 (Фигура 9).



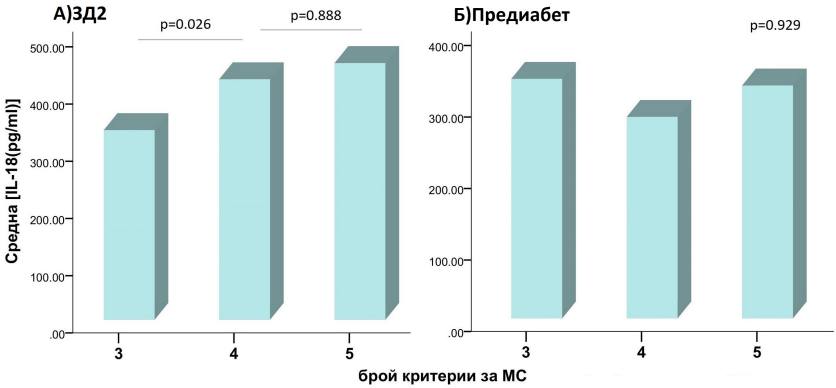
Фигура 9. Зависимост между броя на критерии за МС и нивото на IL-18.

Още едно наблюдение, подкрепящо мястото на нивото на IL-18 при метаболитния синдром сред анализираните лица, е покачващото му се ниво в зависимост от броя на критериите за констатирането на синдрома, които покриват пациентите (Фигура 10).

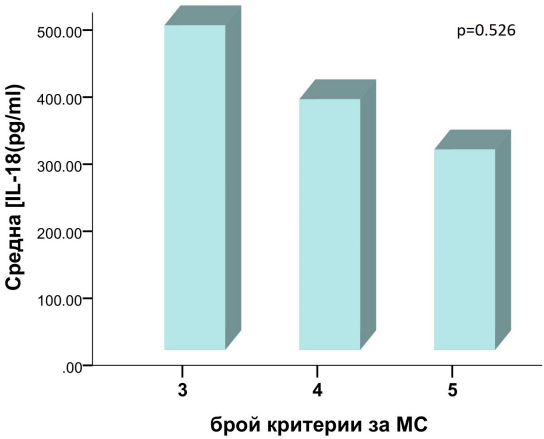


Фигура 10. Ниво на IL-18 в зависимост от броя критерии за метаболитен синдром.

Тенденцията беше ясно наблюдавана при участниците със ЗД2 (фигура 11А), докато при предиабет не констатирахме сигнификантна разлика (фигура 11Б). При участниците с LADA се проследи обратното явление, макар и без статистическа значимост (фигура 12), което потвърждава липсата на асоциация на IL-18 с метаболитните промени при тези лица.

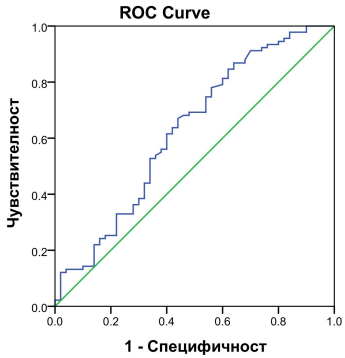


Фигура 11. Ниво на IL-18 според брой критерии за МС при пациентите със ЗД2 и предиабет.



Фигура 12. Ниво на IL-18 според брой критерии за МС при пациентите с LADA.

Генерирана беше Receiver Operating Characteristic curve (ROC крива) за оценка на стойността на IL-18 като предиктор за метаболитен синдром в обхванатата популация (Фигура 13). От площта под кривата се установи слаба, но сигнификантна предиктивна стойност на нивото на интерлевкина (Таблица 20). Най-добра прагова стойност беше IL-18 = 296.5 pg/ml с 60% специфичност и 60% чувствителност.



Фигура 13. ROC крива за нивото на IL-18 като предиктор за метаболитния синдром.

Таблица 20. ROC анализ за предиктивната способност на IL-18 в разграничаването на метаболитен синдром.

AUC	Ст. грешка	*p*	95% доверителен интервал	
			Долна граница	Горна граница
0.627	0.051	0.013	0.527	0.727

AUC – area under the curve, площ под кривата

Серумното ниво на IL-18 не се различаваше значително в зависимост от наличието на ДПНП и ДРП при лицата със ЗД2 и в рамките всички изследвани диабетици при сравнима давност на ЗД, възраст и актуален

гликемичен контрол с изключение на по-дълга давност на заболяването при диабетиците с ДПНП. Нивото на IL-18 не корелираше с изчислената гломерулна филтрация нито при ЗД2 ($r = -0.187$, $p = 0.106$), нито при всички диабетици ($r = -0.142$, $p = 0.159$) или в рамките на цялата изследвана популация ($r = -0.082$, $p = 0.342$).

В обобщение, концентрацията на IL-18 в серума беше значително по-висока при всички групи с отклонение от гликмичния контрол спрямо контролните участници. Тя беше по-висока при лица с наднормено тегло и затлъстяване, както и при участници с метаболитен синдром. Установи се положителна корелационна зависимост с броя критерии за диагностиране на синдрома, както и с всеки от показателите, използван като критерий (отрицателна за HDL-холестерол) при ЗД2, но не и в останалите групи. Въпреки, че серумното ниво на IL-18 беше повишено и при LADA спрямо контролните участници, не се установи асоциация на интерлевкина с метаболитния синдром при тези лица.

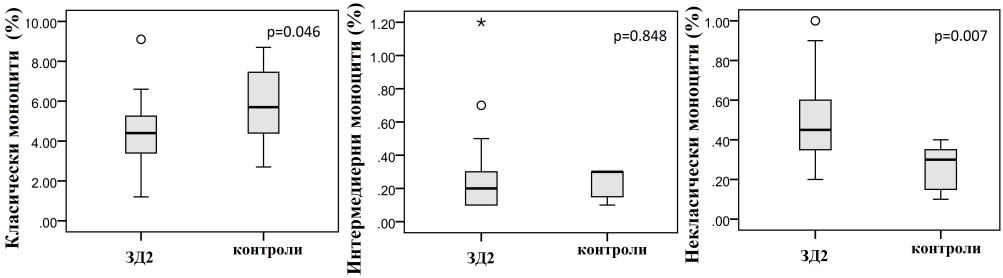
4.4 Повърхностна експресия на периферни моноцити

Клиничните характеристики на участниците, при които се проведе флоуцитометрия, са отразени в таблица 21. Въпреки, че пациентите със ЗД2 имаха статистически по-високо ниво на общите моноцити, като процент от белия кръвен ред те не се различаваха статистически. Диабетиците имаха по-неблагоприятен метаболитен профил от контролите (ИТМ, Обиколка на талията, артериално налягане, триглицериди), както и по-висок hs-CRP.

Таблица 21. Клинични, метаболитни и инфламаторни характеристики при участниците, при които се проведе флоуцитометрия.

	ЗД2 (n=28)	Контроли (n=7)	*P*
Пол (ж/м)	18 /10	6 /1	0.392
Възраст (г)	54.1±6.5	52.3±3.6	0.494
Давност на ЗД (г)	4.7±3.4	-	-
WBC (10^9/l)	7.9±1.7	6.0 ± 0.9	0.007
Моноцити (10^9/l)	0.5±0.2	0.4±0.1	0.707
Моноцити (%)	6.3±2.2	5.4±2.7	0.206
СУЕ (mm/h)	9.2±5.2	3.5±2.4	0.020
ИТМ (kg/m^2)	34.1±6.8	21.1±1.9	0.000
ОТ (cm)	106.7±16.0	79.6±7.5	0.000
САН (mmHg)	133.2±15.7	111.4±10.7	0.001
ДАН (mmHg)	82.5±7.5	72.9±7.6	0.007
ПГГ (mmol/l)	7.6±2.8	4.9±0.5	0.003
ППГ (mmol/l)	7.8±3.4	-	-
HbA1c (%)	7.8±1.6	-	-
ОХ (mmol/l)	5.2±1.3	5.1±0.4	0.885
LDL (mmol/l)	3.0±1.3	2.5±0.9	0.445
HDL (mmol/l)	1.3±0.4	1.6±0.5	0.204
VLDL (mmol/l)	0.9±0.4	0.9±0.9	0.947
ТГ (mmol/l)	2.0±0.8	1.5±1.5	0.041
Hs-CRP (mg/l)	2.72±2.30	0.36±0.50	0.001
IL-6 (pg/ml)	3.0±2.9	1.6±0.4	0.140
TNFα (pg/ml)	13.7±17.8	11.3±5.0	0.563
IL-18 (pg/ml)	295.6±142.5	236.1±124.5	0.299

Въз основа на експресията на CD14 и CD16 моноцитите бяха разделени на класически (CD14++CD16-), интермедиерни (CD14++CD16+) и некласически (CD14+CD16++). Разликата в нивото им, изразено в процент от белия кръвен ред, е отразена на фигура 14. Наблюдавахме значително по-ниско ниво на класическите моноцити в периферната циркулация при ЗД2 спрямо контролите (4.36±1.54 срещу 5.83±2.21%) докато при некласическите констелацията беше противоположна (0.47±0.20 срещу 0.26±0.13%). При междинния подтип не констатирахме значителна разлика (0.29±0.23 срещу 0.23±0.10%) (Фигура 14).



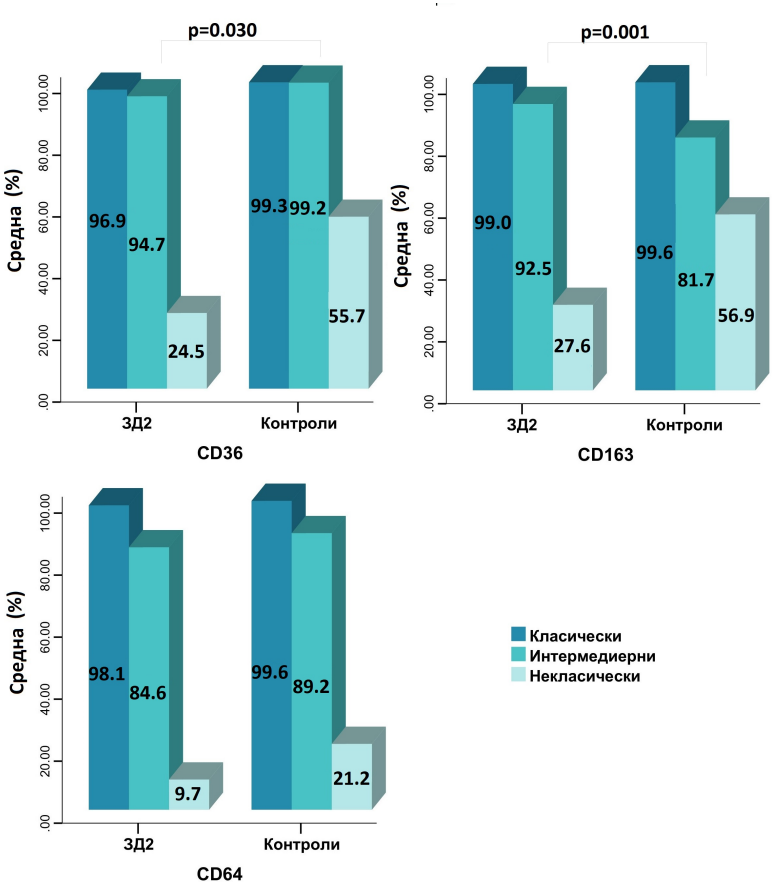
Фигура 14. Сравнителен анализ между моноцитните подтипове при участниците.

