

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**

ДИСЕРТАЦИЯ

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

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
ЛПЗ	Липополизахарид
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
САН	Систолно артериално налягане
СМК	Свободни Мастни Киселини
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 lipoprotein
HBMG-1	High-mobility group box 1 protein

HSP	Heat shock protein
IA-2A	Insulinoma associated autoantigen 2 antibodies
ICA	Islet-cell antibodies
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IKK	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin 1 receptor
IL-1RA	Interleukin 1 receptor antagonist
IRS	Insulin receptor substrate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LADA	Latent autoimmune diabetes of the adults
LDL	Low-density lipoprotein
MyD88	myeloid differentiation factor 88
MAPK	Митоген активирани протеин кинази
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
NFkB	nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
sTLR	Soluble Toll-like receptor
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	Very low density lipoprotein
ZnT8	Zinc Transporter 8
ZnT8A	Anti Zinc Transporter 8 antibodies

Съдържание

ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	7
1.1 ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И ЗАТЛЪСТЯВАНЕ В СВЕТОВЕН МАЩАБ И У НАС.....	7
1.2 ЗД2 КАТО СЪСТОЯНИЕ НА ХРОНИЧНО НИСКО-СТЕПЕННО ВЪЗПАЛЕНИЕ	8
1.2.1 Прояви на хроничното възпаление в мастната тъкан.....	10
1.2.2 Прояви на ниско-степенното хронично възпаление извън мастната тъкан.	15
1.2.3 Някои инфламаторни маркери.....	16
1.2.4 Възпаление и инсулинова резистентност.....	20
1.2.5 Възпаление и бета-клетъчна дисфункция.....	24
1.3 TOLL-LIKE РЕЦЕПТОРИ	27
1.3.1 TLR4.....	28
1.3.2 TLR2.....	31
1.3.3 Мястото на TLR2 и TLR4 в патогенезата на ЗД2	31
1.3.4 Разтворими фракции на TLR2 и TLR4.....	36
1.3.5 Полиморфизми на гена TLR4 и ЗД2	37
1.3.6 Полиморфизми на гена TLR4 и хронични диабетни усложнения	40
1.4 ПОЛИМОРФИЗМЪТ PRO12ALA В PPARG И ХРОНИЧНО СУБКЛИНИЧНО ВЪЗПАЛЕНИЕ ПРИ ЗД2.....	42
1.5 ДРУГИ ЕКСПРЕСИРАНИ ОТ МОНОЦИТЕ РЕЦЕПТОРИ ПРИ ЗД2.....	44
1.5.1 CD163	44
1.5.2 CD36.....	46
1.5.3 CD64.....	47
1.6 МОНОЦИТНИ ПОДТИПОВЕ И ЗД2.....	48
1.7 ЗД2 И ДИАБЕТ-АСОЦИИРАНИ АНТИТЕЛА	52
1.7.1 Концепция за латентен автоимунен диабет при възрастни.....	52
1.7.2 Диабет-асоциирани антитела	54
1.7.3 LADA между ЗД1 и ЗД2.....	59
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	66
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	67
3.1 УЧАСТНИЦИ В ПРОУЧВАНЕТО	67
3.1.1 Пациенти със ЗД2.....	67
3.1.2 Пациенти с латентен автоимунен захарен диабет (LADA).....	67
3.1.3 Пациенти с нарушена гликемия на гладно и/или нарушен въглехидратен толеранс (предиабет).....	68
3.1.4 Контролна група	69
3.2 ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИНФЛАМАТОРНИ ПОКАЗАТЕЛИ В СЕРУМ.....	70
3.3 ИЗСЛЕДВАНЕ НА ДИАБЕТ-АСОЦИИРАНИ АНТИТЕЛА.....	72
3.4 ИЗСЛЕДВАНЕ НА МОНОЦИТНИ МАРКЕРИ ЧРЕЗ ФЛОУЦИТОМЕТРИЯ.....	74
3.5 ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ	75
3.6 СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ	81
4. РЕЗУЛТАТИ	82
4.1 ИЗХОДНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ВКЛЮЧЕНИТЕ УЧАСТНИЦИ.	82
4.2 ДИАБЕТ-АСОЦИИРАНИ АНТИТЕЛА ПРИ ЛИЦА СЪС ЗД2 И ВРЪЗКАТА ИМ С МЕТАБОЛИТНИТЕ И ИНФЛАМАТОРНИ ПОКАЗАТЕЛИ.....	90

4.3	IL-18.....	101
4.4	ПОВЪРХНОСТНА ЕКСПРЕСИЯ НА ПЕРИФЕРНИ МОНОЦИТИ	114
4.5	ИЗСЛЕДВАНЕ НА TLR2 И TLR4	124
4.5.1	<i>Повърхностна експресия на TLR2 и TLR4 върху моноцити</i>	<i>124</i>
4.5.2	<i>Разтворими TLR2 и TLR4.....</i>	<i>130</i>
4.6	ГЕНОТИПИРАНЕ.....	139
4.6.1	<i>Генотипиране на Asp299Gly и Thr299Ile</i>	<i>139</i>
4.6.2	<i>Генотипиране на Pro12Ala.....</i>	<i>144</i>
5.	ОБСЪЖДАНЕ.....	148
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	162
7.	ИЗВОДИ	164
8.	СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ	166
9.	ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА.....	167
10.	КНИГОПИС	170

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 зависи само от нейните стойности. 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 редица хронични заболявания, включително и захарен диабет тип 2 (ЗД2) и предхождащите го инсулинова резистентност и нарушен въглехидратен толеранс (НВТ). Натрупаха се доказателства, че хроничното ниско-степенно възпаление има място в метаболитния контрол. Възлагат се надежди за приложението на протеини с различно участие в инфламаторния отговор да послужат като маркери за оценка на риска от ЗД2 или неговата прогресия, както и да се използват с терапевтична цел. Публикуваните резултати не винаги са еднопосочни, което илюстрира сложният характер на имунния отговор и повлияването му от екзогенни фактори, а преоценяването им в нови условия и популации допълва актуалните познания в областта.

Установяването на повишен, включително генетичен риск от заболяване с хроничен ход и социална значимост, каквото е ЗД2, предполага мотивиране на пациента и лекуващия лекар за редовна клинична и лабораторна оценка, промяна в стила на живот, своевременно диагностициране и лечение. Смисълът от търсенето на полиморфизми, предопределящи предразположеността към ЗД2 или кое да е друго заболяване, се състои и в анализирането на биологичния ефект от тези генетични варианти, на който медицината да се базира в следващите си превантивни или терапевтични стратегии. Генетичният риск при ЗД2 е наблюдаван в при полиморфизми, кодиращи цитокини и други протеини, участващи във възпалението, което прави ролята на имунната система в патогенезата на заболяването още по-комплексна.

1. Литературен обзор

1.1 Епидемиология на захарен диабет тип 2 и затлъстяване в световен мащаб и у нас

Захарният диабет е хронично заболяване, при което се наблюдава трайно повишение на нивото на плазмената глюкоза вследствие абсолютно или релативно намалена секреция на инсулин [19]. По данни на атласа на Международната Диабетна Федерация (International Diabetes Federation – IDF) през 2015 г. броят на диабетно болните е бил 415 милиона, като 90% от тях са със ЗД2 и той все още остава недиагностициран при всеки втори възрастен [273].

Броят на хората със захарен диабет в България през 2012 г. възлиза на 577 124 (9,6% от населението над 20-годишна възраст) – 337 980 мъже и 239 144 жени. Приблизително 426 831 (73,9%) са с диагностицирано заболяване, а около 150 293 (26,1%) остават недиагностицирани [1].

Смята се, че поне 318 милиона души в световен мащаб са с НВТ [IDF, 2015.]. В България около 222 433 души (3,7% от населението над 20-годишна възраст) са с предиабетно състояние [1].

Годишно между 5 и 10% от лицата с нарушена гликемия на гладно (НГГ) или НВТ развиват ЗД2, при комбинацията им – до 19%, и рискът това да се случи зависи от физическата активност, културата на хранене, разпределението на мастната тъкан, възрастта, фамилната обремененост, етническа принадлежност и други [582]. Счита се, че до 70% от лицата с предиабет в крайна сметка развиват и ЗД2 [427, 582].

Затлъстяването е сред водещите рискови фактори за развитие на ЗД2 [8]. Над една трета от населението в света има затлъстяване или наднормено тегло и според прогнозите още следващото десетилетие то ще обхване над 50% от възрастните в световен мащаб [260]. Данни за високата му честотата започват от САЩ и някои западно-европейски страни и макар тенденцията за повишаването му там да продължава, значително по-високи темпове в тази насока днес се констатират в развиващите се страни. Статистиката за страни от Близкия изток, централна Америка, островни държави в Карибския басейн и

Тихия океан заемат водещи позиции с над 40% затлъстяване при мъже и жени над 20 годишна възраст [202].

Към 2012 г. 33,2% (около 2 милиона) от лицата над 20 годишна възраст в България са със затлъстяване, а други 37,0% (около 2,3 милиона) имат наднормено тегло [1], дефинирани чрез изчислението на индекса на телесна маса (ИТМ) [665].

Затлъстяването е свързано с риск от хронични заболявания и по-ниска очаквана продължителност на живота [11, 464]. То увеличава риска от захарен диабет тип 2 [54], сърдечно-съдова заболеваемост [207], малигнени състояния [83], влошава прогнозата след травма и е свързано с по-висока честота на усложненията при хоспитализация [143, 206].

Въпреки, че се наблюдава асоциация между стойността на ИТМ и смъртността от общи и сърдечно-съдови причини [56], съчетанието му с обиколката на талията, отразяваща абдоминалното затлъстяване [20] има много по-силна предиктивна стойност в този аспект [114, 324, 472]. Патогенезата на метаболитните отклонения при централен тип затлъстяване е част от тази на ЗД2 и през последните десетилетия се обърна изключително внимание на мястото на имунната система в нея [223]. Свързаното с обезитета хронично възпаление се обсъжда като част от патогенезата и на хипертоничната болест [398], атеросклерозата [363], стеатозата на черния дроб [596], сънната апнея [85], карциногенезата [46].

1.2 ЗД2 като състояние на хронично ниско-степенно възпаление

Инсулиновата резистентност има водещо място в развитието на ЗД2 [342] и са обсъждани множество причини за нейното възникване [697]. Те включват липотоксичност, митохондриална дисфункция, оксидативен стрес, стрес на ендоплазматичния ретикулум (ЕР), хиперинсулинемия, локална хипоксия и други, които не са независими от подходящия генетичен терен и процесите на стареене [697]. Най-сериозен интерес обаче в момента предизвиква мястото на имунната система в потискането на отговора към инсулиновото действие [697], но ЗД2 не би настъпил без изчерпването на секреторните възможности на бета-клетките в панкреаса [80, 293]. Много

фактори са обсъждани като причина за тяхната апоптоза – натрупване на амилоид, хроничната хипергликемия и излишъкът от дълго-верижни мастни киселини, натрупване на продукти на непълно окисление на мазнините, оксидативен стрес и стрес на ER, но и ангажиране на имунната система чрез активиране на инфламаторни сигнални пътища, стимулиране на Interleukin 1 β (IL-1 β) зависима продукция на Fas рецептор и др. [223].

ЗД2 се очертава като състояние, свързано с хронично субклинично възпаление, съпътстващо метаболитните отклонения, наблюдавани още на етап НВТ, еволюиращ в трайна хипергликемия и последващите от нея съдови усложнения [2, 223].

ЗД2 се характеризира с повишено ниво на острофазови протеини и цитокини, макар и несравнимо по-малко спрямо динамиката на тези показатели при остри инфекциозни състояния [470]. Повишението им обаче съпътства метаболитния синдром още преди трайната хипергликемия [180, 196, 601] и серия проучвания показват стойността на много от тях като предиктивни маркери в развитието на ЗД2 – C-reactive protein (CRP) [49, 181, 193]; Interleukin 6 (IL-6) [477, 560]; IL-1 β [560], инхибитор на плазминогенния активатор 1 (Plasminogen activator inhibitor-1 - PAI-1) [181]; броят левкоцити [528, 641], фибриноген [181, 528]; моноцитен хемоатрактантен протеин 1 - monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) [242] и др.

Въпреки, че хроничното субклинично възпаление се асоциира предимно с обезитет, предиктивната стойност на инфламаторните показатели в дефинирането на риска от ЗД2 е независима от ИТМ, физическата активност или други диабетогенни фактори, като се счита, че най-висок принос в тази оценка има CRP [49, 193, 261, 477, 560]. Все пак, има проучвания, показващи загуба на статистическа достоверност за повишения риск след съгласуване на участниците по ИТМ [181, 608], което потвърждава немалката роля на мастната тъкан в патогенезата на ЗД2.

Освен като маркери за риска от ЗД2 и чисто теоретичния принос в изясняването на патогенезата на метаболитните промени при заболяването и свързаните с него коморбидности и усложнения, смисълът от изследването на ролята на имунната система е включването ѝ в търсенето на нови възможности за лечение, контрол или превенция на тези състояния. Въпреки огромния напредък във възможностите за профилактика, диагностика и терапия на ЗД2, честотата му остава висока и продължава да расте, а

съдовите усложнения остават сериозен фактор в очакваната продължителност на живота и инвалидизацията [273].

Промяната в начина на живот, оптимизирането на физическата активност и редуцията на тегло сами по себе си значително допринасят за овладяването на ниско-степенното възпаление при затлъстяване, оценено чрез CRP, и намаляват честотата на развитие на ЗД2 [221, 494] Метформинът има допълнителен принос в контрола над CRP и профилактиката на ЗД2, макар и да отстъпва пред промяната в стила на живот [221], но и двата запазват ефекта в дългосрочен план [138].

Голяма част от пероралните антидиабетни средства имат благоприятен ефект върху нивото на цитокините и острофазовите белтъци независимо от чисто хипогликемизиращия ефект, за който се използват [361] – метформин [86, 519], тиазолидиндиони [217, 466], инкретин-базирана терапия [237, 349, 388, 691], в по-малка степен алфа-глюкозидазни инхибитори [126], а и нови надежди се възлагат на блокерите на натриево/глюкозния транспортер 2 в бъбреците [583].

Проучвания в насока овладяване на възпалителното състояние при затлъстяване и ЗД2 и ефекта му върху прогресията на нарушенията в гликемичния контрол и усложненията от метаболитния дисбаланс включват инхибиране на Tumor Necrosis Factor α (TNF α) [57, 144, 440, 565], потискане ефекта на IL-1 [16, 241, 339, 551, 629], както и неспецифично лечение с нестероидни противовъзпалителни средства, хлороквин, витамин Д и други [12]. Търсят се още нови възможности за постигането на метаболитен ефект и контрол над хроничните диабетни усложнения чрез анти-инфламаторен подход [12]. На този етап обаче дори и да се наблюдава благоприятен ефект, той е временен, с неизвестен ход в дългосрочен план, неясно място в сърдечно-съдова смъртност и на непренебрежима цена по отношение на странични ефекти. Със сигурност предстои още дълъг път преди ниско-степенното хронично възпаление при затлъстяване и ЗД2 да стане обект на лечение с цел постигането на оптимален метаболитен контрол.

1.2.1 Прояви на хроничното възпаление в мастната тъкан

Бялата мастната тъкан служи като депо за енергиен субстрат под формата на триацилглицериди (ТАГ) [15]. Тя обаче функционира и като ендокринен орган,

секретиращ разнообразни биологично активни вещества, означавани като адипокини, с интензивност и спектър, които се различават в условията на нормално тегло и централен тип затлъстяване [7, 448].

Днес се счита, че затлъстяването се съпътства от ниско-степенно хронично възпаление, свързано с увеличената продукция на про-инфламаторни цитокини, основен източник на които се явяват инфилтриралите мастната тъкан клетки на имунната система и хипертрофиралите адипоцити [214]. Това възпаление е означавано още като „метаболично“ и все повече данни се натрупват в доказателство за приноса му в индуцирането на инсулинова резистентност и ЗД2 както в експериментални модели, така и при хора [709].

Първите данни за ангажирането на бялата мастна тъкан в хронично ниско-степенно възпаление са получени в експериментални модели на затлъстяване и ЗД2, при които е наблюдавана повишена локална експресия на матрична РНК (мРНК) на TNF α , увеличено локално и системно ниво на цитокина, неутрализацията на чийто кодиращ ген подобрява инсулиновата чувствителност [256].

Следваща стъпка в дефинирането на биологичната активност на мастната тъкан е описанието на лептина [715] и ролята му в регулацията на поведението на храненето, енергийния разход и метаболизма [191], изолирането на лептиновия рецептор [598] и концепцията за лептинова резистентност при лица със затлъстяване [109]. Той е про-инфламаторен адипокин – допринася за произвеждането на TNF α и IL-6, на лиганди за хемокини (CCL3, 4, 5) и свободни радикали [309, 521]. Стимулира секрецията на цитокини, присъщи за активацията на тип 1 T-helper (Th1) имуен отговор – IL-2, interferon γ (IFN γ), и потиска тази, характерна за Th2 имуен отговор – IL-4 [374], а самият той се повишава в отговор на инфламаторна стимулация [165, 337]. Така лептинът се оказва ключово звено в поддържането на хронично ниско-степенно възпаление, каквото наблюдаваме при затлъстяване [269].

Мастната тъкан е източник на разнообразни други про- (IL-6, визфатин, резистин, хемерин, MCP-1, PAI-1, ретинол свързващ протеин 4 (retinol binding protein 4 - RBP4) и анти-инфламаторни протеини (адипонектин, апелин, трансформиращ растежен фактор бета (transforming growth factor beta - TGF β), IL-10, IL-4, IL-13, IL-1 рецепторен

антагонист – (IL-1 receptor antagonist - IL-1RA), чието ниво е променено при затлъстяване спрямо концентрацията им при нормално телесно тегло и заедно участват в модулирането на инсулиновата резистентност [448, 473]. Въпреки, че глутеоефеморалното затлъстяване е свързано с намален метаболитен риск [391], подкожно разположената мастна тъкан също има потенциал за секреция на инфламаторни протеини [473].

Няколко фактора се обсъждат като възможен тригер за възпалителните промени в мастната тъкан. Увеличаването на теглото е свързано с хипертрофия и хиперплазия на адипоцитите, които могат да станат източник на цитокини [548], да провокират стрес на ЕР [257]. Увеличаването обема на мастната тъкан е свързано с релативна недостатъчност на кръвоснабдяването, водещо до местна хипоксия и възпаление [696]. Свободите мастни киселини (СМК), които са в излишък при затлъстяване, са лиганд за Toll-like рецепторите (TLR), активирането на които задейства каскада от про-инфламаторни сигнални пътища [538].

В мастната тъкан се съдържа т.нар. стромална васкуларна клетъчна фракция, включваща предипоцити, фибробласти, ендотелни и дендритни клетки, Т-лимфоцити, мастоцити, макрофаги и гранулоцити. Всички те търпят количествени и фенотипни промени при повишението в теглото, за които се счита, че имат водещ спрямо този на адипоцитите принос към поддържането на инфламаторна среда и настъпването на инсулинова резистентност [103, 397, 682].

Адипоцитите и макрофагите притежават редица функционални сходства, чрез които съвместно допринасят за генерирането на инсулиновата резистентност в условията на затлъстяване. Така например, инфилтриращите мастната тъкан макрофаги могат да акумулират липиди [480]. Прекурсорите на адипоцитите имат изявен потенциал за фагоцитоза и могат да се трансформират в макрофаги при определена стимулация [95]. Адипоцитите и макрофагите проявяват сходство в спектъра от експресирани гени и използват общи сигнални пътища в синтеза на инфламаторни протеини, които могат да повлияят инсулиновата чувствителност [657].

Макрофагите в мастната тъкан при затлъстяване произхождат и от циркулацията [442], привлечени от секретирани от хипертрофиралите макрофаги хемоатрактанти като MCP-1 [296, 297]. Неговото ниво е повишено при затлъстяване и корелира с показателите

за антропометрична оценка, индекса на инсулинова резистентност и нивото на CRP и IL-6 [311].

Генетично усилената или потисната експресия на MCP-1 води до увеличена или съответно намалена инфилтрация на мастната тъкан с макрофаги, независимо от наличието на затлъстяване при експерименталните модели [296, 297]. Сходни резултати се наблюдават и при генетично потиснатата експресия на рецептора за MCP-1 - C-C chemokine receptor-2 (CCR2) или фармакологично инхибиране на неговата активност - [654]. Намалена инфилтрация с макрофаги се наблюдава и при инхибирането на други хемокинови рецептори като CCR5 [314].

Освен в количествен аспект, макрофагите в мастната тъкан се променят и във функционално отношение. При обезитет доминират класически активираните M1 макрофаги, секретирани предимно про-инфламаторни цитокини IL-1 β , IL-6, TNF α , за сметка на алтернативно активираните M2 макрофаги, произвеждащи предимно анти-инфламаторните IL-10 и IL-1RA [197, 380]. Доминиращата про-инфламаторна среда кореспондира със задълбочаваща се инсулиновата резистентност [655]. Инфилтрацията с макрофаги корелира с увеличението на мастната тъкан както при експериментални модели, така и при хора [655, 682]. Обратно, отслабването се асоциира с редуция в броя на инфилтриращите макрофаги [87, 323], но не и в условията на рязък спад на теглото [578].

Т-лимфоцитите в мастната тъкан имат отношение към активирането на макрофагите. Богатата на мазнини диета предразполага към увеличаване на Th1 лимфоцитите за сметка на Th2 [669] и затлъстяването е свързано с доминиране на про-инфламаторни CD8 $^{+}$ и CD4 $^{+}$ Th1 и с намаляване на овладяващите инфламаторния отговор Т регулаторни лимфоцити в мастната тъкан - както при експериментални модели, така и при хора [182, 669]. Стимулацията на Th1 лимфоцити се асоциира със секрецията на цитокини (IFN γ , IL-2), които водят до генерирането на M1 макрофаги, секрецията на про-инфламаторни цитокини (IL-1, IL-6, TNF α), експресия на индуцируема азотен оксид синтетаза (inducible nitric oxide synthase – iNOS) и продукцията на свободни радикали като reactive oxygen species – ROS. Обратно, доминирането на тип Th2 цитокини (IL-4, IL-13) дава възможността за алтернативно активиране на макрофагите и произвеждане на анти-

инфламаторните цитокини (IL-10) и потискане това на про-инфламаторните, който ефект обаче е потиснат в условията на висцерално затлъстяване [208].

Дендритните клетки, ключови антиген представящи клетки, също увеличават броя си в мастната тъкан и черния дроб при мишки след богата на мазнини диета [497, 567]. Експериментални модели с липсващи дендритни клетки показват ограничена инфилтрация на макрофаги в мастната тъкан и черния дроб, а функционалните особености на дендритни клетки от стромалната васкуларна фракция на мишки с нормално тегло и затлъстяване се различават в насока потенциал за стимулация на про-инфламаторен отговор [58].

Друга популация клетки на имунната система, която се изолира от стромалната васкуларна фракция на мастната тъкан, са **еозинофилите**. Те секретират IL-4, допълвайки и асоциирайки се с активността на M2 макрофагите. В условията на богата на мазнини диета количеството им в мастната тъкан от миши модели е редуцирано [677].

Преадипоцитите, малки ядрени клетки с по-ниско съдържание на липиди спрямо адипоцитите, увеличават броя си при затлъстяването [400]. Предполага се, че те са междинен етап в адипогенезата с произход от мезенхимни стволови клетки в мастната тъкан [90]. Наблюдавана е понижена експресия на гени, отговорни за диференциацията им към адипоцити (например гените, кодиращи peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 и 2, глюкозен транспортер GLUT4, адипонектин, свързващ протеин на елемент на стероловия рецептор 1c, резистин, перилипин, липопротеин липаза и др.) в условията на инсулинова резистентност [218, 282, 400], което е свързано и с повишеното локално ниво на TNF α и IL-6 [218] и инфилтрацията с макрофаги [370]. Наблюдения върху култивирани преадипоцити демонстрират по-високия им инфламаторен потенциал от диференцираните адипоцити - произвеждат по-високо количество IL-6, MCP-1 и други лиганди за хемокинови рецептори от адипоцитите [476]. Те имат и потенциал за диференциация в насока макрофаги [95].

1.2.2 Прояви на ниско-степенното хронично възпаление извън мастната тъкан.

Свързаното със затлъстяването хронично възпаление не се ограничава до морфологични и функционални промени само в мастната тъкан. Повишеният приток на СМК вследствие усилената липолиза при затлъстяване, хиперинсулинемията, дисбалансът в адипокините допринасят за развитието на стеатоза на черния дроб, липотоксичност и възпаление [676].

В синусоидите на черния дроб се намират локални макрофаги – Купферови клетки, които имат своята роля спрямо антигени, постъпващи през порталната венозна система [504]. При затлъстяване те търпят функционални промени и са важен източник на MCP-1 в черния дроб. Заедно с тях в черния дроб се отчита и инфилтрация на CCR2+ моноцити, първоначално описани като миелоидни клетки [438], които се диференцират в макрофаги с про-инфламаторен потенциал. Те се различават от купферовите клетки по морфологични особености и експресирани повърхностни молекули и се явяват основният генератор на инфламаторната среда в черния дроб в условията на затлъстяване [417]. Черният дроб, подобно на мастната тъкан, е източник на протеини, които се асоциират с метаболитните явления в други органи като самата мастна тъкан или скелетните мускули, и в литературата дори са означавани като хепатокини [443]. Пример за това е α 2-HS-гликопротеин (фетуин-А), чиято секреция е увеличена при стеатоза на черния дроб и неалкохолен стеатозен хепатит без това да се асоциира с увеличението на бялата мастна тъкан и свързаните със затлъстяването функционални и морфологични промени в нея [566]. Той участва в дефинирането на инсулиновата чувствителност [561] и вероятно в патогенезата на ЗД2 [279]. Други хепатокини, някои от които се произвеждат и от мастната тъкан и от мускулите и които имат отношение към инсулиновото действие и обмяната на глюкозата и липидите, са IL-6, фибробластен растежен фактор 21, химерин и други [443].

Неотдавна скелетната мускулатура също бе определена като ендокринен орган, след като стана ясно, че тя също е източник на биологично активни вещества – миокини [172]. Сред тях са иризин, фибробластен растежен фактор 21, IL-6, IL-4, IL-7, IL-8, IL-15 и други [443]. Освен, че имат автокринно и паракринно действие и повлияват локално

метаболическите процеси, те са отговорни за системните ефекти на физическата работа и приноса ѝ в редуцията на риска от сърдечно-съдови заболявания, ЗД2, карциногенеза. [462]. Свързаната със съкращението на скелетната мускулатура секреция на миокини участва в усвояването на глюкозата, бета-окислението на липидите, липолизата на локално ниво, но и с липидния и въглехидратен метаболизъм в други инсулин-зависими органи като мастната тъкан и черния дроб [443], с което допринасят за определянето на метаболическия риск при заседналият начин на живот.

1.2.3 Някои инфламаторни маркери

Про-инфламаторните цитокини са ключови фактори в потискането на инсулиновата чувствителност при централен тип затлъстяване [593]. Те са не само белег на хроничното ниско-степенно възпаление при метаболическия синдром, но и служат като прогностични фактори за развитието на ЗД2 [477, 560]. Сред най-мощните цитокини с про-инфламаторно действие са IL-1 β , IL-6, TNF α и всеки от тях има индивидуален принос в потискането на инсулиновото действие [341].

1.2.2.1 IL-1 β

IL-1 β е представител на суперсемията на IL-1, произвеждани в отговор на стимулация на TLR4 и други рецептори и задействане на сигнални пътища с участието на nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B) и митоген-активирани протеин кинази (MAPK) [47]. Метаболизирането на IL-1 β до активен цитокин от неговия прекурсор (про-IL-1 β) се осъществява с инфламазомен комплекс, съставен от протеин с нуклеотид-свързващ домейн, богат на левцинови повтори (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat protein 3 - NLRP3 protein), адапторен протеин ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain) и каспаза-1 [412]. Самият интерлевкин от своя страна може да стимулира секрецията на други про-инфламаторни цитокини след свързването на специфичен рецептор (IL-1 receptor 1 - IL-1R1) и ново активиране на сигналните пътища на NF- κ B и MAPK (включващ c-Jun N-терминална киназа (JNK), Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK), p38) [392]. Неговото действие се антагонизира от IL-1RA [47].

Доказателства за ролята на IL-1 β в патогенезата на свързаните със затлъстяването метаболитни отклонения са повишената експресия на цитокина и неговия рецептор в мастната тъкан на експериментални модели и хора [288], която намалява след редукция на тегло [419], предотвратяването на НВТ вследствие богата на мазнини диета при мишки, при които не се експресира IL-1R1 [399], благоприятният ефект IL1-RA върху гликемичния контрол при обезни модели [522], подобряването на инсулиновата чувствителност след блокиране на инфламазомния комплекс [572]. Периферното ниво на IL-1 β при лица със затлъстяване е повишено [560] и се асоциира с повишен риск от развитие на ЗД2 [560].

1.2.2.2 TNF α

TNF α е мощен про-инфламаторен цитокин, секретирани преимуществено от моноцити и макрофаги също след стимулация на NF κ B и JNK сигнални пътища, който след активиране на рецептора си също задейства каскадна сигнализация и продукция на други интерлевкини [96].

Вече стана въпрос за установяване на повишението му при експериментални модели на затлъстяване [256]. Потискането на действието на TNF α чрез блокиращи антитела или с делеция на гена, кодиращ самия цитокин или неговия рецептор, води до подобрене в инсулиновата чувствителност при гризачи [255, 627]. Той се повишава и при хора с покачване на теглото и намалява при отслабване [254, 307]. Днес е ясно, че основният му произход при затлъстяване е от инфилтриращите мастната тъкан макрофаги [655, 682].

1.2.2.3 IL-6

IL-6 е плейотропен цитокин с разнообразие от биологични функции в имунния отговор, възпалението, онкогенезата и хематопоезата [424]. Оказва ефекта си чрез стимулация на JAK/STAT (Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription) сигнален път [516, 622]. В мастната тъкан се секретира предимно от инфилтриращите макрофаги, в по-малка степен от адипоцитите [655]. Нивото му корелира със степента на затлъстяване [640],

като висцералната мастна тъкан се отличава с по-интензивна секреция от подкожната [194], а при отслабване серумните стойности на IL-6 намаляват [50, 292, 584]. Приложението на рекомбинантен човешки IL-6 води до дозо-зависимо покачване на плазмената глюкоза при хора, придружено от покачването на глюкагона [616]. Наблюденията на ефекта му върху гризачи показва стимулиране на чернодробната продукция на глюкоза чрез повишаване на глюкагона, последвани от реактивна хиперинсулинемия [573]. IL-6 обаче може да има и ограничаващ възпалението в черния дроб ефект, да окаже системно подобрене в инсулиновата чувствителност [678], както и да потиска чернодробната глюкозна продукция [272]. Това демонстрира комплексния характер на неговото действие по отношение на въглехидратния метаболизъм и инсулиновата чувствителност.

На ниво скелетна мускулатура физическо натоварване стимулира секрецията на IL-6 (миокин), което се последва от по-високо произвеждане на анти-инфламаторни цитокини като IL-10, IL-1RA [463]. Покачването на IL-6 при тази ситуация не е съпроводено от скок в секрецията на TNF α или други инфламаторни маркери, освен при енергична физическа работа [463]. Тази динамика в интерлевкиновата експресия при физическа работа има отношение към метаболизма, стимулирайки окислението на мастните киселини, транспорта на глюкозния транспортер GLUT4 към плазмената мембрана и базалното усвояване на глюкоза *in vitro* и инсулин-зависимото усвояване на глюкоза при хора [461, 88]. Известно е, че IL-6 има не само про-, а и анти-инфламаторен ефект, контролирайки възпалението на местно и системно ниво [681], и приносят му и в индуцирането на инсулинова резистентност и ЗД2 също не е еднозначен [643]. Така или иначе повишеното серумно ниво на IL-6 се свързва с риск от ЗД2 [645].

1.2.2.4 IL-18

IL-18 принадлежи към суперфамилията на IL-1 [140]. Произвежда се от моноцити/макрофаги, ендотелни клетки, гладко мускулни клетки и др. Той е про-инфламаторен цитокин и стимулира експресията на адхезионни молекули, хемокинови рецептори, GM-CSF, IFN γ , TNF α , IL-1 β , активира Th1 или Th2 имуен отговор, като освен в имунната защита срещу инфекции, IL-18 участва и в имунологичните промени при

атопични, автоимунни и хронични възпалителни заболявания [140, 141, 425]. Подобно на IL-1 β , също се произвежда като прекурсор – про IL-18, който се активира чрез капсаза 1 с помощта инфламазомен комплекс [537]. Друг елемент от контрола върху неговото действие е свързването с IL-18 свързващ протеин (IL-18 binding protein – IL18BP) [437].

Подобно на IL-1 β , TNF α и IL-6, и нивото на IL-18 е повишено при затлъстяване и метаболитен синдром [33, 155, 158] и се редуцира след загуба на тегло [158]. Наличието на метаболитен синдром е свързано с по-високи стойности на интерлевкина отколкото при случаите, в които има само затлъстяване - така както се констатира и за IL-6, TNF α , CRP [631]. Също като други про-инфламаторни цитокини, и IL-18 може да се произвежда от адипоцити (адипокин) [549, 675], но те не са основният източник на цитокина в мастната тъкан [166].