Корелационният анализ между процента моноцити от всеки подтип и WBC и общия моноцитен брой не показа наличието на корелация сред диабетиците. Такава не беше установена и при анализирането на моноцитите и изследваните антропометрични и метаболитни показатели (Таблица 22).

Таблица 22. Корелационен анализ с процент моноцити от всеки подтип при ЗД2.

	Моноцитни подтипове					
	Класически (%)		Интермедиерни (%)		Некласически (%)	
	r	*p*	*r*	*p*	*r*	*p*
WBC(10^9/l)	0.081	0.690	0.317	0.107	-0.291	0.141
Моноцити (10^9/l)	0.341	0.088	0.359	0.072	0.297	0.141
Моноцити (%)	0.044	0.830	0.137	0.505	0.357	0.073
СУЕ (mm/h)	-0.215	0.302	0.088	0.676	0.125	0.551
ИТМ (kg/m^2)	-0.076	0.699	0.108	0.584	0.026	0.894
ОТ (cm)	-0.029	0.885	0.132	0.504	0.078	0.693
ОХ (mmol/l)	-0.282	0.145	-0.061	0.757	-0.234	0.231
HDL (mmol/l)	0.000	0.999	-0.076	0.699	-0.054	0.787
LDL (mmol/l)	-0.272	0.162	-0.164	0.405	-0.217	0.266
ТГ (mmol/l)	-0.104	0.600	0.161	0.414	-0.064	0.747
HbA1c (%)	-0.195	0.321	-0.243	0.213	-0.259	0.184
ПГГ (mmol/l)	0.072	0.720	-0.007	0.971	-0.028	0889
ППГ (mmol/l)	-0.036	0.857	-0.083	0.674	-0.164	0.403
Hs-CRP (mg/l)	0.062	0.767	0.216	0.301	-0.054	0.796
IL-6 (pg/ml)	0.091	0.645	0.366	0.056	-0.084	0.671
TNFα (pg/ml)	0.036	0.866	-0.029	0.893	0.131	0.543
IL-18 (pg/ml)	-0.111	0.572	-0.110	0.579	-0.097	0.624

Резултатите от изследването на експресията на CD36, CD163 и CD64 са представени на Фигура 15.



Фигура 15. Сравнителен анализ между повърхностната експресия на анализираните моноцитни маркери в отделните подтипове моноцити.

Въпреки, че интермедиерният подтип моноцити не се различава статистически между диабетиците и контролните участници, именно там констатирахме статистическа значимост при сравнението на резултатите. При лица със ЗД2 експресията на CD36 в този подтип е понижена, докато

тази на CD163 е повишена. В останалите подтипове разликата не беше от статистическо значение (Фигура 15).

Проведе се и корелационен анализ между повърхностно експресираните моноцитни маркери. Наблюдавахме силни корелации в експресията между отделните подтипове за всеки от маркерите CD36, CD163 и CD64, което не се потвърди при контролите. Експресията на CD163 корелира положително с тази на CD36 при некласическите и отрицателно с CD64 при класическите и некласическите моноцити – наблюдения, които също не потвърдихме при контролите. Обратно – при последните се констатира силна положителна корелация между експресията на CD36 и CD64, засягаща всички подтипове, която се губи сред диабетиците (Таблици 23 и 24).

Относно експресираните маркери и метаболитни и инфламаторни показатели корелационният анализ установи зависимост между HbA1c и повърхностната експресия на CD64 от некласически моноцити (Таблица 25).

В обобщение, експресията на CD36 беше понижена само при интемедиерния подтип моноцити, а тази на CD163 повишена в същия при пациентите със ЗД2. Експресията на трите рецептора (CD36, CD163, CD64) беше в положителна корелационна заивисмост между отделните подтипове само сред диабетиците, но не и при контролите. Не установихме асоциация между експресията на рецепторите и метаболитния контрол, нито концентрацията на hs-CRP, IL-6, IL18, TNFα.

Таблица 23. Корелационен анализ между повърхностата експресия на CD36, CD163, CD64 при ЗД2.

	Класически (%)			Интермедиерни (%)			Некласически (%)		
	CD36	**CD163**	**CD64**	**CD36**	**CD163**	**CD64**	**CD36**	**CD163**	**CD64**
Класически (%)									
CD36	-	-0.199	-0.167	0.739**	-0.043	-0.110	0.490**	0.136	-0.030
CD163	-0.199	-	-0.375*	-0.149	0.560**	-0.284	0.055	0.278	-0.382*
CD64	-0.167	-0.375*	-	-0.040	-0.238	0.800**	-0.209	-0.260	0.639**
Интермедиерни (%)									
CD36	0.739**	-0.149	-0.040	-	0.240	0.139	0.623**	0.223	0.096
CD163	-0.043	0.560**	-0.238	0.240	-	0.113	0.192	0.569**	-0.077
CD64	-0.110	-0.284	0.800**	0.139	0.113	-	-0.099	-0.056	0.677**
Некласически (%)									
CD36	0.490**	0.55	-0.209	0.623**	0.192	-0.099	-	0.599**	0.026
CD163	0.136	0.278	-0.260	0.223	0.569**	-0.056	0.599**	-	0.166
CD64	-0.030	-0.382*	0.639**	0.096	-0.077	0.677**	0.026	0.166	-

*p<0.05, **p<0.01

Таблица 24. Корелационен анализ между повърхностата експресия на CD36, CD163, CD64 при контроли.

	Класически (%)			Интермедиерни (%)			Некласически (%)		
	CD36	**CD163**	**CD64**	**CD36**	**CD163**	**CD64**	**CD36**	**CD163**	**CD64**
Класически (%)									
CD36	-	-0.148	0.846*	0.416	-0.111	0.778*	0.400	-0.316	0.482
CD163	-0.148	-	-0.371	-0.223	0.000	0.179	0.754	0.800	0.571
CD64	0.846*	-0.371	-	0.046	0.111	0.630	0.092	-0.632	0.334
Интермедиерни (%)									
CD36	0.416	-0.223	0.046	-	-0.045	-0.045	0.189	0.316	-0.134
CD163	-0.111	0.000	0.111	-0.045	-	-0.500	0.116	0.000	0.107
CD64	0.778*	0.179	0.630	-0.045	-0.500	-	0.261	-0.800	0.571
Некласически (%)									
CD36	0.400	0.754	0.092	0.189	0.116	0.261	-	0.632	0.928**
CD163	-0.316	0.800	-0.632	0.316	0.000	-0.800	0.632	-	0.400
CD64	0.482	0.571	0.334	-0.134	0.107	0.571	0.928**	0.400	-

*p<0.05, **p<0.01

Таблица 25. Корелационен анализ с повърхностно експресирани моноцитни маркери при пациенти със ЗД2.

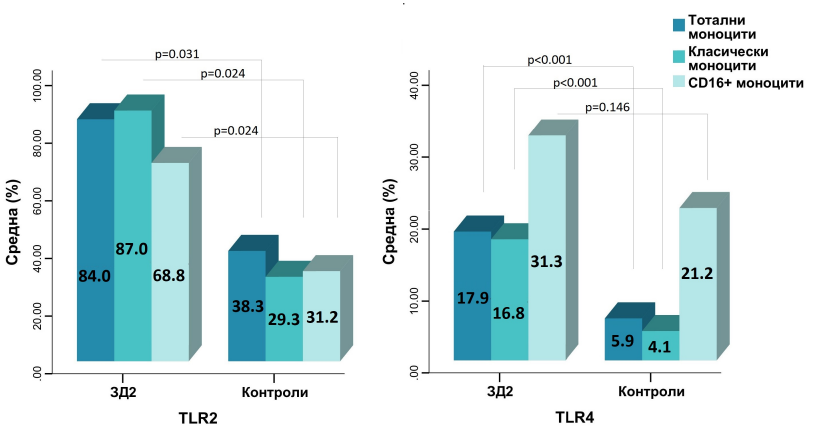
	Класически (%)			Интермедиерни (%)			Некласически (%)		
	CD36	**CD163**	**CD64**	**CD36**	**CD163**	**CD64**	**CD36**	**CD163**	**CD64**
ИТМ (kg/m^2)	0.237	-0.338	-0.012	0.234	-0.147	0.041	-0.234	-0.326	0.095
ОТ (cm)	0.255	-0.367	0.008	0.199	-0.047	0.181	-0.111	-0.304	0.162
ОХ (mmol/l)	-0.106	0.100	0.001	0.600	-0.120	0.143	-0.274	-0.263	0.044
HDL (mmol/l)	0.064	0.001	-0.113	0.750	-0.085	-0.130	-0.008	-0.117	-0.131
LDL (mmol/l)	-0.224	0.098	0.127	0.261	-0.043	0.216	-0.278	-0.226	0.040
TG (mmol/l)	0.021	0.083	-0.004	0.918	0.024	0.164	-0.162	0.046	0.185
HbA1c (%)	-0.152	0.313	-0.275	0.449	0.080	-0.336	0.101	0.129	-0.392*
ПГГ (mmol/l)	-0.116	0.172	-0.059	0.572	0.248	0.130	-0.022	0.236	0.130
ППГ (mmol/l)	-0.060	-0.024	-0.040	0.766	-0.037	0.101	-0.158	0.060	0.066
СУЕ (mm/h)	0.064	-0.203	0.040	-0.163	-0.380	-0.083	-0.039	-0.352	-0.163
Hs-CRP (mg/l)	0.014	-0.263	0.355	0.946	-0.258	0.299	-0.074	-0.094	0.240
IL-6 (pg/ml)	0.148	-0.221	0.056	0.461	0.221	0.031	-0.112	0.117	0.179
IL-18 (pg/ml)	-0.228	0.271	-0.063	-0.204	0.211	-0.064	0.139	0.147	-0.085
TNFα (pg/ml)	0.061	-0.050	0.187	0.762	0.161	0.139	0.162	0.145	-0.038

*p<0.05

4.5 Изследване на TLR2 и TLR4

4.5.1 Повърхностна експресия на TLR2 и TLR4 върху моноцити

Повърхностната експресия на TLR2 и TLR4 беше оценена върху тоталните, класически и CD16+ моноцити. Изследваните пациенти са същите, при които оценихме експресията и на останалите моноцитни маркери (Таблица 20). Резултатите, представени в процент от съответната популация моноцити, са обобщени на Фигура 16.



Фигура 16. Повърхностна експресия на TLR2 и TLR4.

Корелационният анализ между самите TLR при ЗД2 показа ясна корелация между експресията на всеки от тях в различните моноцитни популации, което се наблюдва само в отделни елементи от анализа при контролите. За разлика от контролната група обаче, при ЗД2 не констатирахме корелация между експресията на двата вида рецептори (Таблици 26 и 27). Корелационният анализ между експресията на TLR2 и TLR4 с останалите изследвани моноцитни маркери (CD36, CD163, C64) при ЗД2 показа тенденция към отрицателна корелация между експресията на CD163 и тази на TLR2

и положителна корелация между експресията на CD64 и TLR2 (Таблица 28).

Таблица 26. Корелационен анализ между експресията на TLR2 и TLR4 при ЗД2.

	Тотални моноцити (%)		**Класически моноцити (%)**		**CD16+ моноцити (%)**	
	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4
Тотални (%)						
TLR2	-	-0.153	0.860**	-0.187	0.543**	-0.023
TLR4	-0.153	-	-0.212	0.933**	0.165	0.663**
Класически (%)						
TLR2	0.860**	-0.212	-	-0.190	0.361	-0.092
TLR4	-0.187	0.933**	-0.190	-	0.109	0.641**
CD16+ (%)						
TLR2	0.543**	0.165	0.361	0.109	-	0.207
TLR4	-0.023	0.663**	-0.092	0.641**	0.207	-

*P< 0.05; ** P< 0.01 level.

Таблица 27. Корелационен анализ между експресията на TLR2 и TLR4 при контроли.

	Тотални моноцити (%)		Класически моноцити (%)		CD16+ моноцити (%)	
	TLR2	**TLR4**	**TLR2**	**TLR4**	**TLR2**	**TLR4**
Тотални (%)						
TLR2	-	0.000	0.300	0.100	0.000	0.600
TLR4	0.000	-	0.700	0.900*	1.0**	-0.600
Класически (%)						
TLR2	0.300	0.700	-	0.900*	0.700	-0.100
TLR4	0.100	0.900*	0.900*	-	0.900*	-0.500
CD16+ (%)						
TLR2	0.000	1.0**	0.700	0.900*	-	-0.600
TLR4	0.600	-0.600	-0.100	-0.500	-0.600	-

*P< 0.05; ** P< 0.01 level.

Таблица 28. Корелационен анализ между повърхностно експресирани маркери при ЗД2.

	Тотални моноцити (%)		**Класически моноцити (%)**		**CD16+ моноцити (%)**	
	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4
Класически (%)						
CD36	-0.012	0.022	-0.178	-0.078	-0.154	-0.055
CD163	**-0.477***	0.155	**-0.379***	0.216	-0.342	0.023
CD64	**0.503***	-0.020	**0.438***	-0.066	**0.435***	0.130
Интермедиерни (%)						
CD36	-0.229	-0.181	-0.379	-0.197	-0.346	-0.198
CD163	**-0.456***	0.177	**-0.399***	0.226	**-0.509****	0.068
CD64	0.285	0.112	0.122	0.084	**0.397***	0.267
Некласически (%)						
CD36	-0.179	-0.321	-0.355	-0.318	-0.324	-0.335
CD163	**-0.374***	0.018	**-0.378***	-0.036	**-0.400***	0.013
CD64	0.209	-0.182	0.134	-0.262	0.337	0.090

*P< 0.05; ** P< 0.01 level.

Корелационният анализ между повърхностната експресия на TLR2 и TLR4 и метаболитните и инфламаторни показатели показа положителна корелация на TLR4 с антропометричните показатели (ИТМ и обиколка на талията) и гликемичния контрол (HbA1c, ПГГ, ППГ). За TLR2 такива се констатираха за липидните показатели – общ и LDL холестерол. Само TLR2 обаче корелира положително с hs-CRP (Таблица 29).

Таблица 29. Корелационен анализ между повърхностната експресия на TLR и метаболитни и инфламаторни показатели при ЗД2.

	Тотални моноцити (%)		**Класически моноцити (%)**		**CD16+ моноцити (%)**	
	TLR2	**TLR4**	**TLR2**	**TLR4**	**TLR2**	**TLR4**
ИТМ (kg/m^2)	0.003	**0.417***	-0.096	0.272	0.328	0.369
ОТ (cm)	-0.143	**0.486****	-0.285	**0.379***	0.279	**0.390***
ОХ (mmol/l)	0.206	0.166	0.134	0.220	**0.410***	0.165
HDL (mmol/l)	0.187	-0.086	0.152	-0.135	0.055	-0.238
LDL (mmol/l)	0.270	0.147	0.197	0.224	**0.440***	0.204
ТГ (mmol/l)	-0.138	0.184	-0.112	0.213	-0.020	0.277
HbA1c (%)	-0.226	0.249	-0.103	**0.433***	-0.315	0.029
ПГГ (mmol/l)	-0.302	0.372	-0.226	**0.538****	-0.028	0.285
ППГ (mmol/l)	-0.020	**0.377***	-0.051	**0.526***	0.271	0.285
Hs-CRP (mg/l)	0.121	0.234	0.094	0.207	**0.431***	0.292
IL-6 (pg/ml)	0.010	0.327	-0.127	0.181	0.294	0.270
IL-18 (pg/ml)	-0.303	0.168	-0.113	0.258	-0.305	-0.006
TNFα (pg/ml)	0.039	-0.280	-0.033	-0.323	-0.135	-0.230
СУЕ (mm/h)	0.372	0.188	0.315	0.213	0.365	0.139

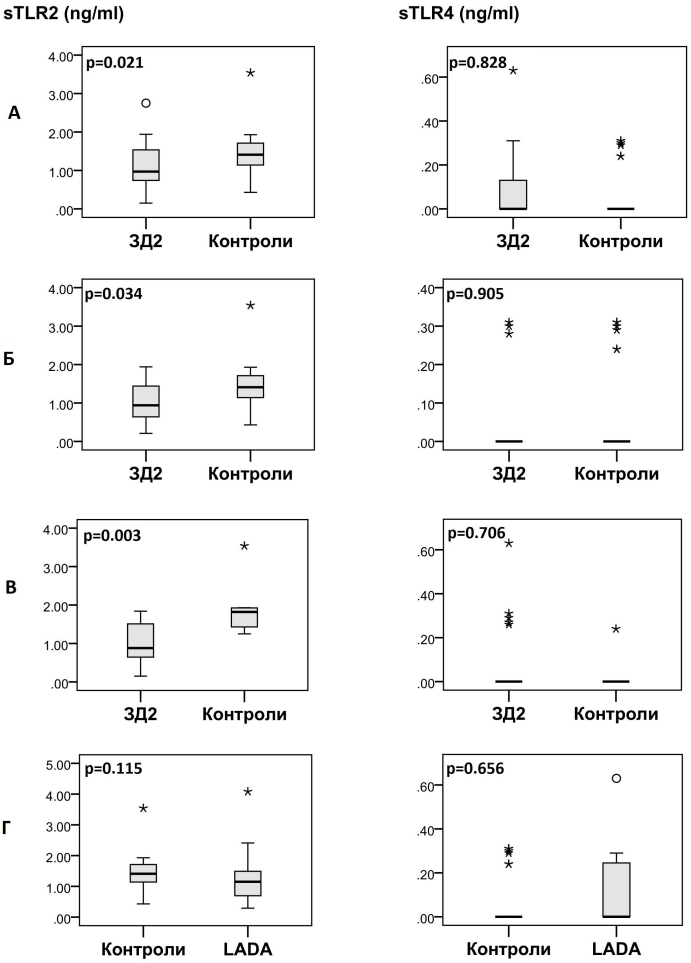
*p<0.05; p<0.01

4.5.2. Разтворими TLR2 и TLR4

Разтворимите фракции на TLR бяха анализирани при 47 души със ЗД2, 16 души с LADA и 25 контроли. Констатирахме значително по-ниско ниво на sTLR2 сред лицата със ЗД2 спрямо контролите, докато нивото на sTLR4 беше без сигнификантна разлика (Фигура 17А). Тази разлика е констатирана на фона на по-лош метаболитен профил при диабетиците спрямо контролните участници и анализът беше повторен и при сравними по ИТМ участници от двете групи (Таблица 30). При сравним ИТМ, но все още по-висока честота на метаболитния синдром, резултатите, касаещи sTLR2 и sTLR4, бяха потвърдени (Фигура 17Б).

Сравняването им сред лицата, при които беше изследвана и повърхностната експресия на рецепторите, отново показа по-ниско серумно ниво на разтворимата фракция на първия, въпреки по-високия процент TLR2+ моноцити при диабетици (Фигура 17В).

При лицата с положителни GAD65A нивото на рецепторите остана без значителна разлика спрямо контролите (Фигура 17Г). При тях то не се различаваше и спрямо лицата с отрицателни антитела – sTLR2 = 1.11±0.52 срещу 1.27±0.93 ng/m, p = 0.819 съответно за ЗД2 и LADA и sTLR4 = 0.082±0.15 срещу 0.11±0.18 ng/ml, p = 0.856.



Фигура 17. Сравнителен анализ на нивото на sTLR2 и sTLR4.

Таблица 30. Характеристики на пациентите, при които анализирахме sTLR.