Повишаване на IL-18 е констатирано *in vivo* при остро покачване на кръвната захар при здрави доброволци и лица с НВТ [157], а впоследствие и при лица с новодиагностициран ЗД2 се проследяват значително по-високи стойности на интерлевкина отколкото при недиагетици [39, 156]. Повишението му корелира с нивото на редица показатели за оценка на метаболитния риск – ИТМ, обиколка на талията, контрол над АН, триглицериди и HDL холестерол, базален инсулин и плазмена глюкоза на гладно (ПГГ) [39, 161, 266], както и с индекса homeostasis model assessment of insulin resistance (НОМА-IR) [184]. Покачването на IL-18 има предиктивна стойност в дефинирането на риска от предиабет [74], ЗД2 [74, 246, 607], която е независима от останалите показатели, отразяващи подлежащото хронично субклинично възпаление [607], както и в определянето на сърдечно-съдовия риск в рамките на метаболитен синдром [614].

1.2.2.5 C-реактивен протеин

CRP е съставен от пет идентични субединици, представител на пентраксините, чиято секреция от черния дроб е контролирана от цитокини като IL-6 [606]. Първоначално описан като острофазов белтък [384, 604], едва пред 90-те години на ХХ век се обръща внимание на ролята му в дефинирането на сърдечно-съдовия риск [500]. Физиологичната му роля се състои в калций-зависимо свързването на лизофосфолипиди, експресирани от бактерии, но и от некротични клетки или такива, подлежащи на апоптоза, след което

активира комплемента. CRP може да играе ролята и на опсонин, да свързва Fc рецептори и да индуцира продукцията на инфламаторни цитокини [606]. В условията на бактериална инфекция плазмената му концентрация може да нарастне до 10 000 пъти – от 50 µg/l до над 500 mg/l [465]. Покачване на нивото му се констатира още в първите часове на възпаление и тъканна увреда и спада бързо след нейното овладяването [465]. Има водещо място в диагностиката, оценката на активността и ефекта от лечението при инфекциозни и неинфекциозни остри и хронични възпалителни заболявания, състояния, свързани с некроза, включително инфаркт на миокарда [465]. Днес CRP се свързва и с поддържането на хронично субклинично възпаление [116], включително това при затлъстяване [638], и се използва като прогностичен маркер за оценката на риска от сърдечно-съдови заболявания [501], но и не само. Проучвания установяват предиктивната му стойност и в развитието на други състояния, като ЗД2 [49, 181, 193, 645].

Про-инфламаторният, про-коагулантен и про-атерогенен ефекти на CRP, наблюдавани и при метаболитен синдром, се изразяват в индуцираните от повишеното му ниво промени във функционалната активност на моноцити/макрофаги и ендотелни клетки – промяна в съотношението между класически и алтернативно активирани макрофаги [133], индуциране секрецията на про-инфламаторни протеини и свободни радикали, потискане тази на IL-10, експресия на хемокинови рецептори, усилено освобождаване на матриксни metalloпротеази и усвояване на окислени LDL [544], намаляване ефлукса на холестерол при генерирането на пенести клетки, стимулиране освобождаването на PAI-1 и редукция в това на тъканния плазминогенен активатор и не на последно място принос в индуцирането на ендотелна дисфункция чрез потискане на ендотелната NO синтаза и други медиатори на вазодилатацията като простаглицин [135].

1.2.4 Възпаление и инсулинова резистентност

Един от водещите фактори на потискане на инсулиновото действие е липотоксичността [697]. Затлъстяването е свързано с повишено ниво на неестерифицирани или свободни мастни киселини (СМК). Първата хипотеза за приноса им в инсулиновата резистентност изказват Randle и сътр. с идеята, че СМК се конкурират с глюкозата в процесите на окисление в инсулин-чувствителните клетки [493]. Впоследствие бе демонстрирано, че метаболити на СМК като диацилглицерол, церамиди и дълго-верижан ацетил ко-ензим А

имат потенциала чрез протеин киназа С (PKC) да активират протеин кинази, участващи в отговорни за синтеза на възпалителни протеини сигнални пътища. Самите кинази осъществяват и фосфорилиране на серинови остатъци на инсулин-рецепторния субстрат (IRS), с което блокират хормоналното действие в черния дроб и мускулите [541]. Освен това метаболитите имат потенциала да увеличат продукцията на свободни радикали - отново свързани с активирането на серин кинази, или да повлияват на инсулиновото действие чрез продуктите на самите сигнални пътища, медиращи възпаление [484]. СМК активират и TLR, чрез които могат да стимулират цитокинова секреция [538].

Това потвърждава, че биохимичните процеси, отговорни за осъществяването и контролирането на активността на имунната система, имат централно място в инсулиновата резистентност.

1.2.4.1 Серин-фосфорилиране на IRS

Фосфорилирането на сериновите остатъци на IRS води до блокиране на сигнала от инсулиновия рецептор. Главна роля в тази насока играят киназа β на инхибитора на NF κ B (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase β - IKK β) – част от NF- κ B сигнален път, и JNK – част от MAPK сигнален път. Активирането на тези сигнални пътища се наблюдава при стимулация на TLR и цитокинови рецептори, които в крайна сметка водят до мобилизирането на транскрипционните фактори като NF κ B комплекс и активиращ протеин-1 (AP-1). Те отново стимулират експресията на инфламаторни гени и затварят един порочен кръг [594].

Приносът на IKK β и JNK в инсулиновата чувствителност и свързаното със затлъстяването възпаление е наблюдаван в експериментални модели с изключена експресия на двата ензима, водеща до предотвратяване на метаболитните и инфламаторни отклонения провокирани от богата на мазнини диета [37, 245, 628]. Водещо място в потискането на инсулиновата чувствителност по този механизъм е демонстрирано за TNF α [13, 201]. По същия път се повлиява инсулиновото действие и от оксидативен стрес [162] и от стреса на ER [449]. Последният настъпва вследствие реакция на организма към натрупване на новосинтезирани белтъци, които не са приели своята третична структура. Тази реакция се изразява в потискане трансляцията и синтез на нови протеини,

разграждане на неправилно нагънатите и засилване синтеза на фактори, наречени шаперони, спомагащи за правилното конфигуриране на белтъчната верига [701]. Невъзможността за овладяване на нарушенията, свързани с нагъването на протеините, може да бъде причинена от генетични фактори, процесите на стареене, метаболити, инфекции, хипоксия и други [532, 701]. Затлъстяването вследствие повишен калориен прием е една от причините за индуцирането на стрес на ЕР, възпаление и инсулинова резистентност. Установено е повишено ниво на маркери на стреса на ЕР в полиморфонуклеари от пациенти с метаболитен синдром [518] и ЗД2, като при последните то корелира с гликемията, липидите, индекса за инсулинова резистентност, инфламаторни цитокини и маркери на оксидативния стрес [352].

1.2.4.2 SOCS протеини

Експресията на протеините супресори на цитокиновата сигнализация (Suppressor of cytokine signaling - SOCS) се стимулира от няколко вида цитокини, като IL-6, и упражнява негативен контрол върху тяхното действие [516, 622]. Те взаимодействат с Janus-активирани тирозин кинази (JAK) или директно с цитокиновите рецептори, блокирайки фосфорилирането на тирозинови остатъци на транскрипционните фактори STAT [344]. SOCS1, 3, 6, 7 потискат и действието на инсулина, като могат директно да се свързват с инсулиновия рецептор и да предотвратяват комуникацията с IRS1 и 2, да блокират тирозин-киназната активност на рецептора, да потискат фосфорилирането на IRS2, както и да взаимодействат с фосфорилираните вече IRS1 и 2 и да спомогнат за тяхното убиквитиниране и протеозомална деградация [344].

Експресията на SOCS в черния дроб, мастната тъкан и мускулите се повишава в условията на затлъстяване и супресията на някои от тях е свързана с предотвратяването на повишението на телното, настъпване на инсулинова резистентност и развиване на стеатоза на черния дроб при експериментални модели [593].

1.2.4.3 Инфламазомен комплекс

Както вече беше споменато, метаболизирането на IL-1 β до активен цитокин от неговия прекурсор (про-IL-1 β) се осъществява с инфламазомен комплекс [412], който участва и в продукцията на IL-18 [660]. Неотдавна този комплекс бе асоцииран с инсулиновата

резистентност като компонентите на комплекса са с повишена експресия от макрофаги [659] и адипоцити [572] в мастната тъкан на лица със затлъстяване и ЗД2 [319, 632]. Липсата му при експериментални модели подобрява инсулиновото действие и предотвратява промяната в съотношение на М1/М2 макрофаги в мастната тъкан [632]. Не е ясно какво провокира активирането на инфламазомния комплекс в мастната тъкан, но се смята, че присъщата за затлъстяването липотоксичност има принос в това, а вероятно и окислени LDL, глюкоза, пикочна киселина и други фактори, които могат да стимулират произвеждането на свободни радикали [615].

1.2.4.4 Екстрацелуларен сигнал контролирани кинази

Екстрацелуларен сигнал контролирани кинази (Extracellular signal-Regulated Kinases - ERK) са част от MAPK сигнален път. Тяхната активност е увеличена при модели и хора със затлъстяване и ЗД2 [593]. Приносът им в увеличението на теглото и възникването на инсулинова резистентност отново са оценявани с модели на потисната или стимулирана експресия на киназите при мишки [70, 505]. Активираните ERK кинази фосфорилират различни субстрати със серинови и тирозинови остатъци в близост до пролинов такъв, включително серинови остатъци на IRS1 [593]. Освен това обаче, що се касае до мястото на IL-1 β при индуцирането на инсулинова резистентност, активирането на ERK може да потисне транскрипцията на гена, кодиращ IRS1 в адипоцитите [280]. Освен това, интерлевкини като TNF α и IL-6 потенцират липолизата чрез ERK и така допълнително спомагат за потискане на инсулиновото действие [693, 711].

1.2.4.5 Инхибиране на PPAR γ

Друг път, по който TNF α повлиява инсулиновата чувствителност, е чрез потискането на нуклеарния фактор peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) [695], притежаващ ключова роля в адипогенезата, метаболизма на глюкозата и липидите, рецептор за тиазолидиндионите [558]. Наблюдавано е, че TNF α постига този ефект чрез редуциране експресията на PPAR γ , потискане ДНК-свързващия капацитет на транскрипционния фактор или повлияване на функцията му чрез стимулираната експресия на ко-репресор [695].

1.2.5 Възпаление и бета-клетъчна дисфункция

Освен инсулиновата резистентност, за развитието на ЗД2 допринася и промяната във функционалните възможности на ендокринния панкреас [570] и апоптозата на бета-клетки от лангерхансовите острови [80]. Зад бета-клетъчната дисфункция стоят токсичният ефект на глюкозата, дълговерижните СМК, натрупването на амилоид, продукти на оксидативен стрес, стрес на ER, възпаление и в крайна сметка потискане на експресията на инсулина и факторите, участващи в глюкозо-зависимата му секреция (глюкозен транспортер GLUT2, глюкокиназа, волтаж-зависими калциеви канали и транскрипционните фактори, които ги регулират) и активиране на сигнални пътища, медиращи апоптозата на бета-клетките [189, 230, 304, 441].

Както хипергликемията, така и излишъкът от СМК и натрупването на метаболити от непълното окисление на мазнините индиректно ангажират имунната система чрез продуктите на оксидативния стрес и стрес от ER [416]. Тези продукти активират JNK киназа и NFκB сигнален път, които стана ясно, че участват в експресията на инфламаторни протеини [267, 625]. Блокирането на JNK кинази в експериментални модели намалява токсичния ефект на хипергликемията върху бета-клетките [298].

Все повече данни сочат наличието на инсулит не само при захарен диабет тип 1 (ЗД1), но и при ЗД2 [64]. Наблюденията върху патоморфологичните промени в панкреасните острови на експериментални модели и хора със ЗД2 сочат инфилтрация с макрофаги, като това явление се констатира още преди началото на диабет [152]. Тази инфилтрация настъпва в отговор на хемокинова сигнализация и се съпровожда от интензивна цитокинова секреция, като особено внимание заслужава IL-1β [64]. С помощта на експериментален модел на ЗД2 се наблюдава индуцирана от хипергликемия апоптоза на панкреасните бета-клетки [145]. Подобно на ЗД1, и при модели на ЗД2 се установява, че експозицията на тези клетки към трайна хипергликемия води до експресията им на Fas рецептор, който прави възможна апоптозата поради постоянната експресия на Fas лиганд от страна на бета-клетките [386]. Принос в това има индуцираната от хипергликемията секреция на IL-1β от самите бета-клетки – явление, наблюдавано *in vitro* в култури от панкреасни клетки, но и *in vivo* в панкреасни срезове от лица със ЗД2 и експериментални

модели [385]. Тази цитокинова продукция стимулира NF κ B сигналния път, експресията на медиатори на апоптозата, в резултат на които наблюдаваме бета-клетъчна дисфункция [385]. Все пак, резултатите за медираната от IL-1 β глюкотоксичност не са еднозначни [658]. Има наблюдения, че глюкотоксичността и липотоксичността при ЗД2 стимулират бета-клетъчната апоптоза по механизми, които не включват NF κ B [104]. Въпреки това, повишената експресия на IL-1 β мРНК от самите бета клетки е наблюдавана и в други студии с потвърждение на индуцираната от цитокина следваща интерлевкинова секреция като IL-6 и IL-8, включително в роля на хемоатрактанти [65]. Очевидно ролята на инфламаторните цитокини в бета-клетъчната дисфункция при ЗД2 е комплексна и предстои да бъде изяснена.

Друг фактор в бета-клетъчната апоптоза е излишъкът от СМК в присъствието на трайна хипергликемия [441]. СМК могат да медираат токсичния си ефект в островите чрез активиране на TLR и задействане на инфламаторни сигнални пътища, а IL-1 β и неговия рецептор имат централна роля в амплифицирането на възпалението [63]. Стимулираната инфламаторна среда включва и продукцията на хемоатрактанти и допринася за инфилтративните промени в лангерхансовите острови [150], които допълнително задълбочават цитокиновата секреция [699] и водят до бета-клетъчна дисфункция чрез потиснатата експресия на инсулиновия ген [26]. Блокираната експресия на TLR2 и TLR4 при експериментални модели предотвратява инфилтрацията на островите, а отстраняването на макрофагите потиска наблюдаваната интерлевкинова секреция и е свързана с по-високо ниво на мРНК на инсулина [150, 151].

NLRP3 инфламазомен комплекс може да се окаже свързващо звено между метаболитните отклонения и инфламаторната реакция при ЗД2 [226]. Липидни метаболити, окислени LDL, холестерол, както и оксидативния и стреса на ER допринасят за активиране на комплекса [148, 632, 659]. Стимулирането му е свързано с увеличена локална продукция на IL-1 β в панкреаса, а блокирането му ограничава фиброзата в лангерхансовите острови при експериментални модели със затлъстяване [702]. Един от активаторите на инфламазомен комплекс е човешки островен амилопептид или амилин, ко-секретиран с инсулин от бета клетките и образуващ амилоид в лангерхансовите острови. Ролята на последния в прогресията на бета-клетъчната загуба е наблюдавана при

експериментални модели с гризачи с помощта на трансгенен човешки амилин [633], както и при примати, където натрупването на амилоид корелира с функцията на инсулин-продуциращите клетки [259]. Освен чрез дестабилизация на мембраната и продукцията на свободни радикали, цитотоксичният ефект на амилина се осъществява и чрез продукцията на IL-1 β [394]. Първоначално стимулиран чрез TLR4 сигнализация, за което съществен принос имат СМК [538], но и други ендогенни лиганди като High-mobility group box 1 protein (HMGB1) – освобождаван при некроза или активно секретирани от клетки на имунната система [648], IL-1 β добива функционално значение в присъствието на активирания инфламазомен комплекс [412]. Наблюдавано е, че амилинът стимулира продукцията на IL-1 β от култивирани дендритни клетки и макрофаги, като принос в това има активирането на NLRP3 инфламазомен комплекс [394]. Тези резултати са потвърдени и *in vivo* при трансгенни мишки, където се констатира асоциация между нивото на IL-1 β , депозирането на амилоид и редуцирането на инсулин-продуциращи клетки [394]. Така TLR и NLRP3 инфламазомен комплекс се оказват ключови звена от инфламаторните промени в ендокринния панкреас при ЗД2 [663].

1.3 Toll-like рецептори

Активирането на неспецифичната имунна система включва разпознаването на запазени в еволюцията повтарящи се молекулни последователности, характерни за микроорганизмите и означавани като pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Сред рецепторите, които могат да свързват такива последователности, са Toll-like рецепторите (TLR) [586]. Те участват в първия контакт с патогенните микроорганизми и са абсолютно необходими за фагоцитозата и възпалението като част от неспецифичния имунен отговор [587].