	ЗД2 (n=47)	ЗД2# (n=14)	LADA (n=16)	Контроли (n=25)
Възраст (г)	53.9±6.3	53.8±5.6	51.3±7.7	52.3±3.5
Пол (ж/м)	25/22	8/6	5/11	13/12
Акт. пушач (%)	40.4	42.9	31.3	56.0
МС (%)	89.4**	64.3*	25.0	8.0
ИТМ (kg/m^2)	33.1±6.2*	25.1±2.5	25.4±4.2	23.7±3.5
ОТ (cm)	106.0±14.7*	91.9±6.3	88.3±10.3	86.9±14.3
САН (mmHg)	135.7±19.5*	130.0±21.8*	115.63±14.5	115.6±1.9
ДАН (mmHg)	83.1±9.6*	79.3±9.2*	75.9±10.2	73.2±8.0
HbA1c (%)	7.8±1.7	9.2±1.9	9.3±1.3	-
ПГГ (mmol/l)	7.7±3.0*	8.8±3.8*	7.8±2.7*	5.2±0.5
ППГ (mmol/l)	7.6±2.9	7.8±2.8	9.5±4.2	-
ОХ (mmol/l)	5.0±1.1	5.1±1.4	5.3±1.6	5.0±0.8
HDL(mmol/l)	1.2±0.4	1.4±1.3	1.7±0.5	1.3±0.4
LDL (mmol/l)	2.91±1.01	2.90±1.25	2.62±1.71	3.13±0.78
VLDL(mmol/l)	0.9±0.4	0.8±0.4	0.5±0.2	0.7±0.5
ТГ (mmol/l)	2.0±0.9*	1.8±0.9	1.3±0.8	1.3±1.0
СУЕ (mm/h)	11.4±6.1*	10.8±6.3*	7.6±6.2	4.5±2.7
Hs-CRP (mg/l)	2.34±1.44*	1.33±1.41	1.10±1.02	0.70±0.89
IL-6 (pg/ml)	13.2±2.7*	2.3±1.6*	<1.5	<1.5
TNFα (pg/ml)	12.6±15.2	13.5±15.8	11.9±14.8	12.5±7.3
IL-18 (pg/ml)	561.0±251.3*	-	337.1±148.6*	216.6±93.9

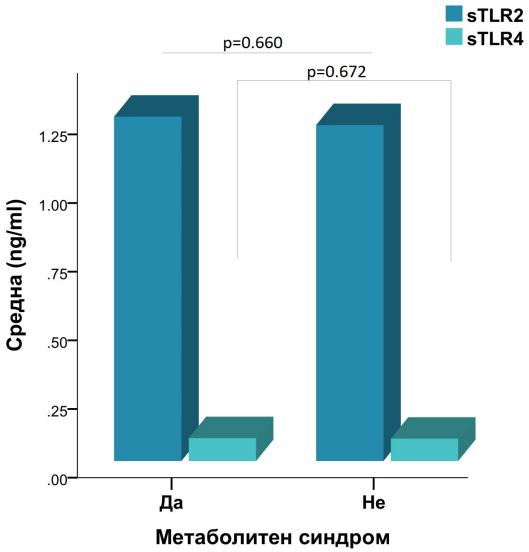
#сравними по ИТМ с Контролите; * p<0.05 спрямо контролите;

Проведеният корелационен анализ между нивото на sTLR2 и sTLR4 и описаните метаболитни и инфламаторни параметри при пациентите със ЗД2 показа положителна корелация за VLDL-холестерола и триглицридите с нивото на sTLR2 (Таблица 31).

Таблица 31. Корелационни коефициенти за анализа между sTLR и метаболитни параметри.

	sTLR2 (ng/ml)		**sTLR4 (ng/ml)**	
	ЗД2	**LADA**	**ЗД2**	**LADA**
ИТМ (kg/m^2)	-0.062	0.390	0.073	0.061
ОТ (cm)	-0.011	0.292	0.185	-0.292
ОХ (mmol/l)	0.233	-0.212	-0.176	0.111
HDL(mmol/l)	-0.173	-0.137	0.022	0.011
LDL (mmol/l)	0.089	0.214	-0159	-0.045
VLDL (mmol/l)	**0.367***	-0.053	-0.068	0.052
ТГ (mmol/l)	**0.349***	-0.171	-0.055	0.032
HbA1c (%)	-0.019	0.065	-0.069	-0.219
ПГГ (mmol/l)	0.078	0.232	-0.017	0.041
ППГ (mmol/l)	0.226	0.175	-0.055	0.293
*p<0.05				

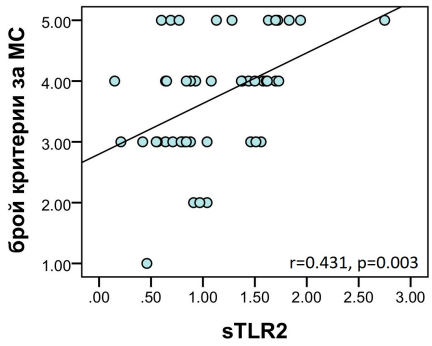
Сравнителният анализ между нивото на двата рецептора в зависимост от наличието на метаболитен синдром не показа сигнификантна разлика (Фигура 18).



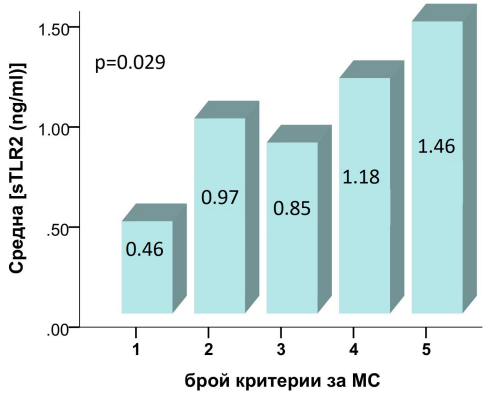
Фигура 18. Сравнителен анализ на нивото на sTLR2 и sTLR4 в зависимост от наличието на метаболитен синдром.

Въпреки това, нивото на sTLR2 се покачва с нарастване броя на критериите за метаболитен синдром сред пациентите със ЗД2 и беше констатирана положителна корелация между двата показателя в тази група (Фигури 19 и 20). Такава зависимост при sTLR4 не се наблюдаваше нито при корелационния анализ (r = -0.188, p=0.205), нито при сравнителния (p=0.44) в зависимост от броя критерии за ЗД2.

Участниците в групата с LADA тук бяха малко на брой, за да се разделят по този показател.



Фигура 19. Корелационна зависимост между броя критерии за метаболитен синдром и нивото на sTLR2 при ЗД2.



Фигура 20. Сравнителен анализ на нивото на sTLR2 при пациенти със ЗД2 в зависимост от броя критерии за метаболитен синдром.

Установихме отрицателна корелация между серумното ниво на sTLR4 и СУЕ при ЗД2 (Таблица 32).

Таблица 32. Корелационни коефициенти за анализа между sTLR и инфламаторни параметри.

	sTLR2 (ng/ml)			sTLR4 (ng/ml)		
	ЗД2	**LADA**	**Контроли**	**ЗД2**	**LADA**	**Контроли**
СУЕ (mm/h)	0.148	0.156	-0.051	**-0.346***	0.195	-0.367
Hs-CRP (mg/l)	0.106	0.276	-0.146	-0.089	0.082	0.135
IL-6 (pg/ml)	-0.193	-	-0.042	-0.110	-	-0.113
TNFα (pg/ml)	0.130	-0.527	-0.005	0.093	0.074	0.302
IL-18 (pg/ml)	-0.024	0.259	0.300	-0.078	-0.465	0.381
*p<0.05						

Не се наблюдаваха корелации между повърхностната експресия на рецепторите от периферни моноцити при лица със ЗД2 и нивото им в серума (Таблица 33).

Таблица 33. Корелационни коефициенти за анализа между sTLR и повърхностната експресия на рецепторите при пациенти със ЗД2.

Моноцити		**sTLR2 (ng/ml)**		**sTLR4 (ng/ml)**	
		r	***p***	***r***	***p***
Тотални	TLR2	0.109	0.579	-0.257	0.186
	TLR4	0.252	0.195	0.064	0.746
Класически	TLR2	0.132	0.502	-0.290	0.134
	TLR4	0.361	0.059	0.068	0.731
CD16+	TLR2	0.184	0.348	-0.228	0.244
	TLR4	0.083	0.676	0.041	0.838

Серумното ниво на разтворимите фракции на двата TLR беше сравнимо при диабетиците в случаите, в които се установяваше ДПНП спремо тези без това усложнение. При ДРП обаче се наблюдаваше значително по-ниско ниво на sTLR4 сред лицата със ЗД2 (p=0.021), които нямат това усложнение спрямо тези с ретинопатия. Същото беше валидно и при анализа сред всички изследвани диабетици – p=0.018. При sTLR2 разликата не беше потвърдена. Резултатите са на фона на сравнима възраст, давност на ЗД и актуален гликемичен контрол сред пациентите (Таблица 34).

Серумното ниво на двата рецептора не корелираше с eGFR при диабетиците изобщо (sTLR2: r = -0.035, p = 0.786; за sTLR4: r = -0.045, p = 0.729) и сред ЗД2 (за sTLR2: r = -0.138, p = 0.356; за sTLR4: r = 0.049, p = 0.744).

Таблица 34. Сравнителен анализ на концентрацията на sTLR2 и sTLR4 между пациентите със ЗД в зависимост от наличието на ДРП и ДПНП.

	Всички диабетици		ЗД2	
	Без ДРП (n=45)	**С ДРП (n=7)**	**Без ДРП (n=29)**	**С ДРП (n=7)**
sTLR2(ng/ml)	1.31±0.76	1.27±0.50	1.18±0.47	1.09±0.54
sTLR4(ng/ml)	0.05±0.13	0.16±0.15*	0.04±0.01	0.09±0.15*
Възраст (г)	53.5±7.1	50.9±4.5	54.8±6.7	50.9±4.5
Давност на ЗД (г)	4.2±3.2	3.6±3.7	5.0±3.2	3.6±3.7
HbA1c (%)	8.3±1.7	8.0±1.7	7.7±1.6	8.0±1.7
ПГГ (mmol/l)	7.6±3.1	6.6±1.8	7.8±3.2	6.6±1.8
ППГ (mmol/l)	8.5±3.2	8.1±3.2	8.1±2.9	8.1±3.2
	Без ДПНП (n=12)	**С ДПНП (n=49)**	**Без ДПНП (n=7)**	**С ДПНП (n=38)**
sTLR2(ng/ml)	1.09±0.43	1.17±0.70	1.18±0.47	1.09±0.54
sTLR4(ng/ml)	0.05±0.11	0.10±0.17	0.04±0.12	0.09±0.15
Възраст (г)	51.4±8.6	53.6±6.2	52.9±9.4	54.0±5.8
Давност на ЗД (г)	2.5±1.9	4.4±3.3	3.1±2.0	4.8±3.5
HbA1c (%)	8.0±2.1	8.4±1.7	6.8±1.2	8.1±1.8
ПГГ (mmol/l)	6.9±1.7	7.9±3.2	6.3±0.9	7.9±3.3
ППГ (mmol/l)	7.2±2.4	8.5±3.5	7.1±2.4	8.0±3.0
*p<0.05				

В заключение, повърхностната експресията на TLR2 и TLR4 при периферни моноцити е повишена при ЗД2, както при класическите, така и при CD16+ моноцити и корелира с показатели от метаболитния контрол. Само експресията на TLR2 корелира положително с hs-CRP. Установихме положителна корелационна зависимост между TLR2 и CD64, а отрицателна с CD163.

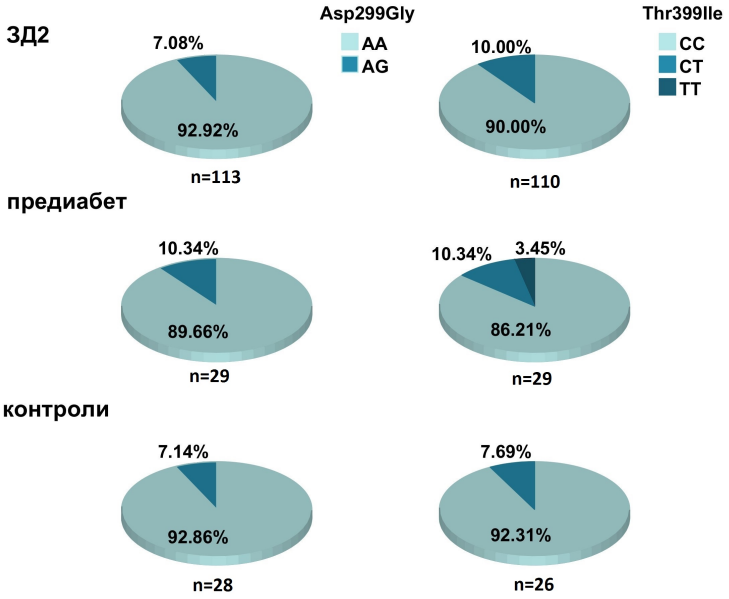
Разтворимата фракция на TLR2 беше сигнификантно понижена при пациенти със ЗД2. Въпреки че корелираше положително с броя критерии за метаболитен синдром, не установихме корелационни зависимости с отделните метаболитни показатели. Не се наблюдава асоциация между sTLR2 и sTLR4 и изследваните цитокини и hs-CRP, нито с експресията на TLR2 и TLR4 от периферни моноцити. Нивото на sTLR4 беше сигнификантно повишено при лицата с ДРП спрямо диабетиците без това усложнение.

4.6 Генотипиране

4.6.1 Генотипиране на Asp299Gly и Thr299Ile

Генотипирането по отношение на полиморфизмите на гена *TLR4* беше проведено при 114 души със ЗД, 29 участника с предиабет и 28 контроли (фигура 21). Честотата на хетерозиготния генотип за Asp299Gly в цялата изследвана популация беше 7.6%, а за Thr399Ile – 9.7%. Честотата за хомозиготен генотип за рецесивните алели на Asp299Gly беше 0%, а за Thr399Ile – 0.6%.

То не се различаваше сигнификантно от очакваното според закона на Hardy-Weinberg в нито една от групите (ЗД2: $p = 0.696$ за Asp299Gly и $p = 0.581$ за Thr299Ile; предиабет: $p = 0.768$ и $p = 0.064$; контроли: $p = 0.845$ и $p = 0.838$, съответно за всеки полиморфизъм).



Фигура 21. Генотипно честотно разпределение на полиморфизмите на гена *TLR4*

Не се установи сигнификантна разлика в честотата на генотиповете сред участниците със ЗД2 и контролите (p = 1.0 за Asp299Gly; p = 1.0 за Thr399Ile) или сравнявайки предиабет и контролите (p = 1.0 за Asp299Gly; p = 0.672 за Thr399Ile), както и ЗД2 и предиабет (p = 0.696 и p = 0.516 за съответния полиморфизъм) (Фигура 21). Сравнимо беше и алелното честотно разпределение на двата полиморфизма (Таблица 35).

Таблица 35. Алелно честотно разпределение на полиморфизмите на *TLR4*.

Полимор физъм	Алел	ЗД2 n(%)	Предиабет n(%)	Контроли n(%)	*P**	*P*†	*P*‡
Asp299Gly	A	218 (96.5)	55(94.8)	54 (96.4)	1.0	1.0	0.70
	G	8 (3.5)	3 (5.2)	2 (3.6)			
	Общо	226 (100)	58 (100)	56 (100)			
Thr399Ile	C	209 (95.0)	53 (91.4)	50 (96.2)	1.0	0.44	0.34
	T	11 (5.0)	5 (8.6)	2 (3.8)			
	Общо	220 (100)	58 (100)	52 (100)			

p*-ЗД2 спрямо контроли, p†-предиабет спрямо контроли, p‡ -ЗД2 спрямо предиабет.

Носителството на рецесивните алели на двата полиморфизма се наблюдаваше косегрегирано, както в останалите изследвани популации в Европа. Изолирано носителство на рецесивния алел на Thr399Ile беше констатирано при трима (2.7%) участници със ЗД2. За Asp299Ile не установихме такъв случай. Хомозиготно носителство беше установено за Thr399Ile, само при един случай на предиабет (Фигура 21).

Носителството на двата рецесивни алела на полиморфизмите на гена TLR4 не беше асоциирано с разлика в контрола на артериалното налягане, антропометрични (ИТМ и обиколка на талията), показатели за оценка на гликемичния и липиден контрол при участниците със ЗД2 с изключение на по-ниска стойност на общия холестерол (Таблица 36). При групите с предиабет и контролни участници такова сравнение не беше възможно поради малкия брой лица с рецесивен алел.

Таблица 36. Сравнителен анализ на клинични и метаболитни показатели при пациентите със ЗД2 в зависимост от присъстието на полиморфизми в *TLR4*.

	Asp299Gly		Thr399Ile	
	AA(n=105)	**AG(n=8)**	**CC(n=99)**	**CT(n=11)**
Възраст (г)	53.1±7.4	54.3±7.1	53.1±7.4	55.6±6.8
Пол (ж/м)	63/42	2/6	56/43	5/6
Давност на ЗД (г)	4.4±2.9	3.1±3.0	4.4±2.9	3.1±2.7
МС (%)	81.0	50.0	81.6	63.6
ИТМ (kg/m^2)	32.6±7.0	30.3±7.5	32.9±6.8	30.0±6.6
ОТ (cm)	103.2±15.4	99.4±16.9	103.8±14.9	99.0±15.6
САН (mmHg)	133.6±20.3	132.5±20.5	134.1±19.7	130.0±17.9
ДАН (mmHg)	83.0±10.3	80.0±5.4	83.3±10.0	79.1±5.4
HbA1c (%)	8.0±1.9	9.0±1.3	8.0±1.9	8.9±1.7
ПГГ (mmol/l)	8.1±3.0	7.6±3.1	8.1±3.0	8.4±3.6
ППГ (mmol/l)	8.0±3.2	9.8±5.2	8.0±3.3	9.3±4.3
ОХ (mmol/l)	5.3±1.2	4.7±1.0	5.4±1.1*	4.7±0.8
HDL (mmol/l)	1.3±0.4	1.3±0.4	1.3±0.4	1.2±0.4
LDL (mmol/l)	3.0±1.0	2.8±1.2	3.1±1.0	2.7±1.0
ТГ (mmol/l)	1.9±1.0	1.4±0.7	1.1±1.0	1.6±0.8
***p<0.05**				

Двата полиморфизма не се свързват с разлика в анализираните цитокини и hs-CRP, както и нивото на разтворимата фракция на sTLR2 и sTLR4 (Таблица 37). Сред лицата, при които е проведена флоуцитометрия, само при двама души се установи хетерозиготен генотип за анализираните полиморфизми на *TLR4*, което беше недостатъчно за провеждане на статистически анализ.

Таблица 37. Сравнителен анализ на инфламаторни показатели при пациенти със ЗД2 в зависимост от присъствието на полиморфизми в *TLR4*.

	Asp299Gly		Thr399Ile	
	AA(n=105)	**AG(n=8)**	**CC(n=99)**	**CT(n=11)**
Hs-CRP (mg/l)	2.43±1.64	1.44±1.46	2.44±1.61	1.79±1.67
IL-6 (pg/ml)	3.9±5.1	3.8±2.6	4.1±5.2	3.3±2.4
IL-18 (pg/ml)	348.4±424.3	424.3±143.2	347.7±168.9	386.5±133.9
TNFα (pg/ml)	14.4±17.6	7.8±5.7	14.3±17.3	7.8±5.7
sTLR2 (ng/ml)	1.06±0.51	0.85±1.68	1.02±0.47	0.93±0.25
sTLR4 (ng/ml)	0.09±0.17	0.05±0.12	0.08±0.17	0.09±0.15

Сравнителният анализ показа значително по-висока честота на ДРП при носителството на рецесивния алел на Asp299Gly при диабетици при сравнима възраст, давност на диабета, сходен актуален гликемичен контрол и контрол над артериалното налягане. За ДПНП не се установи разлика. При сравнение на eGFR като показател за оценка на бъбречната функция не констатирахме разлика в нивото ѝ при двата полиморфизма (Таблица 38).

Таблица 38. Полиморфизми на *TLR4* и хронични усложнения на ЗД2.

Усложнения от ЗД2	Генотип, n (%)			
	Asp299Gly		Thr399Ile	
	AA	AG	CC	CT
ДРП				
ДА	7 (9.0)	3 (42.9)	7 (9.7)	3 (30.0)
НЕ	71 (91.0)	4 (57.1)	65 (90.3)	7 (70.0)
P	0.033		0.100	
ДПНП				
ДА	80 (82.5)	7 (87.5)	77 (84.6)	9 (81.8)
НЕ	17 (17.5)	1 (12.5)	14 (15.4)	2 (18.2)
P	1.0		0.682	
eGFR(ml/min/1.73m^2)	96.5±26.3, n=105	106.1±21.6, n=8	97.0±25.8, n=99	99.8±22.3 n=11
P	0.172		0.498	

В заключение, не се установи асоциация между полиморфизмите Asp299Gly и Thr399Ile и ЗД2 или предиабет, но хетерозиготният генотип при първия е с по-висока честота при ДРП. Двата полиморфизма не са свързани с разлика в нивото на изследваните цитокини, hs-CRP и sTLR2 и sTLR4.

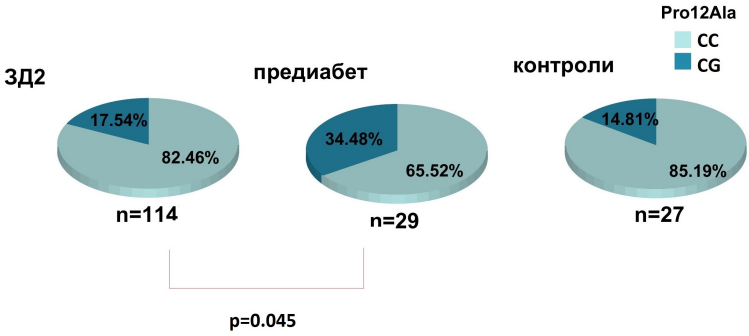
4.6.2 Генотипиране на Pro12Ala

Генотипното разпределение за Pro12Ala полиморфизъм на гена *PPARG* е показано на фигура 22. Резултатите са сравними с очакваното според закона на Харди-Вайнберг – ЗД2 – p = 0.305, предиабет – p = 0.262 и контроли – p = 0.678).

Честотата на хетерозиготния генотип (CG) за полиморфизма Pro12Ala в цялата изследвана популация беше 19.9%.

Генотипирането не показа статистически значима разлика в честотата на генотиповете между ЗД2 и контроли (p = 1.0) или между предиабет и контроли (p = 0.089). Установи се обаче по-висока честота на хетерозиготния генотип при предиабет спрямо

случаите със ЗД2 (p = 0.045). Сред лицата с предиабет честотата на генотип CG между случаите на НГГ и НВТ не се различаваше значително (съответно 35.7% срещу 33.3%, p = 1.0). В нито една от групите не се установи хомозиготен за рецесивния алел генотип (GG) (Фигура 22).