За пръв път TLR са описани при *Drosophila* [229], а впоследствие ролята им в неспецифичния имунен отговор е наблюдаван и при хора [401].

Първият описан „Toll рецептор“ представлява трансмембранен протеин с богат на левцинови повтори лиганд-свързващ екстрацелуларен домейн, трансмембранен домейн с единична спирали и интрацелуларен, хомоложен на този на рецептора за IL-1, опосредствяващ вътреклетъчната сигнализация, а именно чрез NF- κ B сигнален път [401]. Впоследствие се идентифицират още сходни по структура рецептори, обозначавани също като TLR. Днес са известни десет TLR (1-10) при хора [586].

Интрацелуларната компонента на TLR наподобява тази на IL-1R и днес в литературата тя се споменава като Toll/IL-1 receptor (TIR) домейн. Екстрацелуларният домейн обаче съществено се различава от подобния на имуноглобулин такъв на IL-1R [586]. Основни лиганди за TLR2 са например пептидогликани и липопротеини, присъщи за Грам+ бактерии, а за TLR4 липополизахарид (ЛПЗ) от Грам– бактерии [586]. TLR рецепторите образуват димери и комплекси с допълнителни молекули, което позволява свързване с още широка гама молекули с характерни повтарящи се последователности [18]. В това число влизат и разнообразие от ендогенни лиганди (Таблица 1), с което TLR участват в генерирането на инфламаторен отговор в стерилна среда, считан за част от патогенезата на усложненията от хипоперфузия, както и редица хронични възпалителни, автоимунни, онкологични заболявания [703]. Ендогенните лиганди са описвани в литературата още като „алармини“ и danger-associated molecular patterns (DAMPs) – сигнал за клетъчна увреда [60].

Таблица 1. Лиганди за TLR.

Рецептор	Лиганди	Ендогенни лиганди [703]
TLR1	Димеризира с TLR2 [590]	-
TLR2	Липопротеини, липопептиди пептидогликани от Грам+ бактерии, зимозан и др. [588]	Бигликан, ендотоксин, HMGB1, HSP6-, HSP70, миозин, хиалуронова киселина, монозидни уратни кристали
TLR3	Двойно-верижна РНК [21]	мРНК
TLR4	ЛПЗ, Грам- бактерии [454]	Бигликан, CD138, β -дефензин, α -кристалин А верига, ендотоксин, фибриноген [552], фибронектин, хепаран сулфат, HMGB1, HSP22, HSP60, HSP70, HSP72, хиалуронова киселина, резистин, сърфактантен протеин А, СМК [538], фетуин А[450]
TLR5	Бактериален флагелин [235]	-
TLR6	Димеризира с TLR2 [299]	-
TLR7	Едноверижна РНК [238]	РНК, малка интерферираща РНК
TLR8	Едноверижна РНК [238]	Миозин, малка интерферираща РНК
TLR9	Мотиви от бактериална ДНК [239]	ДНК, HMGB1
TLR10	Димеризира с TLR2, неясни лиганди [228]	-

Експресията на TLR2 и TLR4 е широко анализирана в рамките на свързаното със ЗД2 състояние на хронично ниско-степенно възпаление [117, 535], поради което биологичната им функция ще бъде разгледана по-подробно.

1.3.1 TLR4

ЛПЗ е основен компонент на бактериалната стена на Грам-негативните бактерии. Мястото на TLR4 в разпознаването на ЛПЗ е установено благодарение на няколко

експериментални модела мишки, нереагиращи на този антиген, за които се констатира, че носят мутации на *TLR4* гена [478, 485].

ЛПЗ, означаван още като ендотоксин, е макромолекулен гликолипид с хидрофобен липиден А регион и въглехидратна верига. Липидният участък се отличава със структурна специфичност при различни бактериални видове и е отговорен за имунологичната активност на ЛПЗ. Въглехидратната компонента съдържа многократно повтарящи се последователности, които също се характеризират с видово разнообразие, но допринасят малко за имунологичната активност [490].

Взаимодействието между рецептора и ЛПЗ се осъществява благодарение на няколко адапторни молекули. От една страна ЛПЗ се комбинира с ЛПЗ-свързващ протеин и CD14 [533], а от друга TLR4 се асоциира с MD-2 в комплекс [540].

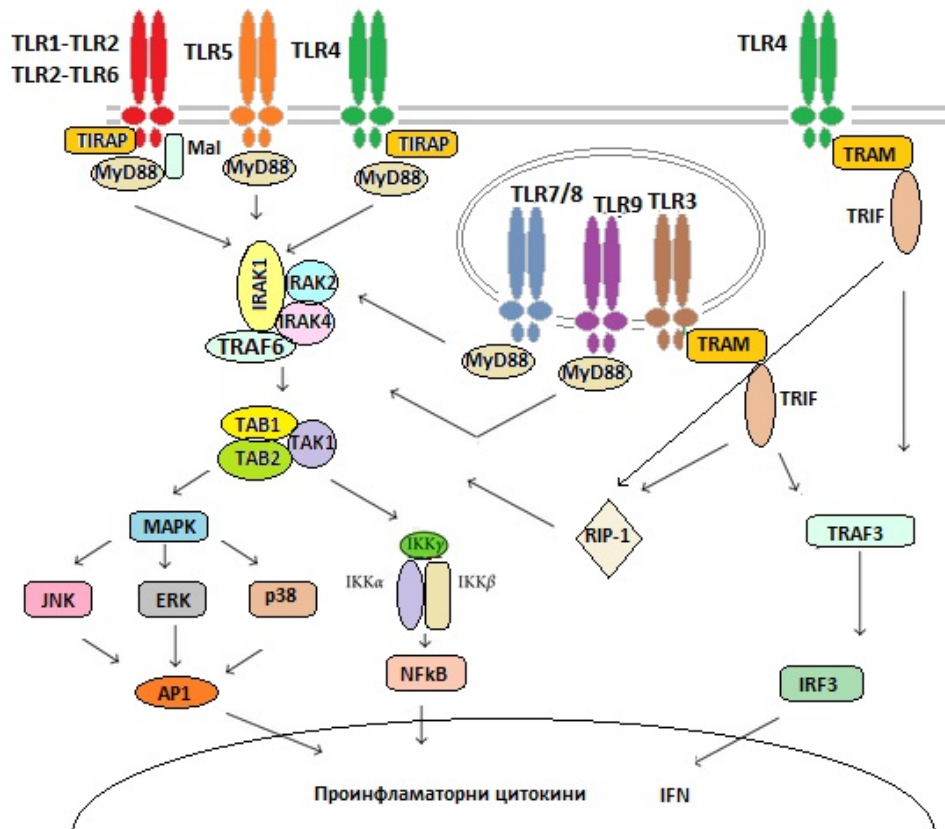
CD14 се експресира върху моноцити и макрофаги и се намира и в серума като разтворима фракция. Също като TLR принадлежи към фамилията белтъци, богати на левцинови повтори, подлежи на димеризация и структурата на молекулата му дава възможност за свързване с широк набор от лиганди [312]. Ролята му в сигнализацията на TLR4 след свързване с ЛПЗ е изучавана при експериментални модели с липсваща експресия на CD14 – те не развиват септичен шок след третиране с бактериален ЛПЗ [236].

За осъществяване на биологичната си функция TLR4 образува хетеродимер с MD-2. Последният се намира върху клетъчната мембрана в комплекс с TLR4 или като самостоятелен белтък в серума [637]. MD-2 има водещ принос в лигирането на ЛПЗ-CD14 и е абсолютно необходим за сигнализацията на TLR4 [540]. Свързването с ЛПЗ води до димеризация на комплекса TLR4/MD-2, промяна в позицията на интрацелуларните домени и присъединяване на адапторни сигнални молекули [17].

Вътреклетъчната сигнализация се осъществява по сигнален път, който е общ за всички TLR и сходен с този на IL-1R. Изключение прави само TLR3. Активирането на рецепторите води до свързването им с TIR домейните на протеина myeloid differentiation factor 88 (MyD88) и MyD88 adaptor-like (Mal) – друг адапторен протеин (наричан още TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP) [650]. MyD88-дефицитни мишки са резистентни към действието на различни известни лиганди на различни TLR [219, 235, 303, 529, 589].

Следваща стъпка е активирането на IL-1 рецепторни кинази (IL-1 receptor kinases - IRAK) и каскадна трансдукция до активирането на транскрипционни фактори чрез пътя на NF-κB или на MAPK (като JNK, p38) с ангажиране на AP-1 и стимулиране експресията на гени, кодиращи цитокини, но и фактори, участващи в клетъчната пролиферация, апоптоза и др. [454, 586] (Фигура 1).

Друг потенциален сигнален път, активиран след свързването на TLR4 с лиганд, е този на TIR-domain containing adaptor inducing interferon-β (TRIF) и неговата адапторна молекула TRIF-related adaptor molecule (TRAM). Този път се използва и в сигнализацията, включваща TLR3 [685]. Той е отговорен за активирането на транскрипционни фактори, като тези от комплекса NF-κB и интерферон-регулиращи фактори (IRFs) - отговорни за транскрипцията на интерферони тип I (IFNα, IFNβ) [685] (Фигура 1).



Фигура 1. Схема на пострецепторната сигнализация при активиране на TLR. Адаптирано от Elizabeth J. Hennessy и Luke A.J. O'Neill [240].

1.3.2 TLR2

TLR2 образува хетеродимери с TLR1 и TLR6, чрез които осъществява биологичната си функция, но са описани и димери с TLR10. Техни основни лиганди са диацил-, триацил-липopeптиди, липопротеини и пептидогликани [454, 586]. Той може да се асоциира с още ред други молекули, което позволява свързването на още широка гама лиганди от бактериален произход, но и от вируси, гъби, паразити [704].

Ендогенни лиганди на TLR2 са продукти на тъканно увреждане, некроза и потенциални туморни клетки - β -defensin-3, фрагменти на хиалуроновата киселина heat shock protein (HSP) и high mobility group box 1 protein (HMGB-1) [445].

TLR2 може да използва адапторни молекули, подобно на TLR4, като CD14 и CD36 [287], въпреки че тяхното присъствие не е задължително за активирането на рецептора. Други описани допълнителни молекули са ганглиозид GD1a [362], integrin β -3 рецептор [203], маноза-свързващ лектин [275], дектин-1 (рецептор за бета-глюкани) [178] и др.

Активирането на TLR2 също задейства MyD88 сигнален път със стимулиране на генната транскрипция по пътя на NF κ B или този на MAPK. TLR2 обаче също може да използва TRIF и TRAM в каскадната сигнализация [434] и да стимулира секрецията на IFN I [562].

1.3.3 Мястото на TLR2 и TLR4 в патогенезата на ЗД2

Активирането на TLR2 и TLR4 има водещо място в генерирането на т.нар. метаболитно възпаление. Чрез потисната експресия на рецепторите при експериментални модели е постигнато предотвратяване на увеличението на теллото вследствие богата на мазнини диета [121], както и контрол над свързаната със затлъстяването инсулинова резистентност и възпаление в мастната тъкан [474] и по-ниски инфламаторни показатели при модели на ЗД2 [136, 137].

С имунохистохимия е установена повишена експресия на TLR2 и TLR4 и MyD88 и други протеини от пострецепторната сигнализация в мастната тъкан при лица със затлъстяване и то най-интензивно в участъци на инфилтрация с клетки на имунната система – наблюдение, което корелира с ИТМ [14]. Повишена експресия на TLR4 е наблюдавана и в мастната тъкан на експериментални модели със затлъстяване и

инсулинова резистентност [538]. Наситените СМК, които намират място в индуцирането на инсулиновата резистентност в патогенезата на ЗД2 [55], активират TLR4 и с това допринасят за свързаното с диабета инфламаторно състояние [538]. Увеличено ниво на РНК и протеин на TLR4 се констатира и в скелетна мускулатура от лица със затлъстяване и ЗД2, където експресията кореспондира с активиран NFκB сигнален път и подлежи на стимулация от СМК [496].

Стимулация на TLR4 от мастни киселини е наблюдавана *in vitro* при адипоцити, дендритни клетки, макрофаги, ендотелни и гладко-мускулни клетки, остеокласти, а TLR2 - при адипоцити, макрофаги, мускулни влакна [179]. При това и двата рецептора се активират от наситени мастни киселини, докато полиненаситени дори ги инхибират [345-347]. Освен в клетъчни култури, *in vivo* стимулацията на TLR4 от СМК е демонстрирана при експериментални модели [538].

Тесните механизми на свързване на наситените мастни киселини с TLR все още не са напълно изяснени. Възможно е свързване директно с рецепторите, комплексите и димерите, които образуват, или конвертиране на мастните киселини до разпознаваеми от TLR метаболити [179]. СМК не само стимулират TLR-ната сигнализация, но и при продължителна експозиция могат да увеличат самата експресия на рецептора [496].

Независимо как точно СМК активират TLR2 и TLR4 и кои други лиганди промотират участието на рецепторите в асоциираното със затлъстяването хроничното възпаление, тяхната моноцитна експресия е стимулирана при хора със затлъстяване и метаболитен синдром и корелира както с антропометричните показатели, така и с нивото на цитокини като IL-1β, IL-6, с нивото на MCP-1 и активността на NFκB [14, 283].

Експресията на TLR2 и TLR4 е стимулирана обаче не само при ЗД2 [117], но и при лица със ЗД1 [131]. Повишена TLR2 РНК е установена и в периферни моноцити при жени с гестационен диабет спрямо жени с нормален глюкозен толеранс [333]. Тя е била по-висока сред тези жени още в началото на бременността преди развитието на нарушения въглехидратен метаболизъм за разлика от нивото и при жени, при които не настъпва гестационен диабет [333].

Хипергликемия има ключово място в активирането на имунната система [119] и един от механизмите, с които това се осъществява, е стимулацията на експресията на TLR2 и TLR4 чрез активиране на протеин киназа C (protein kinase C - PKC) и никотинамид-

аденин-динуклеотид-фосфат (НАДФ) оксидазата [118] – един от механизмите в генерирането на свободни радикали [285]. Тя също стимулира самата димеризация на рецепторите [118], а ефектът от трайно високата гликемия се допълва от излишъка СМК [119].

Ангажирането на TLR в еволюцията на ЗД2 не опира само до задълбочаването на имунния отговор, влошаващ и инсулиновата чувствителност, и бета-клетъчната функция. TLR заемат място и в патогенезата на хроничните микросъдови усложнения на диабета [137, 284], но участват активно и в процеса на атеросклероза [168, 356], рискът от развитието на която е увеличен при ЗД2 [69].

Ролята на TLR4 в атеросклерозата е безспорна [106]. Експериментални модели показват ограничаване на процесите на атеросклероза при модулирана експресия на TLR4 и TLR2 [277, 422, 539]. Повишена такава е наблюдавана от макрофаги и ендотелни клетки в атеросклеротични лезии [149, 422], както и култивирани ендотелни клетки в условия на цитокинова стимулация [170]. Активирането на тези рецептори е свързано с повишение на секрецията на адхезивни молекули (Intercellular Adhesion Molecule 1- ICAM-1; vascular cell adhesion molecule 1 - VCAM-1) [708], инфилтрация с имунни клетки [421], секреция на цитокини и протеолитични ензими [149, 415], както и образуването на пенести клетки [244], сочещи значителния принос на TLR4 и TLR2 във възпалителните промени в съдовата стена и оформянето на атеросклеротични лезии и дестабилизация на плаката. За тях допринася и експресията на рецепторите от фибробласти и макрофаги от адвентицията, наблюдавана при експериментални модели [636]. Такава е констатирана и при макрофаги от богати на липиди атеросклеротични плаки от хора и миши модели и е наблюдавано, че окислените LDL частици могат да я стимулират при култивирани макрофаги [684]. Освен ендотелни клетки и макрофаги, TLR експресират и други клетки от атеросклеротичната плака – дендритни клетки, лимфоцити, гладко-мускулни клетки [106]. Периферни моноцити при хора и експериментални модели с коронарна съдова болест също се отличават с повишена експресия на TLR [332, 403, 531]. Ендогенни лиганди, считани за активатори на TLR-свързаната сигнализация и участващи в атеросклерозата, включват хиалуронова киселина, окислени LDL частици, гликиран LDL

като един от крайните продукти на гликиране, окислени фосфолипиди, топлинния шок протетин – HSP60, HMGB1, серумен амилоид А, фибриноген, фибронектин и други [247].

Сред механизмите на възникване на микроваскуларни усложнения вследствие трайната хипергликемия при захарен диабет се обсъжда полиоловият път, оксидативния стрес, активиране на протеин киназа С, образуване на крайни продукти на гликирането (advanced glycation end products – AGEs), повишена секреция на растежни фактори [9, 599], но и възпалението [591]. Експресията на гени, кодиращи цитокини и други протеини, необходими за възпалителния отговор, се регулира от сигнални пътища с крайна цел транскрипционни фактори като комплекса на NF- κ B и AP-1. AGEs – модифицирани чрез неензимно гликиране и окисление протеини, липиди и полунуклеотиди, са ключови фактори в патогенезата на хроничните съдови усложнения от ЗД [661] и могат да активират тези пътища чрез специфичен рецептор (RAGE) [366]. Но във възпалението и на това ниво участват и TLR. Повишената им експресия от периферни моноцити при лица със ЗД1 с микроваскуларни усложнения кореспондира с увеличението в нивото на серия цитокини спрямо диабетици, при които все още не се установява късен дегенеративен синдром [134].

Възпалението като част от патогенезата на диабетна ретинопатия (ДРП) включва активиране на NF κ B сигнален път, повишена експресия на iNOS, циклооксигеназа-2, адхезивни молекули, продукция на цитокини и хемоатрактанти [591]. Свидетелство, че стимулацията на инфламаторния отговор включва експресия на TLR2 и TLR4 от ендотелни клетки в ретината, е наблюдението, че тя се повишава в условия на хипергликемия с последващи от това активиране на пострецепторните сигнални пътища и експресията на цитокини и адхезивни молекули [491, 644]. Всички тези явления биват овладявани чрез блокирането на TLR-ната активация (чрез неутрализиращи антитела, малка интерферираща РНК, инхибитор на комуникацията между TLR4 и ко-адапторните молекули) [491]. Принос в стимулираната от хипергликемията експресия на TLR2 и TLR4 има генерирането на свободни радикали, инхибирането на продукцията на които също намалява измереното количество TLR протеин [491].

Възпалението съпътства и морфологичните промени, наблюдавани при диабетната нефропатия – задебеляване на базалната мембрана, загуба на подоцити, хиперплазия на мезангиалните клетки, инфилтрация на интерстициума, тубулна атрофия [503]. Локално

повишената експресията на хемокини, адхезивни молекули и про-инфламаторни цитокини е свързана с инфилтрация на макрофаги и тяхното активиране, промяна в баланса Th1/Th2 имунен отговор, водещи до увеличаване на ендотелната пропускливост, пролиферация на мезангиалните клетки и свръх-продукция на екстрацелуларен матрикс, експресия на фибронектин, нарушаване баланса между вазодилататори и вазоконстриктори и други [503]. TLR4 допринася за възпалителните промени, като данни за повишената му експресия в условията на глюкозна стимулация и активирана пострецепторна сигнализация е наблюдавана при проксималните тубулни епителни [367] и мезангиални клетки на експериментални модели [302]. Той е повишен и при биопсичен материал от пациенти с диабетна нефропатия и е показано, че повишената му експресия върху култивирани клетки от проксимален тубулен епител медира хемотаксисът на моноцити и секрецията на инфламаторни протеини [367]. Дефицитни на TLR4 модели на ЗД се характеризират с по-добри резултати относно албинурията и бъбречната функция, независимо от гликемичния контрол, при тях се открива и по-слабо представено тубуло-интерстициално възпаление [367]. Ролята на TLR2 е изследвана при TLR2-дефицитни мишки, където е наблюдаван благоприятен ефект върху подоцитната загуба и албинурията [137] потискане на моноцитната инфилтрация и експресията на гени, отговорни за възпалителния отговор и фиброза [382]. Не е изключено TLR да са в основата на автоимунна реакция в патогенезата на диабетната нефропатия [433].

Възпалението съпътства и патогенезата на диабетната невропатия. Повишени инфламаторни маркери се наблюдават при най-често наблюдаваните и форми – периферната диабетна полиневропатия (ДПНП) [147] и сърдечно-съдовата автономна невропатия [364]. Наблюденията върху експериментални модели на ЗД сочат активиране на NF κ B сигнален път в микросъдовия ендотел и швановите клетки, повишена локална експресия на адхезивни молекули и инфилтрация с макрофаги в ендоневралната обвивка на нервните влакна, подложени на исхемия и реперфузия [647]. Тези явления се асоциират и с промени в нервната проводимост [305]. В култивирани неврони в условията на висока глюкозна концентрация се установява активиране на няколко вида MAPK – JNK, p38, ERK [483].

Нивото на TNF α , CRP, разтворими ICAM и VCAM, фибриноген и други инфламаторни протеини при лица със ЗД1 и ЗД2 с ДПНП е повишено в сравнение с диабетците, които нямат такава. Още повече, нивото на някои от тях е значително повишено при болезнена невропатия спрямо случаите на безболкова форма на усложнението [147, 420]. Също така TNF α и IL-6 са повишени при периферна невропатия още на етап НВТ [359]. Повишен TNF α се установява и при автономна сърдечно-съдова невропатия при ЗД1, а IL-6 се асоциира с динамиката във функционалните показатели за нейната оценка [364].

Въпреки изложените данни за асоциацията на инфламаторните показатели с диабетната невропатия, мястото на TLR в нея е далеч по-малко изследвано отколкото при други хронични усложнения на ЗД. Доказателства в тази насока включват наблюдаваната повишена експресия на РНК и самия TLR4 от периферни моноцити при пациенти с ДПНП, като резултатите корелират с плазменото ниво на IL-6 и TNF α [716, 717]. Липсват обаче данни за локалната експресия на TLR2 и TLR4 в условията на диабетна невропатия.

1.3.4 Разтворими фракции на TLR2 и TLR4

Както върху действието на много цитокини и други молекули може да бъде упражняван обратен контрол чрез разтворими фракции на техни рецептори, такъв регулаторен механизъм съществува и за функцията на TLR2 и TLR4 [268, 278, 488]. Нивото на разтворими форми на тези рецептори, soluble TLR (sTLR2, sTLR4) е изследвано в кърма, плазма, амниотична течност, слюнка, плеврални изливи и други, демонстрирайки ролята им в модулирането на индуцирания от бактерии имуноен отговор [343, 688, 723]. И двата протеина са повишени при експериментални модели с ендотоксинемия, както и при хора с инфекциозни заболявания, сепсис или състояния на хронично възпаление [250, 602].

sTLR2 е продукт на посттранслационна обработка след ендоцитоза на рецептора. Протеолизата се осъществява от металопротеинази (a disintegrin and metalloproteinases - ADAM), участващи в отцепването на ектодомените на различни повърхностно-експресирани молекули [338, 378]. При сигнал, вътреклетъчно депо осигурява бързото освобождаване на sTLR2 в циркулацията чрез екзоцитоза [343]. За разлика от него, sTLR4 е резултат от алтернативен сплайсинг [278].

Съществуват различни хипотези за модулаторния ефект на sTLR. Допуска се взаимодействие между sTLR2 и адапторния протеин CD14, димеризация със самия TLR2 на мембранната повърхност или съревнование за свързване с лигандите на рецептора [343]. Възможно е също свързване на sTLR4 с MD-2 и намеса върху свързването на лигандите с комплекса, който адапторната молекула образува с мембранный рецептор, и последващата сигнализация [268]. Не е изключено sTLR да повлиява и активността на други разпознаващи повтаряеми последователности рецептори, конкурирайки се с тях за техните лиганди [365].

Мястото на sTLR при метаболитния синдром, затлъстяване и ЗД не е проучвано.

1.3.5 Полиморфизми на гена *TLR4* и ЗД2

Изучаването на риска от възникване на ЗД2 включва определянето на генетично-дефинираната предразположеност към него. Изследванията сред голямо разнообразие от популации от целия свят демонстрират асоциацията на заболяването с гени, участващи в бета-клетъчната функция и инсулиновата чувствителност, като немалка част от тях са свързани с ИТМ, бележейки отново връзката между затлъстяването и ЗД2 [300].

Имунологичните феномени, съпътстващи заболяването ЗД2, се откриват още преди неговата диагноза и участват активно в различни звена от патогенезата му [223]. Тясната връзка между ЗД2 и неспецифичната имунна система предполага наличието на предразполагащи към развитието му полиморфизми сред гените, кодиращи различни възпалителни медиатори. Потвърждение в тази насока, или поне асоциация с инсулинова резистентност, е установявано за алели от локусите на HLA системата [498, 620], за TNF α [115, 110, 174, 198] и неговия рецептор [175], за IL-6 [270, 642], за CRP [673] и други инфламаторни маркери.

Предвид описаната централна роля на TLR4 в задействането на инфламаторна среда, водеща до инсулинова резистентност и бета-клетъчна дисфункция, интерес представлява и мястото на полиморфизми в кодиращия рецептора ген в предиспозицията към ЗД2. Генът TLR4 е локализиран върху хромозома 9q32-33 и състои се от три екзона [553]. Единични несинонимни полиморфизми се описват предимно в участъка, кодиращ екстрацелуларния домейн на рецептора, богат на левцинови повтори [553], водещи до

промяна в отговора му към потенциални лиганди [35]. Сред полиморфизмите, които имат най-висока популационна честота Asp299Gly (rs4986790), свързан с промяната на аминокиселината аспартат с глицин поради разлика в 299-ти кодон, и Thr399Ile (rs4986791), водещ до промяната на аминокиселина Треонин с Изолевцин вследствие променен 399-ти кодон [176]. Те са сред най-изучаваните в приноса си към риска от разнообразие от заболявания [435].

Честотата на тези полиморфизми е различна в отделни етнически групи. Най-срещано носителството на Asp299Gly/див тип се наблюдава в Африка, където е наблюдавано протективното му влияние срещу малария [410]. Между 10 и 18% от изследваните от различни представителни популации носят хетерозиготен за Asp299Ile генотип, а само 2% от тях са носители и на Thr399Ile алел и при никой последният не е присъствал самостоятелно. В европейдната раса двата полиморфизма обикновено са косегрегирани – Asp299Gly/Thr399Ile (6-14% от изследваните), по-рядко се откриват самостоятелно – около и под 1% за всеки от тях. В популации от Азия присъствието на полиморфизмите на практика не се открива. Всичко това може да даде отражение върху резултатите от проучвания сред различни популации TLR4 [177]. Така изолираното проучване на Asp299Gly в Европа е затруднено поради това, че се среща предимно Asp299Gly/Thr399Ile генотип и по-голяма роля в изучаването на Asp299Gly/див тип биха имали анализи сред африкански популации. Изолираният принос на Thr399Ile се анализира по-трудно поради твърде ниска популационна честота [176].

По данни на регистъра на Националния център за биотехнологична информация в САЩ - NCBI Reference SNP (refSNP) Cluster Report, честотата на хетерозиготните генотипове за Asp299Gly, rs4986790 и Thr399Ile, rs4986791 в при проучвания сред европейски популации варира от 0 до 10%, а за хомозиготни за рецесивния алел генотипове тя е под 1% [429, 430].

Структурните и функционални последствия върху молекулата на TLR се свързват предимно с ролята на Asp299Gly от двата полиморфизма, като се асоциира с намален отговор на рецептора към ЛПЗ и последващата от това активация на инфламаторни сигнални пътища [35, 373, 444]. Въпреки това, отделни изследвания сочат обратна констелация – по-висок отговор на цитокини [176] вследствие стимулирани NFκB и TRIF-зависими сигнални пътища [248].

Asp299Gly и Thr399Ile биха могли да засегнат повърхностната експресия на TLR4 от моноцити или асоциирането с ко-рецепторни молекули в комплекс [481, 492]. Така например, Thr399Ile се асоциира с по-ниска TLR4 моноцитна експресия при деца с анамнеза за инфекции на уринарните пътища, придружена от фебрилитет [51]. Асоциация е търсена и при хронични възпалителни и автоимунни заболявания като идопатичен артрит и системен лупус еритематодес, но такава не е потвърдена [313].

Има данни, че генетичният вариант не се отразява на повърхностната експресия на рецепторите, а засяга експресията на протеините от вътреклетъчната сигнализация – тези, съставляващи MyD88 и TRIF сигнален път [183]. Как обаче се променя отговорът на TLR4 към ендогенни лиганди в зависимост от генетичния вариант и дали това стои в основата на променения риск от инфекциозни и хронични възпалителни не-инфекциозни заболявания, все още не е ясно. Все пак, полиморфизмите в TLR4 се асоциират с повишен риск от някои инфекции [639], докато приносят им в предиспозицията към атеросклероза [713] и някои хронични възпалителни заболявания е все още спорен [98, 262, 357, 683].

Мястото на Asp299Gly и Thr399Ile, както и други [82, 286] полиморфизми на *TLR4* в риска от ЗД2 е анализирано в немалко студии и резултатите от някои сочат протективен ефект при сравними останали рискови фактори [44, 320, 390], други ги свързват с увеличение на централното затлъстяване, стеатоза на черния дроб и инсулиновата резистентност, увеличаващи риска от ЗД2 [113, 664], а немалка част отричат асоциация със заболяването [271, 369, 389, 700].

Предвид централната роля на TLR4 в асоциираното с метаболитния синдром хронично субклинично възпаление, е логично да се запитама има ли връзка между тези полиморфизми и нивото на инфламаторните маркери, чиято предиктивна стойност за риска от ЗД2 вече е многократно наблюдавана. Kiechl и сътр. описват по-ниско серумно ниво на няколко възпалителни показателя (IL-6, разтворима фракция на VCAM-1, фибриноген, феритин) в присъствието на полиморфизма Asp299Gly, което свързва с повишена податливост към инфекциозни заболявания, но по-нисък риск от атеросклероза [308]. Скоро проведен мета-анализ, обхванал над 10 000 души от общо 12 проучвания за връзката между Asp299Gly и исхемичната болест на сърцето, не отчита връзка между

полиморфизма и нивото на CRP [97], потвърдено и от други студии при клинично здрави лица [326]. Изследването на същия полиморфизъм при лица със ЗД2 или НВТ също не установява асоциация с нивото на CRP или IL-6 като свидетели за хроничното възпаление [271].

Въпреки спорните данни за асоциацията със ЗД2 и липсата на връзка между полиморфизмите в *TLR4* и споменатите инфламаторни маркери в рамките на конкретните сърдечно-съдови и метаболитни заболявания, Asp299Gly и Thr399Ile са не по-малко анализирани в насока хронични диабетни усложнения.

1.3.6 Полиморфизми на гена *TLR4* и хронични диабетни усложнения

Отново нееднозначни са резултатите за приноса на полиморфизмите в развитието на атеросклероза. Докато по-стари студии установяват такава асоциация [308], актуални мета-анализи са с противоречиви заключения. Някои отричат връзка между Asp299Gly и развитието на атеросклероза [251, 713], исхемична болест на сърцето (ИБС) [97, 689] и риска от инфаркт на миокарда [318]. докато Thr399Ile, заедно с още няколко изследвани полиморфизма в *TLR4*, водят до повишена предразположеност към заболявания, свързани с атеросклерозата [680]. Мутантният алел на Asp299Gly пък е свързан с намален риск от инфаркт на миокарда сред лица, приемащи статин [249]. Labrum и сътр. изключват влиянето и на двата полиморфизма като рискови фактори за увеличение стойността на показателя – intima-media thickness (ИМТ), както директно, така и чрез влиянието им върху инфламаторната среда [334]. Те не увеличават оценената чрез ИМТ предразположеност към усложнения от атеросклерозата при високо рискови пациенти, като лица с фамилна хиперхолестеролемия [432].

По-малко е проучвано мястото на полиморфизмите в определянето на риска от макросъдови усложнения от ЗД2. Manolakis и сътр. не откриват връзка между мутантните алели и развитието на ИБС при лица със ЗД2 [390], но Buraczynska и сътр. установяват повишена честота на рецесивния алел на Asp299Gly сред диабетниците с коронарна съдова болест [79].

Мястото на полиморфизмите на *TLR4* по отношение на микроваскуларните усложнения от ЗД също не е ендозначно. Доклади съобщават за предразполагаща роля на

Asp299Gly за риска от ДРП сред популация от европейската раса [78, 79], но изследвания в индийска популация не потвърждават наличието на асоциация за този и за Thr399Ile полиморфизма на TLR4 [545].

Не се установява асоциация между Asp299Gly, Thr399Ile и диабетната нефропатия, дефинирана чрез нивото на албинурията [79, 515], а Rudofsky и сътр. описват протективна роля на двата полиморфизма (обикновено наблюдавани косегрегирани) относно диабетна невропатия при ЗД2, диагностицирана въз основа на симптоми, ахилово рефлекс, вибрационен усет или наличието на невропатна язва [515].

Така мястото на два от най-често срещаните полиморфизми на TLR4 гена в патогенезата на ЗД2 и неговите усложнения остава неясна.