Фигура 22. Генотипно честотно разпределение на полиморфизма Pro12Ala.

По отношение на алелното честотно разпределение нямаше статистически значима разлика (Таблица 39).

Таблица 39. Алелно честотно разпределение на полиморфизма Pro12Ala.

		ЗД2, n(%)	Предиабет, n(%)	Контроли, n(%)	P*	P†	P‡
Алел	C	208 (91.2)	48 (82.8)	50 (92.6)	1.0	0.12	0.06
	G	20 (8.8)	10 (17.2)	4 (7.4)			
	общо	228 (100)	58 (100)	54 (100)			

p* - ЗД2 и контроли, p† предиабет и контроли, p‡ - ЗД2 и предиабет

Сравнителният анализ при лицата със ЗД2 и предиабет не показа разлика в контрола на артериалното налягане, ИТМ и обиколката на

талията, гликемичния контрол и липидния профил, с изключение на общия холестерол, който е по-висок при хомозиготен генотип (Таблица 40). Инфламаторните показатели също не се различаваха статистически в зависимост от генотипа (Таблица 41).

Таблица 40. Показатели при участниците със ЗД2 и предиабет в зависимост от присъствието на полиморфизма Pro12Ala.

	ЗД2		Предиабет	
	CC (n=94)	**CG(n=20)**	**CC(n=19)**	**CG(n=10)**
Възраст (г)	53.0±7.1	54.0±8.5	50.1±9.2	52.5±8.1
Пол (ж/м)	51/43	14/6	16/3	9/1
Давност на ЗД (г)	4.5±3.0	3.4±2.4	-	-
МС (%)	79.8	75.0	63.2	80.0
ИТМ (kg/m^2)	32.8±7.3	30.7±5.0	53.5±7.9	34.8±5.2
ОТ (cm)	104.0±15.9	98.3±12.0	103.6±14.9	101.8±12.7
САН (mmHg)	135.1±20.9	126.8±14.7	134.5±22.3	135.0±17.2
ДАН (mmHg)	83.4±10.6	80.3±6.2	82.1±9.8	89.0±8.8
HbA1c (%)	8.2±1.9	7.9±1.8	-	-
ПГГ (mmol/l)	8.3±3.0	6.9±2.5	5.40±0.72	5.61±0.86
ППГ (mmol/l)	8.2±3.4	7.8±3.4	7.6±1.7	7.7±1.8
ТХ (mmol/l)	5.4±1.2*	4.7±1.0	5.4±1.6	5.4±1.4
HDL (mmol/l)	1.3±0.4	1.4±0.3	3.1±0.9	1.3±0.3
LDL (mmol/l)	3.1±1.0	2.6±1.2	1.2±0.5	1.3±0.3
ТГ (mmol/l)	1.9±1.0	1.5±0.8	1.9±0.9	1.4±0.6
*p<0.05				

Сравнението на честотата на хроничните усложнения ДРП и ДПНП при ЗД2 в зависимост от генотипа, касаещ полиморфизма Pro12Ala, не констатира значителна разлика. Бъбречната функция, оценена чрез eGFR също не се различаваще при сравнима възраст, давност на диабета, контрол над гликемията и артериалното налягане (таблица 42).

Таблица 41. Инфламаторни параметри при участниците със ЗД2 и предиабет в зависимост от присъствието на полиморфизма Pro12Ala.

	ЗД2		Предиабет	
	CC(n=94)	**CG(n=20)**	**CC(n=19)**	**CG(n=10)**
Hs-CRP (mg/l)	2.45±1.71	1.92±1.23	2.14±1.75	1.99±1.36
IL-6 (pg/ml)	4.1±5.2	3.0±3.4	2.3±1.6	1.5±0.1
IL-18 (pg/ml)	343.0±157.1	399.8±199.2	428.1±242.7	372.0±273.7
TNFα (pg/ml)	12.9±16.4	14.6±16.4	17.0±11.3	17.7±6.1
sTLR2 (ng/ml)	1.10±0.50	0.82±0.27	-	-
sTLR4 (ng/ml)	0.06±0.12	0.15±0.27	-	-

Таблица 42. Полиморфизмът Pro12Ala и хронични усложнения на ЗД2.

Усложнения от ЗД2	**Pro12Ala генотип**		
	CC	**CG**	**p**
ДРП, n(%)			0.172
ДА	7 (9.6)	3 (23.1)	
НЕ	66 (90.4)	10 (76.9)	
ДПНП, n(%)			0.731
ДА	73 (82.0)	15 (88.2)	
НЕ	16 (18.0)	2 (11.8)	
eGFR (ml/min/1.73m^2)	96.4±25.9	99.7±21.1	0.245

В заключение, установихме по-ниска честота на хетерозиготния генотип на полиморфизма Pro12Ala при лица с предиабет спрямо участниците със ЗД2. Генотипът не се асоциира с разлика в честотата на хроничните усложнения от ЗД2. Полиморфизмът не беше свързан и с разлика в метаболитните показатели на пациентите с изключение на по-нисък общ холестерол при хетерозиготен генотип.

5. Обсъждане

5.1 Диабет-асоциирани антитела и латентен автоимунен диабет при възрастни

Съобщенията за честота на LADA между 4 и 14% сред диагностицираните със ЗД2 и значителните разлики в метаболитно и имунологично естество между тях наложиха изследването на диабет-асоциираните антитела сред анализираните пациенти. При прегледа на литературата не намерихме данни за този проблем в българската популация.

Настоящото проучване показа честота на положителни диабет-асоциирани антитела при ЗД2 от 10.16%, което е в рамките на резултатите от други проучвания в Европа. GAD65A беше водещо по честота позитивно антитяло.

Участниците, които бяха включени в групата с LADA бяха със значително по-висока честота на две и повече положителни антитела и по-висока концентрация на GAD65A отколкото при пациентите, диагностицирани първоначално със ЗД2. Въпреки това, пациентите от тези две групи не могат да бъдат поставени в различни категории, каквито някои автори предлагат, изтъквайки хетерогенността на LADA – LADA тип 1, доближаващ се повече до ЗД1, и LADA тип 2 с фенотипа на ЗД2. Подобно разграничаване между включените пациенти би обяснило защо близо 10% от лицата със ЗД2 са останали недостатъчно добре диагностицирани, докато ходът на заболяването и метаболитният профил при пациентите с LADA са наложили изследване на антителата амбулаторно. Метаболитните показатели при пациентите с новооткрити положителни антитела обаче съществено се различават от тези на диабетиците с отрицателни и много се доближават до тези на пациентите с LADA. **Очевидно фенотипът не е достатъчна индикация за изследването на диабет-асоциирани антитела в клиничната практика и заболяването все още остава недиагностицирано.**

Проблем в диагностиката на LADA са случаите, в които нивото на антителата е близо до праговата стойност, посочена от търговския кит. Специфичността на използваните тук тестове е над 98%, но все още допуска наличие на фалшиво положителни стойности сред изследваните пациенти. В действителност, титърът на антителата може да варира и особено при гранични стойности или фалшиво положителен резултат може да влезе в рамките на референтната област при пореден анализ.

Поддържането на оптимален гликемичен контрол при лица с положителни антитела обикновено изисква по-големи усилия и това се свързва с по-малката бета-клетъчна маса при тези пациенти, отколкото при диабетици с негативни антитела. На този етап все още не ясно кое е най-доброто лечение за съхраняване на бета-клетъчната функция при пациентите с LADA и дали включването на инсулин въпреки отличния гликемичен контрол на фона на перорална терапия би отложило загубата на бета-клетките. По-съществен клиничен проблем е отлагането на инсулина при пациенти, диагностицирани със ЗД2 при незадоволителните стойности на плазмената глюкоза и HbA1c. Причините за това могат да бъдат теглото, рискът от хипогликемия, нежеланието на пациента да провежда такова лечение. Изследването на антитела може да осигури своевременно преориентиране в провежданата антидиабетна терапия и предотвратяване на остри хипергликемични усложнения и профилактика на късния дегенеративен синдром.

По-високото ниво на hs-CRP и IL-6, което беше описано при лицата със ЗД2 и предиабет спрямо пацинтите с LADA и контролните участници, е в съответствие с литературните данни за субклинично възпаление при първите две състояния, при които и честотата на затлъстяване и метаболитен синдром е по-висока. Тези резултати се допълниха и от сигнификантни корелации между двата показателя и антропометричните параметри, както и контрола на артериалното налягане, въпреки че не се установи зависимост с гликемичния и липиден контрол. Нивото на hs-CRP беше водещо в анализирането на асоциация с метаболитния профил на участниците,

тъй като именно за него се наблюдава значителна разлика в зависимост от наличието на метаболитен синдром и корелираше с броя на критериите за диагностицирането му. Като изключим ПГГ, която е положителен критерий поради естеството на включените пациенти, обиколката на талията и артериалното налягане бяха водещи критерии за метаболитен синдром и именно при тях се проследиха основните положителни корелации с hs-CRP, следван и от IL-6. Направи впечатление, че такива се установиха дори и в контролната група, за разлика от LADA. Причина за това може да бъде малко по-високата честота на метаболитния синдром при контролите, макар и без статистическа значимост.

5.2 IL-18 в допълнение към IL-6 и hs-CRP в оценката на хроничното-субклинично възпаление при метаболитен синдром, ЗД2 и предиабет

И докато мястото на hs-CRP и IL-6 е добре познато в рамките на затлъстяването и свързаните с него метаболитни усложнения и има предиктивна стойност в определянето на риска от ЗД2, то интересът към **IL-18** едва сега нараства. **Не намерихме анализ на нивото на цитокина при ЗД2 в българската популация до момента, а за LADA изследването се провежда за първи път в световен мащаб.**

В рамките на настоящата работа IL-18 корелираше положително с ИТМ и всички показатели, използвани за оценка наличието на метаболитен синдром, с броя на критериите за неговото диагностициране в общата популация, както и с нивото на IL-6 и hs-CRP като параметри за оценка на възпалителното състояние. Резултатите за последните се запазиха в групата със ЗД2. За първи път беше анализирано серумното му ниво сред лица с LADA и сравнено с това на пациенти със ЗД2. Липсата на статистически значима разлика между нивото на цитокина при двете състояния може да е свързана със стимулиращия ефект на самата хипергликемия. Наблюденията, че групата с предиабет имаше ниво на IL-18, което не се различавапе статистически спрямо това при

участниците със ЗД, показва, че хипергликемията не е водеща в стимулацията на секрецията на цитокина. Предвид представените резултати може да се заключи, че **влиянието на теглото и метаболитния синдром има по-съществен принос за повишението на IL-18**.