1.4 Полиморфизмът Pro12Ala в *PPARG* и хронично субклинично възпаление при ЗД2

Пероксизомен пролифератор активиран рецептор гама (PPAR γ) е лиганд-зависим транскрипционен фактор, принадлежащ към суперфамилията на нуклеарните рецептори [404]. Негова ключова роля е участието му в диференциацията на адипоцитите [512]. Той има отношение към определянето на инсулиновата чувствителност и повлиява обмяната на липидите и въглехидратите [404]. PPAR γ има и съществено място като имуномодулятор, инхибирайки действието на транскрипционни фактори като AP-1, STAT, NF κ B и потискайки експресията на про-инфламаторни цитокини [499]. В клиничната практика PPAR γ агонистите подобряват инсулиновата чувствителност и гликемичния контрол при пациентите със захарен диабет тип 2 (ЗД2) [4]. Те имат и съществен принос в овладяването на хроничното субклинично възпаление, присъщо за инсулиновата резистентност [563].

Кодиращият ген *PPARG* е локализиран в хромозома 3p25. Той се експресира в две изоформи – резултат от алтернативен сплайсинг – *PPARG1*, експресирана от много соматични клетки, и *PPARG2* - предимно в адипоцитите [167]. Полиморфизмът Pro12Ala (rs1801282) в *PPARG2* е един от най-изследваните в епидемиологични проучвания [698]. Спрямо дивия алел (C) промяната в нуклеотидната последователност (G) води до замяна на аминокиселината пролин с аланин на 12-то място от кодираната пептидна верига, което променя свързващия афинитет на рецептора и транскрипцията на зависимите от него гени [125].

Изследванията показват носителството на алел G сред 1.7 до 21.6% от здрави лица от европейската раса [210]. По данни на NCBI Reference SNP (refSNP) Cluster Report честотата на хетерозиготния генотип за Pro12Ala, rs1801282 в при проучвания е европейски популации варира от 12 до 25%, а за хомозиготен за рецесивния алел генотип тя е под 2% [431].

През 90-те години на миналия век той за първи път се асоциира с намален риск от развитие на ЗД2. Следват проучвания и мета-анализи, които потвърждават протективната му роля [210], но и студии сред не малко популации я отричат [153] и дори го свързват с повишен диабетен риск [188, 243, 310]. Протективната му стойност е наблюдавана и по

отношение на хроничните микросъдови усложнения от заболяването като диабетна нефропатия [142] и ДРП [381, 597], но и тук това не винаги се потвърждава [568].

Разминаването в приноса на полиморфизма в предразположеността към ЗД2 се обяснява с разнообразието в ИТМ сред изследваните популации и при някои от тях сравняването на резултатите при сходни антропометрични показатели води до стопяване на тази разлика [377].

Рецесивният алел е свързан и с по-добра инсулиновата чувствителност [100, 125, 153, 205] и намален риск от метаболитен синдром при хомозиготно носителство [192], докато данните за асоциация с ИТМ са противоречиви. Някои студии сочат повишен риск от затлъстяване [59, 395, 396, 408, 418], други го свързват по-нисък ИТМ [125, 646], а трети не откриват асоциация с теглото [205, 405, 568].

Въпреки това разминаване между заключенията на изследователите, комбинирането на протективен риск за ЗД2, свързан с подобрена инсулинова чувствителност, и предразположеност към затлъстяване не е учудващо, предвид ролята на PPAR γ в адипогенезата [542] и наблюденията за повишаване на теглото при лечение с инсулиновите очувствители – тиазолидиндионите [5].

Причина за разликата в резултатите може да бъде различната етническа принадлежност, обвързаност на функционалните последствия от полиморфизма с полова специфичност [396, 418]. Със сигурност ефектът на полиморфизма зависи от диетата [402, 471] и физическата активност [310] и интерферира с този от полиморфизми в други гени [32, 48, 439, 576].

Въпреки нееднозначните резултати, немалка част от цитираните проучвания потвърждават асоциацията на полиморфизма с инсулиновата чувствителност и риска от ЗД2. Какви са обаче функционалните последствия от генетичните варианти, които повлияват предразположеността към заболяването? Установено е, че присъствието на протективния алел (G) е свързано с намалена липолиза [530], което предполага по-ниско ниво на свободните мастни киселини и подобрена инсулинова чувствителност в таргетните тъкани [577].

Интерес представлява мястото на полиморфизма при асоциираното с метаболитния синдром и ЗД2 хронично възпаление, което има водещо място в генерирането на

инсулинова резистентност [593]. Публикации, сравняващи нивото на адипокини при лица със ЗД2 или изолирано затлъстяване в зависимост от генотипа, касаещ Pro12Ala, са оскъдни. В индийска популация например, полиморфизмът не се свързва с промяна в нивото на адипонектина – както при диабетици, така и при здрави доброволци, а също и при сравняването му в цялата група с участници [489]. Липса на асоциация с нивото на адипонектин се наблюдава и при друго свързано с инсулинова резистентност състояние – синдрома на поликистозните яйчници [447]. Японски колектив съобщава за по-ниските му стойности при здрави мъже и жени, носители на рецесивния алел, но не свързват това с антропометричните, метаболитни показатели и индекси на инсулинова резистентност [686]. От друга страна, при жени със ЗД2 е констатирано по-високо ниво на лептина в присъствието на мутантния вариант на Pro12Ala, но нивото на разтворимия рецептор за TNF α не се различава [543]. Серумната концентрация на самия TNF α също не се свързва с полиморфизма [199].

На този етап не може да се посочи принос на полиморфизма Pro12Ala в дефинирането на инсулиновата чувствителност чрез влиянието върху секрецията на инфламаторни цитокини при затлъстяване и риск от ЗД2.

1.5 Други експресирани от моноците рецептори при ЗД2

1.5.1 CD163

CD163 е рецептор за хемоглобина, представител на група В скавенджър рецептори, експресирани върху моноцити и макрофаги [330]. Свързването на хемоглобин-хаптоглобиновия комплекс при физиологична или патологична хемолiza с последващата интернализация предотвратява настъпването на оксидативен стрес и възпаление, свързани с метаболизирането на хемоглобина [524]. Други лиганди на CD163 са още tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), пептиди от бактериален произход и вирусни гликопротеини [160]. Активираната от CD163 сигнализация е свързвана както с анти-, така и с про-инфламаторен отговор. От една страна свързването на хемоглобин-хаптоглобиновия комплекс се асоциира със секрецията на анти-инфламаторен IL-10 и активирането на хем-оксигенза 1 [469], метаболизираща хемоглобина до анти-

инфламаторни метаболити – биливердин, СО, Fe²⁺ [160, 411]. От друга - разпознаването на бактериални молекули от CD163 може да доведе до секрецията на про-инфламаторни цитокини - IL-1 β , IL-6, TNF α [164]. Самата експресия на рецептора се повлиява от много фактори, като се стимулира в присъствието на глюкокортикоиди, IL-6, IL-10, докато TNF α , IL-1 β , IFN γ и други я потискат [325].

Разтворимата фракция на CD163 (soluble CD163-sCD163) се получава след отцепването ѝ от мембранно-свързания рецептор с помощта на металопротеинази [159] – процес, който се усилва в условията на възпаление, за чието активиране, както подробно разгледахме, допринася TLR [651]. Счита се, че има отношение към потискане на Т-клетъчната пролиферация [195] и се разглежда като потенциален биомаркер за оценка на моноцитната активация при състояния, свързани с възпаление [122].

Повишаването на sCD163 е наблюдавано при инфекциозни, но и неинфекциозни заболявания, асоциирани с хронично възпаление – болест на Крон, ревматоиден артрит, склеродермия, цьолиакия, атеросклероза [160]. Повишението на sCD163 се установява и при лица със затлъстяване като корелира с повишената мембранна експресия на CD163 във висцералната и подкожна мастна тъкан [327, 536] и се оформя като обещаващ маркер за активността на макрофагите в мастната тъкан [707]. Той нараства с увеличението в обема ѝ [40] и спада след редуцирането на тегло [186]. Концентрацията на разтворимата фракция се асоциира с инсулинемията на гладно, индекса на инсулинова резистентност НОМА-IR и нивото на метаболитни показатели като HDL-холестерола при лица със ЗД2 и НВТ [457]. Тя е повишена и при пациенти със ЗД2 [457, 556] и корелира с нивото на IL-6 при него [559]. Наблюдавано е понижение на моноцитната експресия на CD163 при диабетици в сравнение с тази при здрави контроли и причина за това може да бъде повишеното отцепване на ектодомена в условията на хронично възпаление [354], въпреки че други студии констатирали повишена CD163 експресия от моноцити при ЗД2 [559].

Подобно на IL-6, CRP и други инфламаторни маркери, и sCD163 се разглежда като прогностичен маркер в дефинирането на риска от ЗД2 [413], което подчертава необходимостта от изясняване на мястото на рецептора в патогенезата на заболяването.

1.5.2 CD36

CD36 е мембранен гликопротеин, принадлежащ към групата на скавенджър рецептори клас Б, който се експресира върху различни типове клетки, включително моноцити и макрофаги [171]. Сред лигандите му са окислени фосфолипиди - oxidized phospholipids (oxPL), окислени липопротеини с ниска плътност - oxidized low-density lipoprotein (oxLDL), дълго-верижни мастни киселини, компоненти на бактериалната стена, продукти на клетъчната апоптоза [455]. CD36 участва в редица биологични процеси, но най-голям интерес предизвиква ролята на рецептора за развитието на атеросклерозата. Свързването с oxLDL частици отрежда място на CD36 в образуването на пенести клетки [455], но рецепторът има отношение и към миграцията на макрофагите [456], поддържането на възпалителен отговор в артериалната стена и други аспекти на атерогенезата [455].

CD36, в ролята на рецептор за oxLDL, се асоциира с патогенезата на инсулиновата резистентност [523]. Макрофагите и адипоцитите имат много общи функционални особености като потенциал за фагоцитоза, секреция на интерлевкини, експресия на общи рецептори [656], сред които и CD36 [62]. Свързването му с лиганди както върху макрофагите, така и върху адипоцитите, активира инфламаторни сигнални пътища, които намаляват инсулиновата чувствителност [306]. Установена е и връзка между повишената експресия на CD36 в черния дроб и наблюдавани при висцералното затлъстяване метаболитни нарушения, като дислипидемията [322].

Нивото на разтворимата фракция на CD36 (soluble CD36, sCD36) при пациенти със ЗД2 и затлъстяване е неколккратно по-високо от това при лица без ЗД, като корелира с нивото на ПГГ, инсулина на гладно и ИТМ [225]. Handberg и сътр. поставят въпроса за ролята на рецептора като потенциален маркер за метаболитен синдром и атеросклероза не само при ЗД2, тъй като концентрацията му и при не-диабетици се асоциира с индекси на инсулинова резистентност, стеатоза на черния дроб и показателя ИМТ на съдовата стена на каротидните артерии [224].

При експериментални модели на ЗД2, в условията на високо съдържание на глюкоза, нивата на мРНК и това на CD36 протеина в култивирани ендотелни клетки се повишават [169]. Такава тенденция е наблюдавана и при лезии от ендартектомия при хора с анамнеза за хипергликемия [215], както и в периферни мононуклеари, където експресията при ЗД2 е повишена [520, 579, 712], корелира с нивата на високочувствителния high sensitivity CRP

(hs-CRP) и IL-6 [579] и вероятно допринася за ролята на ЗД2 като рисков фактор за атеросклероза [712]. При здрави доброволци в отговор на натоварване с глюкоза, настъпват динамични промени в експресията на CD36 при отделни подтипове моноцити [460], но характерът на експресията при всеки от тях в рамките на ЗД2 не е ясен.

1.5.3 CD64

CD64 е мембранен гликопротеин, експресиран върху моноцити и макрофаги, неутрофили и други клетки, представител на Fc γ рецептите и по-точно Fc γ рецептор 1 (Fc γ RI), свързващ мономерни IgG антитела с висок афинитет [265]. Заедно с другите Fc γ рецептори участва във фагоцитозата, активирането на имунния отговор, секрецията на медиатори на възпалението, антияло-медираната цитотоксичност [376]. Експресията му при върху неутрофили се повишава силно след стимулация с IFN γ [77], както и в условията на бактериални инфекции [185] и септични състояния [575].

Fc рецепторите, включително CD64, са рецептори и за пентраксините, към които принадлежи CRP [376]. Смята се, че описаните по-горе про-инфламаторни, про-атерогенни и прокоагулантни ефекти на последния се медиират именно, чрез CD64 и други Fc γ рецептори като CD32 и CD16, експресирани върху моноцити, но и ендотелни клетки [132]. Блокирането на CD64 и CD32 потиска стимулираните от CRP експресия на адхезивни молекули, усвояване на окислени LDL частици, освобождаване на колония стимулиращи фактори от макрофаги, както и потиснатата от него експресия на ендотелна NO синтаза и простаглицин [130, 132].

Експресията на CD64 върху периферни моноцити при лица с метаболитен синдром е повишена и корелира с нивото на IL-6 и hs-CRP, както и с HOMA-IR [130]. Това демонстрира ролята на рецептора в поддържането на хроничното инфламаторно състояние, свързано с метаболитния синдром и връзката му с потискане на инсулиновата чувствителност. Моноцитната експресия на CD64 вероятно е повишена и при лица със ЗД2 [36] и клиничната и значимост предстои да бъде изяснена.

1.6 Моноцитни подтипове и ЗД2

Моноцитите произлизат от хемопоеични стволови клетки в костния мозък, които остават известно време в циркулацията преди да мигрират към различни тъкани и да се диференцират като макрофаги. Те имат комплексна роля в имунната защита на организма и възстановяването от тъканна увреда [718].

Първоначално моноцитните са били дефинирани в зависимост от физическите параметри на клетките и цитохистохимичния анализ, а по-късно въз основа на флоуцитометрия – чрез физическите им параметри и повърхностни маркери като CD14 [718]. През 1989г Passlick и сътрудници описват нов подтип моноцити, коекспресиращи CD14 и CD16, който обхваща около 2.2% от всички мононуклеари и 13% от CD14+ моноцити [459]. Те имат специфични физикални особености, по-малки размери от обичайните моноцити и по-висока експресия на молекули от II клас на главния комплекс на тъканна съвместимост (ГКТС) [459]. Експресиращите високо ниво на CD14 моноцити (CD14++CD16-) са означавани като класически [53], а по-късно описаните CD16+ моноцити добиват наименованието некласически [574]. Последните се оказват по-важен източник на инфламаторни цитокини като TNF α , но продуцират слабо анти инфламаторния IL-10 и затова са описвани още като про-инфламаторни моноцити [190].

В хода на инфекция или стимулация с макрофаг колония-стимулиращ фактор (M-CSF) в пропорциите между отделните подтипове моноцити се наблюдава преходно повишение на такива с междинен фенотип, последван от покачване в броя на некласическите [652]. В по-новата номенклатура, изготвена от Nomenclature Committee of the International Union of Immunologic Societies, като междинен подтип се означават моноцити, характеризиращи се с персистиращо висока експресия на CD14 в съчетание със слаба експресия на CD16 (CD14++CD16+), докато некласическия подтип има намалена CD14 и подчертана CD16 експресия (CD14+CD16++) [718].

Разликата във функционалните особености на отделните подтипове моноцити стана обект на изследване при различни заболявания през последното десетилетие [564]. Класическите моноцити са с подчертан потенциал за фагоцитоза и играят ключова роля в неспецифичния имуен отговор, докато CD16+ подтиповете имат водеща роля във възпалението. Междинният подтип моноцити съчетава някои функционални особености и

спектър от експресирани гени и повърхностни рецептори, присъщи както за неklasическите (CD115, CX3CR1, CD97, CD123, P2RX1, CD11a, CD11c, CD43, CD163), така и за класическите (CCR2, CCR5, CD62L, CXCR1, CXCR2), макар и да има разлика в интензивността на експресията, като например за клас II от ГКТС - тя е най-висока именно при CD14⁺⁺CD16⁺ моноцити [27, 112, 674]. Това подкрепя теорията за трансформирането на един подтип моноцити в друг [27, 112, 674]. Мястото им в инфламаторния отговор е нееднозначно като някои автори им приписват про-инфламаторен потенциал [624], а други ги сочат като основен източник на анти-инфламаторния IL-10 [547].

Хетерогенността на моноцитните популации е добре изследвана при сърдечно-съдовите заболявания. Така например е наблюдавано преходно повишение на CD14⁺⁺CD16⁻ (класически) моноцити непосредствено след остър инфаркта на миокарда, последван от покачване на CD16⁺ моноцити през следващите седмици [617]. Тези явления са констатирани при проучвания при хора [617] и експериментални модели [423] и се смята, че всеки от моноцитните типове има отделно място във възстановителния процес – CD16⁻ моноцити и техните аналози при мишки участват в резорбцията на некротичната тъкан, а CD16⁺ - в оздравителните процеси, ангиогенезата и колагеновия синтез [423]. От клинична гледна точка мястото на отделните подтипове моноцити е важно поради установяването на асоциация например между нарастването на класическите моноцити и размера на миокардната увреда и прогнозата за левокамерната функция [617], между динамиката в междинните моноцити и нивото на тропонина и показатели за оценка на левокамерната функция [595]. Освен това, голямо проспективно проучване показва мястото на междинните моноцити в прогнозирането на риска от сърдечно-съдов инцидент при лица, насочени за ангиографско изследване [506]. Динамиката в отделните подтипове моноцити е потенциален предиктор и относно тежестта и преживяемостта след остър мозъчно съдов инцидент [294, 626]. Освен това се анализира възможността за прогностичната стойност на отделните подтипове в оценката тежестта на атеросклерозата чрез асоциация с ИМТ, степен на каротидна стеноза и наличие на неоваскуларизация в плаките [281]. Търси се връзка между отделните моноцити и патогенезата на атеросклерозата – изследва се мястото им при дислипидемия [508, 513] и ефектът от

статиново лечение, предвид повърхностната им експресията на скавенджър рецептори за холестерола [105, 514].

Имайки предвид, че затлъстяването и ЗД2 са рискови фактори за сърдечно-съдови заболявания [69], няма как да не се оцени наличието на промени в моноцитните подтипове и при тези състояния. Вече бяха представени доказателства, сочещи наличието на хронично възпаление при тях. Възниква въпроса дали циркулиращите моноцити имат количествени и фенотипни особености, които са свързани с инфилтрирането на мастната тъкан от макрофаги. Наблюдавана е например повишена експресия на хемокинови рецептори като CCR2 и CCR5 от периферни моноцити и повишена склонност към миграция след стимулация с MCP-1 и други хемоатрактанти при лица със затлъстяване, което според авторите предполага про-инфламаторната готовност на тези моноцити [329]. Освен това при затлъстяване констатира и увеличение на CD16+ моноцити [111, 329, 475, 507] – клетки, които имат по-изразена антиген-представяща роля и по-силен отговор в секрецията на инфламаторни цитокини [108]. Водещо нарастване на неklasическите моноцити се констатира при лица със затлъстяване и ЗД2, което корелира с гликемията, независимо от процента мастна тъкан. Повишението в двата подтип CD16+ моноцити, но по-силно за неklasическите, търпи обратно развитие след редукция на тегло с хипокалорийна диета или бариатрична хирургия – ефект, отчетен при намаляване на теглото с поне 5% [111, 475]. Poitou и сътр. установяват и корелация между динамиката в инфилтрацията на висцералната мастна тъкан с макрофаги и намаляващия процент на циркулиращи неklasически моноцити след отслабване, но препоръчват допълнителни изследвания преди да бъде анализирано мястото на адипокиновата секреция в диференциацията на моноцитите [475].

Увеличението на CD16+ моноцити при затлъстяване се асоциира с показателя ИМТ на каротидните съдове [507] и свързаното с редукция на теглото понижение на циркулиращите CD16+ моноцити, и по-точно на междинните, се съпровожда от подобрене в този показател, използван в оценката на субклиничната атеросклероза [475].

Очевидно моноцитните субпопулации имат място в модулирането, а може би онагледяват подлежащото хронично възпаление при затлъстяване, ЗД2 и сърдечно-съдовите заболявания. И освен с количествени, те може би се съпровождат и с фенотипни изменения, изучаването на които би обогатило не само познанията в патогенезата на тези

състояния, но и би дало възможност за разработването на нови насоки в диагностичен, прогностичен и терапевтичен аспект.

1.7 ЗД2 и диабет-асоциирани антитела

1.7.1 Концепция за латентен автоимунен диабет при възрастни

Класифицирането на ЗД е предизвикателство от много години. След първоначалното му разделяне на ювенилен и такъв, настъпил при възрастни, става ясно, че не може да се сложи рязка възрастова граница между двете най-често срещани форми на заболяването [154, 666]. Въвеждането на термина инсулино-зависим и неинсулинозависим ЗД с допълнителни подкатегории по отношение на затлъстяването [428], също поражда полемики [154].

Оказва се, че и разделянето на диабета според патогенетичните му характеристики на тип 1 и тип 2 [163], което използваме и днес в класификация на ЗД [24], също се оказва недостатъчно изчерпателно в някои случаи от клиничната практика [353, 452].

Макар повечето случаи на ЗД, установен при възрастни – „adult onset diabetes mellitus”, да се характеризират със затлъстяване [668], част от пациентите са с нормално телесно тегло и при тях се констатира по-силно намалена инсулинова секреция от обичайно наблюдаваната при ЗД2 [38] и невъзможност за постигане на добър гликемичен контрол с помощта на перорални антидиабетни средства [479]. През 70-те години на миналия век., скоро след описването на анти-островно-клетъчните антитела (Islet-cell antibodies - ICA) [72], излизат статии за ролята на последните като предиктор за развитие на ЗД [276]. Установяват се при случаи на инсулинова зависимост, но и при лица с неинсулинозависим диабет [350]. Малко по-късно ICA са посочени като индикатор за латентно-протичащ ЗД1 сред пациенти, чиято диагноза се поставя на възраст между 35 и 75г [216].

В началото на 90-те години екип от учени представят диабетици, при които заболяването дебютира с клиничната картина на ЗД2, но имат и положителни антитела срещу глутамат декарбоксилаза [619] – едно от антителата, използвани в диагностиката на ЗД1 [204]. През 1999 г. Zimmet и сътр. въвеждат понятието латентен автоимунен захарен диабет – latent autoimmune diabetes of the adults (LADA) [720], но в литературата той е наричан още бавно прогресиращ ЗД1 [721], ЗД тип 1 ½ [291] и др. Те наблюдават положителни антитела при лица, които първоначално не се нуждаят от инсулин за постигането на оптимален гликемичен контрол. Тези лица са по-млади сред пациентите, включени като участници със ЗД2, началото на заболяването им е настъпило в по-млада

възраст и нивото на С-пептида е по-ниско отколкото при лицата, които не се нуждаят от инсулинолечение [720].

Следват проучвания, които изследват честота на антителата срещу декарбоксилазата на глутаминовата киселина при пациенти с диагноза ЗД2 (Таблица 2), сравняват метаболитния риск в зависимост от наличието на антитела и дори честотата на някои генетични варианти в рамките на HLA системата и извън нея, за които е констатирана асоциация със ЗД1 или ЗД2 [340].

Много автори считат, че латентният автоимунен диабет е част от ЗД1 и не следва да се разглежда като отделно заболяване [127, 453]. Въпреки че в клиничен, патофизиологичен, имунологичен и генетичен аспект ЗД1 и LADA имат много повече сходства помежду си отколкото със ЗД2 [340], все още немалка част от пациентите с автоимунен диабет остават диагностицирани и лекувани като ЗД2.

Самият спектър от клинични и лабораторни особености на пациентите с положителни антитела е различен и свързан с титъра и броя на антитела [358, 372, 511, 630]. **Докато при едни случаи клиничната картина е тази на класически автоимунен диабет, то в други не е ясно дали само наличието на положителни антитела е повод за приемане на заместително лечение с инсулин или те са просто лабораторен феномен при ЗД2 [84, 511].**

Въпреки, че търпят значителни критики [200, 495, 510], диагностичните критерии за поставянето на диагноза LADA се базират на възрастта на поставяне на диагнозата, срока на поддържане на добър гликемичен контрол без необходимост от инсулинолечение и наличието на положителни диабет асоциирани антитела [340] – islet-cell cytoplasm autoantibodies (ICA) [621], Glutamic Acid Decarboxylase autoantibodies (GAD65A) [621], Insulinoma-Associated-2 antibodies – Tyrosine phosphatase associated (IA-2A) [603], insulin autoantibodies - IAA [263], Zinc Transporter 8 autoantibodies (ZnT8A) [264, 335].

Brooks-Worrell и сътр. посочват поставянето на диагнозата при наличие на трите критерия [75]:

- (1) Възраст на диагностициране на ЗД над 35 годишна възраст
- (2) Липса на необходимост от лечение без инсулин за поне 6 месеца
- (3) Наличие на положителни диабет-асоциирани антитела.

Таблица 2. Честота на диабет-асоциирани антитела при пациенти със ЗД2*.

	Общо	ICA	GAD65A	IA-2A	IAA	ZnT8A	n
Xiang, 2015 [679]	8.63		5.78	1.51	1.26	1.84	2388
Siraj, 2016 [546]		2.7	3.5	0			86
Szepietowska, 2012 [580]	8.9		5.6		3.8		212
Tuomi, 1999 [618]	9.8		9.3				1122
Davies, 2008 [120]	4		4				683
Hawa, 2013 [232]	9.7		8.8		0.9 (+ZnT8)	0.9 (+IA-2)	6156
Maioli, 2010 [387]	4.95		4.95	4.5			5568
Buzzetti, 2007 [81]	4.5		4.5				4250
Zinman, 2004 [722]	4.2		4.2				4134
Takeda, 2002 [585]	3.8		3.8				4980
Turner, 1997 [621]	11.7	5.8	9.8				3672
Davis, 2005 [123]	11.6	+	+	+			4545
*изразени в % от общия брой участници							

1.7.2 Диабет-асоциирани антитела

1.7.2.1 Антиостровноклетъчни антитела

Антиостровноклетъчните антитела - ICA, са описани за първи път от Bottazzo и сътрудници при случаи на полигландуларен автоимунитет [72], а след това и при лица със ЗД1 [73]. Те се измерват чрез индиректна имунофлуоресценция върху криосрезове от човешки панкреас с нулева кръвна група и резултатите се изразяват в мерна единица Juvenile Diabetes Foundation – JDF, като диагностичният праг варира между 5 и 10 JDF. ICA са поликлонални и реагират с разнообразие от островни антигени, включително insulinoma-associated autoantigen (islet antigen-2/ICA512), GAD65, както и антигени извън

бета-клетките, но не и с инсулин, който не може да бъде фиксиран с използваната методика [670].

Между 70 и 80% от новодиагностицираните случаи на ЗД1 са положителни за ICA, като появата им предшества клиничната изява на заболяването и установяването им при роднини на лица с тази диагноза [66, 383, 446, 502] и деца без фамилна обремененост [315, 355, 525] участва в определянето на риска от неговото развитие. След диагнозата спадат и едва 5-10% от диабетиците имат положителни ICA след 10-годишна давност на заболяването [671].

ICA имат място в латентно протичащия автоимунен ЗД. Още през 70те години на миналия век се установява наличието на положителни ICA при 5% от лица с клиничната картина на ЗД2 [351], а по-късно Groop и сътр. съобщават за честота на ICA положителни пациенти, лекувани с диета и перорални средства за поне 1 година [216]. По данни на UKPDS 5.8% от пациентите с диагноза ЗД2 имат положителни ICA антитела [621].

През последните две десетилетия бяха разработени и утвърдени имунометрични методи за изследване на антитела срещу т.нар. ”биохимично дефинирани автоантигени” [209, 393, 451, 662], оценката на чиято приложимост и стандартизация е обект на множество програми [336, 527, 613, 635]. Наличието на позитивни ICA при отрицателни антитела срещу известни днес антигени като GAD65, IA-2, инсулин, ZnT8, както и разликата в динамиката на всяко от тези антитела през годините и ICA демонстрират, че освен изредените има и други, които поддържат автоимунния отговор [30, 124].

1.7.2.2 Антитела срещу глутамат декарбоксилаза (Glutamic Acid Decarboxylase – GAD)

В началото на 80-те години на миналия век Baekkeskov и Lernmark изолират протеин от островни клетки с молекулно тегло 64kD, който води до имунопреципитация на серум на лица със ЗД1 [42]. Впоследствие се установява, че 70-80% от децата с новодиагностициран ЗД1 имат антитела от IgG клас срещу такъв антиген [43, 102, 204, 328]. Този белтък се оказва ензим, който участва в декарбоксилирането на глутаминовата киселина до невромедиатора гама-амино маслената киселина [41]. Автоантитела към

декарбоксилазата са установени и при неврологичното заболяване Stiff Man Syndrome [554]. Въпреки, че са описани две изоформи на ензима – GAD65 с молекулно тегло 65kD, изграден от 585 аминокиселини и кодиран в хромозома 10p11.23 от *GAD2*, и GAD67 с молекулно тегло 67kD, изграден от 594 аминокиселини и кодиран в хромозома 2q31 от *GAD1* [76], изследвания върху специфичността на GAD автоантителата при човека доказват, че основният антиген при ЗД1 е GAD65 [220]. GAD65A са поликлонални, от IgG клас, титърът им има спорно място в определянето на риска от ЗД1 [10, 446], обвързани са с генетичния терен [213] и след появата му персистират за дълго време, което ги поставя на преден план в диагностицирането на LADA [720]. Докладвана е различна честота на антителата при лица с фенотип на ЗД2 в отделни проучвания – между 4 и 14% [340], Juneja и сътр. дори споменават 16% [290]. Както и за ICA, тя е по-висока сред по-млади лица между 25 и 34-годишни при диагностициране на заболяването - 21% за ICA и 34% за GAD65A и намалява с възрастта – 4% за ICA и 7% за GAD65A при 55-65-годишните [621].

Именно GAD65A са с водеща диагностична стойност при ЗД в късна възраст и титърът им е свързан с прогнозата за необходимостта от инсулинолечение при липса на първоначални индикации за такова [212, 368, 612, 619, 719], въпреки че има и противоположни наблюдения [128]. Обикновено останалите диабет-асоциирани антитела се откриват при лица с висок титър на GAD65A, но допълват диагностиката при GAD-негативни случаи [81, 335]. Честотата на GAD65A в общата популация варира от 0.7 до 2.2% [509, 517, 557, 671], някои проучвания докладват и до 4% [139]. Често позитивността на антителата варира при проследяване [557].

1.7.2.3 Антитела срещу insulinoma-associated antigen 2 (IA-2A)

През 1992 г. Rabin и сътр. описват островен антиген, наречен ICA512, който преципитира диабетен серум [486]. Впоследствие, колективът уточнява структурата му на трансмембранен протеин, чийто цитоплазмен домейн е сходен с тези с каталитична активност от фамилията на протеин тирозин-фосфатазите, и по-точно рецепторна тирозин фосфатаза, експресирана в нервната тъкан, секреторни гранули на панкреаса, невроендокринни тумори [487]. При пациенти със ЗД1 се установяват антитела, които реагират с белтъчни фрагменти от лизиране с трипсин с тегло 40kD и 37kD [458]. Първият се свързва с ICA512, а вторият проявява изключително структурно сходство с него [234] и

с антиген при ЗД1, изолиран и като фогрин [231, 234, 649]. Означава се като IA-2beta или IA-2b [375].

Антителата към IA-2 при лица със ЗД1 се срещат в 55-75% от новодиагностицираните със ЗД1 [426, 672] и след диагнозата имат тенденция да намаляват [436]. Те са поликлонални [710], от клас IgG и има наблюдения, че стойността им и подтипът са обвързани с различен риск от ЗД1 [10], както и присъствието им на фона на подходящ HLA хаплотип [213] или наличието и на антитела срещу IA-2b [10]. Честотата на IA-2A в общата популация е около 2-3% [671].

Juneja и сътр. съобщават за честота на антителата срещу IA-2 при клинична картина на ЗД2 от 6.4% [290], по данни на UKPDS е по-ниска - 2.2% от изследваните, но допълват предиктивната стойност на останалите антитела по отношение на нуждата от инсулинолечение [71]. Антителата срещу IA-2b нямат съществена стойност при LADA [71].

1.7.2.4 Антиинсулинови антитела (IAA)

През 1983г Palmer и сътр. посредством белязан с ¹²⁵I-инсулин доказват наличието на инсулинови автоантитела от клас IgG при новодиагностициран ЗД преди започване на инсулиново лечение [451]. Тези антитела не се улавят при имунофлуоресцентния тест за ICA, тъй като поради предварителната обработка на панкреасните срези се губи инсулина и С-пептида [670]. Междувременно се установяват и автоантитела от клас IgG срещу проинсулин, кръстосано реагиращи с С-пептид [331], но с по-ниска специфичност от IAA [667].