IL-18 е цитокин, който участва активно в патогенезата на много автоимунни заболявания, включително и захарен диабет тип 1 (ЗД1). **Имайки предвид, че LADA се разглежда като част от клиничния спектър на ЗД1, тогава не е изненадващо, че нивото на IL-18 беше повишено и сред участниците в тази група спрямо контролите.**

Липсата на корелации между концентрацията на интерлевкина и антропометричните, гликемични и липидни показатели при LADA може да се дължи на значително по-ниската честота на метаболитния синдром спрямо тази при ЗД2, но може и да говори в полза на това, че нивото на IL-18 при автоимунен ЗД е по-скоро отражение на автоимунен отговор.

5.3 Повърхностна моноцитна експресия при ЗД2

В подкрепа на инфламаторното състояние при ЗД2 е и повишението на процента некласически моноцити. Увеличението им е описано при редица възпалителни състояния, както и при затлъстяване и атеросклероза. Липсата на статистически значима разлика в нивото на анализираните цитокини сред участниците, при които беше проведена флоуцитометрия, вероятно се дължи на малкия брой изследвани пациенти. Беше показано, че нивото на IL6, IL-18, hs-CRP при лицата със ЗД2 е значително по-високо отколкото при контролите. Друг лимитиращ фактор в настоящия анализ, освен малкия брой пациенти, е сравнението между лица, които сигнификантно се различават по ИТМ, а затлъстяването само по себе си се асоциира с по-високи некласически моноцити.

Въпреки, че междинният подтип моноцити не се различаваше количествено при ЗД2 спрямо контролната група, тук бяха констатирани фенотипни разлики относно експресията на CD163 и CD36.

И други проучвания са свързвали затлъстяването и ЗД2 с повишена експресия на CD163, и макар тя да не е най-висока за междинния подтип моноцити, именно при него беше констатирана чувствителна разлика. **Повърхностната експресия на CD163 допълва мястото на разтворимата му фракция като предиктор за развитие на ЗД2**, въпреки че не корелираше нито с метаболитните показатели, нито с IL-6 и hs-CRP, които също имат такава стойност. CD163 има комплексно участие в имунния отговор, но има много доказателства за неговите анти-инфламаторни качества и е възможно повишената му експресия върху моноцити при ЗД2 да е част от анти-инфламаторния отговор към ниско-степенното възпаление при това състояние, тъй като е наблюдавано, че тя се асоциира с по-ниска честота на хроничните диабетни усложнения.

Въпреки, че CD36 също е свързван с повишена повърхностна експресия и с увеличена разтворима фракция при ЗД2, настоящият анализ показа понижение на повърхностната му експресия при междинните моноцити при ЗД2. Прегледът на литературата не установи анализ на нивото на CD36-експресиращите моноцити от всеки подтип при това заболяване. **Възможно е понижението, което беше констатирано, да се крие зад публикуваните резултати за по-висока експресия в тоталния брой моноцити, тъй като междинния подтип представлява малък процент от тях**. Предвид ролята на CD36 в патогенезата на атеросклерозата като скавенджър рецептор за окислени липиди и натрупването на данни за участието на междинните моноцити във възпалението при съдови инциденти, настоящите резултати посочват необходимостта от още проучвания в областта. Понижението може да се свърже с преразпределение към тъканите, потискане на експресията от анти-инфламаторни стимули, но за доказването им са необходими изследвания в по-голям мащаб.

За разлика от CD36 и CD163, експресията на CD64 не се различаваше значително при ЗД2 спрямо контролите. Литературният преглед показа, че въпросът на практика не е анализиран и този резултат е допълнение към данните за фенотипните особености на отделните видове моноцити в рамките на ЗД2.

Корелационният анализ между процента на експресиращи всеки от маркерите моноцити и количествените особености на левкоцитите, общите и отделните подтипове моноцити установи отделни зависимости, някои от които се потвърдиха и при контролите, но не е ясно дали това би имало клинично значение. Не се намери тенденция за корелиращи фенотипни и количествени особености. Наблюдавана обаче беше такава за корелация между повърхностната експресия от отделните подтипове за всеки анализиран маркер (CD36, CD163, CD64) при диабетиците, но не и при контролите. **Може да се спекулира, че дори статистическият анализ да не констатира сигнификантни разлики между двете групи по отношение на тези рецептори, експресията им при ЗД2 се повлиява съгласувано сред всички подтипове моноцити, макар и промените да са дискретни.**

Експресията на отделните маркери не показа зависимост между тях – нито при диабетиците, нито при контролите, и явно темповете в динамиката ѝ за всеки рецептор е различна, а според настоящите резултати и независима от метаболитния контрол. Тя не е свързана и с hs-CRP и изследваните цитокини и не можем да кажем, че променената експресия при ЗД2 спрямо контролите е съизмерима с тежестта на хроничното възпалително състояние при това заболяване. Тези наблюдения обаче възникват и на фона на несигнификантна разлика в hs-CPR и IL-6 в извадката, в която се проведе флоуцитометрия. Това означава, че в по-голяма група, където и разликата в маркерите за хронично възпаление е по-изразена, бихме могли по-ясно да отдиференцираме доколко повърхностната експресия на периферните моноцити отразява секрецията на възпалителни цитокини. Още по-интересен би бил

този резултат за инфилтриращите мастната тъкан макрофаги. Далеч от чисто теоретичния принос на такава информация обаче, за нас по-полезна би била прогностичната роля на експресията именно от периферни моноцити, чието изолиране би било по-достъпно в клиничната практика.

Експресията на TLR2 и TLR4 беше убедително по-висока при лицата със ЗД2 – както сред тоталните, така и сред класическите и CD16+ моноцити. Тези резултати, както и наблюденията за положителна корелация с показатели за оценка на теглото, гликемичния и липиден контрол, подкрепят други проучвания в тази насока и ги допълват с чрез представените данни, касаещи не само CD14+ моноцити, но и CD16+ популация от тях.

Въпреки, че описахме повишение на CD163+ моноцити в единия подтип, корелационният анализ демонстрира ясна тенденция към отрицателна зависимост между този маркер и експресията на TLR2. Тя не противоречи на описаната роля на разтворимия CD163 като маркер за хроничното възпалително състояние при ЗД2, тъй като той е резултат от повишено отцепване на мембранно-свързания рецептор при това заболяване въпреки липсата на повишена експресия на CD163 в тоталния моноцитен брой.

В сравнение, за CD64+ клетки, които не се различаваха количествено в двете групи, корелацията с TLR2 е положителна при ЗД2. Експресията на CD64 от периферни моноцити и неутрофили се асоциира със системното възпаление, но досега не е свързвана директно с тази на TLR. Предвид централната роля на последните в инфламаторния отговор, такава положителна корелационна зависимост посочва, че CD64 също участва в хроничното възпалително състояние при ЗД2.

5.4 Разтворими фракции на TLR2 и TLR4 при ЗД2

Въпреки, че е описвано повишение на нивото на разтворимата фракция на TLR2 при инфламаторни състояния от различен характер, при свързаното със ЗД2 хронично възпаление беше

установено понижение на sTLR2. За sTLR4 също не се установи повишение при диабетиците.

Литературният преглед показа данни за негативния контрол, който разтворимата фракция оказва върху активирането на повърхностно експресирания рецептор. Би могло да се спекулира, че тези резултати онагледяват нарушение в обратния контрол върху сигнализацията чрез TLR2.

Несъответствията между моноцитната експресия и концентрацията на разтворимата фракция могат да бъдат обяснени и с нивото на отцепване на мембрано-свързаните рецептори от металопротеинази, освобождаване на рецепторите от вътреклетъчни резервоари, а не само чрез метаболизиране на повърхностно експресирани молекули, получаване на разтворима фракция при алтернативен сплайсинг, а не отцепване на ектодомейна, експресия от различни от моноцитите клетки и не на последно място клирънс на разтворимите рецептори от циркулацията.

Въпреки сравнимото ниво на sTLR4 при ЗД2 и контролите, за него се наблюдаваше отрицателна корелация със СУЕ, което насочва към липсата на синхрон между концентрацията на разтворимите рецептори и инфламаторните показатели.

5.5 Полиморфизми в гените TLR4 и PPARG в континуума от предиабет през ЗД2 и неговите хронични усложнения

Още един аспект от мястото на TLR в патогенезата на ЗД2 е ролята на полиморфизмите Asp299Gly и Thr399Ile в гена *TLR4* в хроничното възпаление. В литературния обзор бяха представени противоречивите заключения от различни студии относно протективаната му стойност в развитието на ЗД2 и метаболитен синдром. Настоящите резултати изключиха асоциация между двата полиморфизма и ЗД2 или предиабетно състояние. Ниската честота на рецесивния алел не позволи оценката на повърхностната експресия на рецептора в зависимост от генотипа на пациентите, тъй като флоуцитометрията е проведена при относително малък брой

участници. Въпреки това, повишената експресия на двата TLR при ЗД2 съответства на по-високото ниво на hs-CRP, IL-6, IL-18 при диабетиците. Затова сравнихме концентрацията на последните в зависимост от генотипа. Не се установи асоциация между полиморфизмите и hs-CRP или анализираните цитокини, нито с концентрацията на sTLR4.

По отношение на хроничните диабетни усложнения се констатира по-високата честота на рецесивния алел на полиморфизма Asp299Gly сред лица с ДРП, което подкрепя литературните данни за предразполагаща му роля към това усложнение. Още по-комплексна става ролята на рецепторите в патогенезата на хроничните диабетни усложнения, предвид наблюдаваното по-високо ниво на sTLR4 при пациентите с ДРП. Въпреки, че не установихме пряка зависимост между Asp299Gy и разтворимата фракция на рецептора, очевидно той има отношение риска от това усложнение и заслужава внимание не само относно повърхностната му експресия. Повишената предразположеност към ДРП при хетерозиготен генотип на Asp299Gly може би се крие във функционални промени на локално ниво без това да дава системно отражение върху фенотипа на моноцитите или цитокиновата експресия.

Предвид съобщенията за протективна роля на Pro12Ala в развитието на ЗД2 и мястото на пероксизома пролифератор-активирания рецептор (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma – PPARγ) и тиазолидиндионите в хроничното възпалително състояние при заболяването, полиморфизмът беше изследван в анализирането на имунологичните промени при континуума от предиабет, ЗД2 и хроничните му усложнения. Установихме по-висока честотата на хетерозиготния генотип на полиморфизма Pro12Ala при предиабет спрямо пациентите със ЗД2. **Това поставя въпроса за генетичното влияние върху риска от прогресия на предиабетното състояние в диабет.** Наблюдаваният протективен ефект на полиморфизма за настъпването на ЗД2 не може да се свърже с по-ниски стойности на цитокините и hs-CRP в

циркулацията, нито се установи разлика в метаболитния профил в зависимост от генотипа на участниците. Това обаче не изключва възможността Pro12Ala да се отразява на функционалната активност на инфилтриращите мастната тъкан макрофаги, чрез която да повлиява инсулиновата чувствителност.

В заключение, хроничното субклинично възпаление съпътства метаболитните нарушения при затлъстяването и ЗД2. Изясняването на мястото на всяко едно от звената на възпалителния отговор в генерирането на инсулинова резистентност и бета-клетъчната дисфункция, позволява по-широкото познаване на детайлите в развитието на метаболитен синдром и ЗД2, откриването на маркери за повишен риск от тези състояния, включването им в стратегиите за профилактика на свързаните с тях усложнения и дори търсенето на нови терапевтични възможности.

Описаните в дисертационния труд резултати са в съответствие с публикувани наблюдения относно промените в серумното ниво на изследваните цитокини и hs-CRP при ЗД2 и предиабет и връзката им с метаболитния синдром при тези състояния. Представихме нов поглед към промените в повърхностната моноцитна експресия на рецептори с ключова роля във възпалението в рамките на ЗД2. В опит да потърсим нови серумни маркери за хроничното възпаление констатирахме промени в разтворимите фракции на някои от тях, което постави въпроса за негативната регулация на възпалителния процес и заслужава проследяване в проспективен анализ.

Въпреки, че все повече се говори за латентно протичащия автоимунен захарен диабет сред възрастните, представените резултати показват, че LADA изостава в диференциалната диагноза на декомпенсирания ЗД2. Положителни диабет-асоциирани антитела се откриват и при лица с фенотип на класически ЗД2, но наблюденията ни сочат, че дори и клиничните характеристики да са близки до очакваните за LADA, заболяването остава недиагностицирано.

Дори и привидно да не се различават при пациентите с LADA и ЗД2, показателите за оценка на инфламаторното състояние, които сравнихме за първи път при двете заболявания, показаха различна връзка с анализираните антропометрични, липидни, гликемични параметри. Това потвърждава различния метаболитен профил на двете заболявания и посочва необходимостта от по-мащабни изследвания за разграничаване мястото на асоцииранoто с метаболитния синдром хронично субклинично възпаление от това на автоимунния отговор при LADA.

Изследваните полиморфизми имат отношение към риска от прогресия на нарушенията във въглехидратната обмяна към ЗД2 и хроничните му усложнения. Липсата на асоциация с описаните тук промени при анализираните инфламаторни показатели не изключва вероятността биологичният ефект на полиморфизмите върху хроничното субклинично възпаление да допринася за този риск. За съществен клиничен ефект обаче вероятно е необходима по-голяма извадка предвид ниската им честота.

Представените резултати за асоциация на полиморфизмите при гена *TLR4*, повърхностната експресия на рецепторите TLR2 и TLR4 и техните разтворими фракции с метаболитния контрол и хроничните усложнения при ЗД2 доказва недвусмислено ангажирането на неспецифичната имунна система в патогенезата на заболяването.

6. Изводи

1. Честотата на положителните диабет-асоциирани антитела при пациенти, първоначално диагностицирани като ЗД2 в извадка от българската популация е 10% и съответства на тази, цитирана при други проучвания в Европа и света.

2. Невъзможността за постигане на оптимална компенсация на гликемичния контрол при ЗД2 следва да се възприема като индикация за изследване на диабет-асоциирани антитела, особено когато клиничният и метаболитен профил на пациентите е близък до този при автоимунен ЗД.

3. Повишените показателите за оценка на хроничното ниско-степенно възпаление при ЗД2 са свързани повече с по-високата честота на метаболитния синдром при участниците отколкото с хипергликемията.

4. IL-18 допълва IL-6 и hs-CRP в оценката на хроничното субклинично възпаление при ЗД2 и метаболитен синдром.

5. Количествените промени в моноцитите съпътстват реакцията на имунната система при ЗД2 и фенотипните изменения в повърхностната им експресия са конкордантни за всички подтипове. Разликата в абсолютните стойности обаче може да засяга малък подтип от клетките, което би убегнало при анализа в целия моноцитен ред.

6. Серумното ниво на изследваните показатели за оценка на хроничното възпаление при LADA, дори и в случаите, в които е сравнимо с това при ЗД2, не се асоциира с метаболитния статус на пациентите и вероятно е свързано с автоимунния процес.

7. Разтворимата фракция на TLR2 и TLR4 в серума не съответства на повърхностната моноцитна експресия на рецептора и не може да се използва като маркер за възпалителния процес при ЗД2 както IL-6, IL-18 и hs-CPR.

8. Генотипното честотно разпределение на полиморфизмите Asp299Gly и Thr399Ile в гена *TLR4* не се асоциира с честотата на ЗД2, но първият от тях е възможно да увеличава риска от диабетна ретинопатия.

9. Генотипното честотно разпределение на полиомрфизма Pro12Ala в гена *PPARG* не е свързано с честотата на предиабет и ЗД2, но може да има протективно участие в еволюцията на едното състояние към другото.

10. Полиморфизмите Asp299Gly и Thr399Ile в гена *TLR4,* както и Pro12Ala в гена *PPARG* не са свързани с промени в показателите за оценка на хроничното ниско-степенно възпаление при ЗД2 на фона на сравним метаболитен статус в рамките на изследваната извадка.

7. Справка за приносите

Научно-теоретични с международна значимост:

1. За първи път се сравни клиничният и инфламаторен статус между пациенти, диагностицирани със ЗД2, които се оказват с положителни диабет-асоциирани антитела, и лица, при които е установен LADA амбулаторно.

2. За първи път се изследва нивото на IL-18 при LADA и се сравни с това при ЗД2.

3. Определи се повърхностната експресия на TLR4, TLR2, CD36, CD163 и CD64 не само от класическите моноцити, но и от CD16+ моноцити при пациенти със ЗД2.

4. За първи път се изследва нивото на разтворимата фракция на TLR2 и TLR4 при лица със ЗД2 и LADA.

5. Разгледа се връзката между полиморфизмите и нивото на инфламаторните показатели и разтворимите TLR при пациенти с предиабет и ЗД2.

Научно-теоретични с национална значимост:

1. Определи се честотата на диабет-асоциираните антитела GAD65A и IA-2A сред пациенти със ЗД2, предиабет и здрави контроли в извадка от българската популация.

2. Проведе се генотипиране за полиморфизмите Asp299Gly, Thr399Ile и Pro12Ala в българската популация.

С потвърдителен характер:

1. Характеризира се нивото на ключови про-инфламаторни цитокини и hs-CRP при ЗД2, предиабет и LADA и връзката им с метаболитния синдром сред включените участници.

2. Разгледа се мястото на IL-18 в хроничното ниско-степенно възпаление при ЗД2 и предиабет, като се подчерта връзката му с метаболитния синдром и се сравни с ролята на други цитокини и hs-CRP.

3. Подкрепени бяха данни за предразполагащата роля на Asp299Gly в развитието на диабетна ретинопатия и протективния характер на Pro12Ala в еволюцията на предиабет към ЗД2.

8. Публикации и научни съобщения по темата на дисертацията

Статии и монографии – 10

Статии с impact factor

1. **Zaharieva** E, Kamenov Z, Velikova T, Tsakova A, El-Darawish Y, Okamura H. Interleukin 18 Serum Level is Elevated in Type 2 Diabetes and Latent Autoimmune Diabetes. Endocrine connections. 2018; 7(1):179-185. **IF=2.541**

2. **Zaharieva** E, Vikentieva E, Andreeva R, Popova D, Kamenov Z. CD36 Surface Expression on Monocytes in Type 2 Diabetes. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences. In press. **IF=0.251**

3. **Zaharieva** E, Velikova T, Tsakova A, Kamenov Z. Reduced Soluble Toll-like Receptors 2 in Type 2 Diabetes. Arch Physiol Biochem. 2017 Nov 21:1-4. **IF=1.220**

4. **Zaharieva** E, Vikentieva E, Andreeva R, Popova D, Tsakova A, Kamenov Z. Elevated CD163 Expression on CD14++CD16+ Monocytes in Type 2 Diabetes. Diabetes Stoffw Herz 2017; 26: 271-276. **IF=0.078.**

5. **Zaharieva** E, Velikova Ts, Tsakova A, Kamenov Z. Prevalence of Positive Diabetes Associated Autoantibodies among Type 2 Diabetes and Related Metabolic and Inflammatory Differences in a Sample of the Bulgarian Population. J Diabetes Res. 2017;2017:9016148. **IF=2.717**

Статии без impact factor:

1. **Zaharieva** E, Kamenov Z, Savov A. TLR4 Polymorphisms Seem not to be Associated with Prediabetes and Type 2 Diabetes but Predispose to Diabetic Retinopathy. Endocr Regul. 2017;51:137-144.

2. **Захариева** Е, Каменов З, Савов А. Полиморфизмът Pro12Ala при предиабет и захарен диабет тип 2 в извадка от българската популация. Ендокринология, 2017:2: 72-75.

3. **Захариева** Е., Каменов З. Неспецифичен имунитет при захарен диабет тип 2. Медикарт. Гастроентерология и Ендокринология 2014:2;46-49.

4. **Захариева** Е., Каменов З. Латентен автоимунен диабет при възрастни. Медикарт. Гастроентерология и Ендокринология 2013 :1;32-35.

Монографии

1. Атанасова И, Каменов З, **Захариева** Е. Автоимунитет и ендокринни заболявания. 2012, ИК ДаДа, София, ISBN:978-954-8519-31-1, МОНОГРАФИЯ, 226 стр.

Научни съобщения - 5

1. **Zaharieva** E, Velikova T, Kamenov Z. Serum ZnT8 level in patients with type 2 diabetes, LADA and prediabetes. *American Diabetes Association, 77th Scientific Sessions.* San Diego, CA, June 9-13, 2017. Poster presentation. 1901-P.

2. **Zaharieva** E, Velikova T, Vikentieva E, Popova D, Tsakova A, Kamenov Z. Reduced Level of Soluble TLR2 in Type 2 Diabetes Despite Increased TLR2 Monocyte Expression. *19th European Congress of Endocrinology*. Lisbon, May 20-23, 2017. Poster presentation. GP82.

3. **Zaharieva** E, Velikova T, Tsakova A, Kamenov Z. Prevalence of Positive Diabetes Associated Antibodies among Type 2 Diabetes in the Bulgarian Population and Related Differences in Metabolic and Inflammatory Phenotype. *International Congress of Medical Sciences*, Sofia, May 11-14, 2017. Poster presentation – best poster presentation award.

4. **Захариева** Е, Каменов З, Савов А. Полиморфизми на TLR4 гена при пациенти с предиабет и тип 2 захарен диабет и хроничните му микросъдови усложнения. *Юбилеен национален конгрес по*

Ендокринология, гр. Пловдив, 8-11 октомври, 2015г. Орална презентация.

5. Kamenov Z, **Zaharieva** E, Vikentieva E, Popova D. Toll-like Receptors 2 and 4 in Type 2 Diabetes. *American Diabetes Association, 75th Scientific Sessions*. Boston, June 5-9, 2015. Poster presentation. LB55.