Антиинсулинови автоантитела се намират в 35-60% от новодиагностицираните деца, като честотата им е свързана с възрастта и определени алелни специфичности в гените на HLA системата и инсулиновия ген [213, 671]. Концентрацията на инсулиновите автоантитела в серума и принадлежността към определен IgG субклас, афинитета на свързване на антиинсулиновите антитела, ранното им появяване, кръстосаната реакция с проинсулин, поликлоналният характер на антителата в даден серум, наличието на рисков HLA генотип променят предиктивната стойност на антителата в риска от развитие на ЗД1 [10]. IAA се откриват още в ранна детска възраст, като с напредване на възрастта

процентът на IAA позитивни случаи намалява, а нивото им спада постепенно и след изязвата на заболяването [61, 173, 672]. Поради това и мястото им в диагностиката на LADA е ограничено. Трябва да се изследват преди започване на инсулиновото лечение поради възможния имунизационен ефект на екзогенния инсулин, което е причина за трудното им проследяване [436]. Все пак, проучването LADA China отнежда не по-маловажно място на IAA в диагностиката на LADA спрямо останалите антитела [263].

1.7.2.5 Антитела срещу цинков транспортер 8 (ZnT8A)

Следващият голям автоантиген при ЗД1 е цинковият йонен транспортер 8 (ZnT8) [662] - трансмембранен протеин, който се експресира във висока концентрация в бета-клетките на панкреаса и участва в генерирането на Zn^{2+} в инсулин-съдържащите гранули [99]. Той участва в ефлукса на редица йони – Zn, Co, Fe, Mn, Cd, представител е на семейството катионни транспортери, някои от които също се експресират в панкреаса [295]. ZnT8 се кодира от ген *SLC30A8* в хромозома 8q24, който се асоциира с предразположение към ЗД2 [550]. Автоантитела към този антиген се установяват в серума на около 60-80% от новодиагностицираните диабетици и в 26% от лицата със ЗД1 с отрицателни други антитела. Така, добавянето му към класическия панел от антитела (GAD65A, IA-2A, IAA) намалява антитяло-негативните диабетици от 5,8% на 1,8% и повишава честотата на позитивните за две и повече антитела от 72% на 82%, а включването на ZnT8A на мястото на което и да е от трите класически антитела открива сходен процент антитяло позитивни случаи на ЗД1 – 94% [662]. Последното ги прави подходящи за изследване при лица със започнато инсулинолечение, което компрометира надеждността на резултатите от изследването на IAA. Установяването на по-голям брой позитивни антитела сред лица в риск увеличава вероятността за настъпване на ЗД1, достигайки до 100% в рамките на 5 години при положителен резултат за три от тях [634] и в този смисъл добавянето на още един маркер е в полза в прогностичен аспект. Наблюденията върху честотата му сред пациенти със ЗД1 в българската популация (45.7%) сочат преимуществената му роля като втори имунологичен маркер, наред с GAD65A, превъзхождайки IA-2A в диагностичния план [4].

Антителата към цинковия транспортер са поликлонални, установяват се след 2-3-годишна възраст, обикновено след позитивирането на антитела срещу GAD65 и IA-2, но стриктна последователност в това отношение не може да бъде посочена [662]. Честотата им прогресивно расте с възрастта на изява на заболяването и достига до 80% сред заболелите в юношеска възраст, след което намалява, но не толкова бързо, колкото IAA [662].

Това прави ZnT8A подходящи за изследване при лица с установяване на аутоимунен диабет в по-късна възраст [335]. Lampsona и сътр. съобщават, че при лица с такава диагноза и доказано положителни GAD65A и/или IA-2A, общата честота на случаите с позитивни ZnT8A е 18.6%, като тя е най-висока при дебют на заболяването преди 49 годишна възраст (12.2%), намалява във възрастта 49.1-58.8 г (6.6%) и спада още след 58.9 годишна възраст (4.4%) [335]. Присъствието на ZnT8A обикновено се свързва и с висок титър на GAD65A, по-изразен инсулинов дефицит, по-лош гликемичен контрол и по-ниски стойности на ИТМ, обиколка на талията, общ холестерол и триглицеириди [335]. При фенотип на ЗД2 и отрицателни други диабет-асоциирани антитела е наблюдавана честота на ZnT8A в около едва 1.4% от изследваните [335]. **Титърът при тях обаче съществено се различава от този при пациенти с известни положителни други антитела, което поставя под въпрос дали присъствието само на антитела срещу ZnT8 би могло да даде основание за пренасочване на диагностичния план към аутоимунна генеза на заболяването** [335]. Тази честота е и по-ниска от съобщаваната от Wenzlau за контролната популация и тази със ЗД2, съответно под 2 и под 3% [662].

Seissler и сътр. съобщават, че предварителното блокиране на антителата срещу IA-2 и GAD65 потиска флуоресцентното светене за ICA само при 37% от лицата с LADA, докато това се постига при 60% от пациентите със ЗД1 [534]. Това косвено доказва участието на повече бета-клетъчни антигени при LADA, различни от изброените тук, и задълбочава разликата между класическия и бавно-прогресиращ аутоимунен захарен диабет.

1.7.3 LADA между ЗД1 и ЗД2

1.7.3.1 Генетичен риск

Връзка с генетични локуси с доказано място при ЗД е търсена в рамките и на LADA. Установява се асоциация между генетични локуси в HLA системата [93], локуси свързани с инсулиновия ген (Variable Number of Tandem Repeats Upstream of the Insulin Gene – *VNTR INS*) [92, 93, 129, 714], и още гените *MICA* (MHC class I chain related A) [611], *PTNP22* (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22) [93, 146], *CTLA4* (cytotoxic T lymphocyte antigen-4) [107, 146], с които се свързва и риска от ЗД1. Предразположеност към LADA се дефинира и от гени, които свързваме със ЗД2 като *TCF7L2* (Transcription factor 7-like 2) [93, 379, 610, 706].

Все пак, в различните проучвания има известни разминавания при сравняването на честотата на високорискови генотипове или хаплотипове между LADA, ЗД1, ЗД2 и така LADA заема индивидуално място в дефинирания от полиморфизмите във всички изброени и други анализирани гени риск [29, 222] (Таблица 3).

Като цяло латентният автоимунен диабет при възрастни се асоциира с генетична предразположеност, която е по-близка до тази за ЗД1, отколкото за ЗД2, но въпреки това, тя се отличава от характерната за ЗД1, дебютиращ в детска възраст [409]. Асоциациите с високо рисковите, но и протективните за ЗД1 хаплотипове стават по-слаби с напредване на възрастта на диагностициране [93, 252]. Обратно – рисковите за ЗД2 генотипове са със сходна честота при GAD-положителни лица в средна възраст и случаите на класически ЗД2, докато при младите лица с положителни антитела тя е по-ниска [45]. Освен това връзката между LADA и определен генетичен риск се оказва зависима от титъра на антителата [29]. Потвърждаването на асоциация с рискови гени, които са общи и за ЗД2 предимно сред лица с нисък титър на антителата [706], и установяването на най-висока честота на рисковите за ЗД1 генотипове при пациенти с висок титър [29] отново насочва вниманието към хетерогенността на LADA.

Таблица 3. Сравнение в честота на хаплотипове на рискови генетични варианти, участващи в предиспозицията към ЗД1, ЗД2, LADA.

хаплотипове	спрямо ЗД2	спрямо ЗД1	спрямо контроли без ЗД
DQB1*0201/0302	↑ [618], [93], [29], [222] — [29] (лица с нисък Ат титър срещу ЗД2)	↓ [618]; [29] (лица с висок титър срещу ЗД1 с диагноза над 35г.в.), [222] — [253], [93]	↑ [618],
DQB1*0302	↑ [618], [29],[222] — [29] (лица с нисък Ат титър срещу ЗД2)	↓ [618], [222] — [253]	↑ [618], [253]
DQB1*0201	↑ [29],[222] — [29] (лица с нисък Ат титър срещу ЗД2)	— [253] ↓ [222]	
DQB1 * 0602[†] или *0603[†]		↑ [93]	— [618]
DR3		— [253]	↑ [253]
DR4		— [253]	↑ [253]
DR3/DR4		— [253]	↑ [253]
DR4-DQB1*0302		— [253]	↑ [253]
DR3/DR4-DQB1*0302		— [253]	↑ [253]
PTPN22, rs2476601	↑ [29]	↓ [29]	↑ [93]
PTPN22, rs6679677		↓ [409]	↑ [409]
INS VNTR, rs689	↑ [222]	↑ [409] ↓ [29], [222]	↑ [93]
CTLA4, rs3087243	↑ [29](лица с висок Ат титър срещу ЗД2), [222]	↓ [29] ↑ [222]	
TCF7L2 rs7903146	↓ [409]	↑ [93], [706] (нисък титър срещу лица с висок титър или ЗД1),	↑ [93], [581], [379], [706](лица с нисък Ат титър срещу контроли) — [409]
HNF1A, rs12427353	— [409]		↑ [409]

[†] Протективни за ЗД1; „↑“: по-висока алелна честота; „↓“: по-ниска алелна честота; „—“: без статистически значима разлика.

Разпознаването на LADA единствено въз основа на клиничната картина понякога може да бъде затруднено и само изследваните антитела биха потвърдили диагнозата [290, 414,]. Въпреки това, повечето наблюдения сочат по-нисък ИТМ, по-малка обиколка на талията, по-добър липиден профил и по-ниска честота на метаболитния синдром при LADA в сравнение с ЗД2 [123, 233, 290, 414, 722], въпреки обичайно по-лошия гликемичен контрол при автоимунен захарен диабет [28, 123, 414]. Пациентите с LADA се отличават и с по-висока предразположеност към други автоимунни заболявания, особено на щитовидната жлеза [705].

Все пак, диабетиците, отговарящи на критериите за LADA, се различават и от лицата с поставена диагноза ЗД1 – последните са по-млади при диагностициране на заболяването, с още по-нисък ИТМ и обиколка на талията или отношение талия-ханш [232], но имат сравнима честота на метаболитния синдром и сходни метаболитни показатели с лицата с LADA [233].

Пациентите с LADA също са хетерогенна популация, дала основание за предложението за разделянето му на два подвида, доближаваци се до клиничните и лабораторни особености на ЗД1 или ЗД2, което е обвързано с титъра на антителата [81, 372]. Има и наблюдения, че пациентите с висока (>200 WHO units) и ниска (70-200 WHO units) концентрация на антитела срещу GAD65 се различават по ИТМ, обиколка на талията, нивото на триглицеридите [232], честотата на метаболитния синдром [81], макар и за последната да е изключвана статистическа значимост [233]. Лицата с нисък титър на антитела се очаква да се доближават до фенотипа на ЗД2 [372], но все пак при последния има по-висок ИТМ и по-голяма обиколка на талията, придружени от по-неблагоприятен липиден профил и поддържане на по-високо АН [232]. Интересни са наблюденията в проучването Action LADA 7, които сравняват лица с LADA, които са GAD65A негативни, но IA-2A или ZnT8A позитивни, с пациенти със ЗД2, при които всички антитела са отрицателни – лабораторните метаболитни показатели и контролът над артериалното налягане не се различават помежду им, но по-високи стойности на ИТМ и обиколката на талията се запазват при ЗД2 [232].

Тези резултати при сравняването на LADA и ЗД2 отразяват разликата в инсулиновата чувствителност и бета-клетъчната функция при двете състояния. Още първите статии, загатващи идеята за латентно протичащ автоимунен диабет сред лица над 35 годишна

възраст, сочат по-ниското базално и стимулирано ниво на С-пептид при диабетици с положителни анти-островноклетъчни антитела [216], подкрепено и от други студии след това [123, 720] включително при сравними по ИТМ пациенти [89]. Следват множество проучвания, които сочат, че бета-клетъчната функция при LADA се влошава по-бързо отколкото при ЗД2 [68, 94, 211, 414, 612, 692], но по-бавно спрямо ЗД1 [253, 317], и то с различни темпове в зависимост от титъра на антителата [81], който има и предиктивна стойност по отношение на срока за включване на инсулинолечение [348, 612, 692]. Въпреки това, има и студии, които не намират разлика в инсулиновата секреция при сравними по ИТМ диабетици с положителни и отрицателни диабет-асоциирани антитела [289]. Проучването LADA China 3 съобщава за сходна тенденция в динамиката на бета-клетъчната функция при пациенти с ниска концентрация (под 180 IU/ml) на GAD65A и ЗД2 [371].

Инсулиновата резистентност е част от патогенезата на ЗД2 [342] и, предвид разликата в антропометричните показатели спрямо лицата с LADA, очаквано тя се среща по-рядко при последните [52, 123, 580], но по-често от колкото при ЗД1 [52]. Дори има наблюдения, че се различава и в зависимост от титъра на антителата като НОМА индексът е по-висок при нисък титър (1.6 ± 1.1 срещу 2.1 ± 1.1 , $P=0.001$) [358]. Въпреки това, при сравним ИТМ инсулиновата резистентност се наблюдава сред автоимунен диабет не по-рядко отколкото при ЗД2 [89, 101]. Липса на разлика в инсулиновата чувствителност при сравними по ИТМ пациенти със ЗД2 и LADA потвърждават и в проучването Action LADA 9 [289].

Предвид ролята на хроничното ниско-степенно възпаление при развитието на ЗД2 [223] и наблюдаваната при него по-висока честота на метаболитния синдром спрямо тази при пациентите с LADA [233], при последните очаквано се наблюдава по-ниско ниво на инфламаторни цитокини като IL-1RA, TNF α , IL-6 [467], разтворими фракции на адхезионни молекули като E-selectin, ICAM-1 и VCAM-1 [468] отколкото при ЗД2, но стойностите им са сравними с тези при ЗД1 [467, 468]. Разлика при някои от показателите (IL-6 и E-selectin) се намира и при сравнението им сред лица с високо ниво на GAD65A и тези с ниско такова при използван праг от 200 IU/ml, като при последните резултатите са по-високи [526].

Клиничната картина понякога не е достатъчна за разграничаването между класически ЗД2 и автоимунен диабет при възрастни [290] и това е основната причина за изследване на диабет-асоциирани антитела при възрастни в клиничната практика. Сериозен диагностичен проблем представляват случаите на позитивни антитела с нисък титър, особено когато се касае за единствено антитяло. Не без основание някои автори разделят LADA на два подвида - LADA1 и LADA2, патофизиологията и клиничният ход на които се доближават повече до съответно ЗД1 и ЗД2 и са обвързани със стойностите на антителата [372], а други апелират за поставянето на диагностичен праг на тези показатели, който да диференцира различните клинични варианти на заболяването [630].

Решението за преминаване към инсулинолечение не винаги е лесно. Теглото на пациента, рискът от хипогликемии, нежеланието или техническото затруднение да се премине към този вид терапия могат да бъдат сериозно предизвикателство в лечението на захарния диабет. **На този етап няма доказателства, че ранното включване на инсулин може да предотврати влошаването на бета-клетъчната функция при LADA и изборът на терапия следва да се ръководи от клиничните показатели и гликемичния контрол [340].** Ако той е отличен, наличието на антитела може да послужи като предупреждение за срочна необходимост от инсулин, а не основание за неговото включване. Въпреки това, пациентите с LADA се очаква да имат по-ранна необходимост от него и отлагането му може да доведе до остри хипергликемични усложнения [340]. Превантивното му започване при лица с фенотип на ЗД2, но положителни антитела би имало ефект върху профилактиката на глюкотоксичността, но не и имуномодулаторен ефект, ограничаващ загубата на инсулин-продуциращи клетки [569, 609]. Макар да има отделни наблюдения, че малки дози подкожен инсулин могат да предотвратят бета-клетъчното функционално изчерпване [316], проспективни проучвания отхвърлят такава връзка [123]. В случаите, в които наблюдаваме достатъчно добър гликемичен контрол, обичайно има и съхранена бета-клетъчна функция спрямо тази при лица с нестабилен ход на заболяването и терапевтичният подход следва да бъде индивидуален [94].

Познаването на понятието латентен или бавно-прогресиращ автоимунен диабет или дори ЗД1 с късно начало е важно и трябва да присъства в диференциалната диагноза на декомпенсирания ЗД2. Все още много диабетици остават на перорална терапия, въпреки

че тя вече не осигурява търсения гликемичен контрол и инсулинолечението се отлага поради кратка давност на заболяването.

В заключение, представените аспекти на хроничното възпалително състояние при метаболитен синдром и ЗД2 подчертават комплексното участие на имунната система в патогенезата на тези заболявания. Моноцитите и макрофагите, инфилтриращи инсулин-чувствителните тъкани, търпят количествени промени и динамика в спектъра на повърхностно експресирани от тях молекули. Тези клетки се оказват хетерогенна популация и не е ясно дали всеки от подтиповете моноцити например има индивидуален принос към възпалителния процес при ЗД2. Липсват литературни данни за връзката между повърхностната експресия на някои от описаните в обзора рецептори (CD36, CD163, CD64) и нивото на инфламаторни цитокини и hs-CRP при ЗД2. Не е ясно какво е мястото на sTLR2 и sTLR4 спрямо повърхностната експресия на тези рецептори при ЗД2 и дали могат да допълнят IL-6, IL-18, hs-CRP или други разтворими рецептори като sCD36 и sCD163 като предиктори за развитието на ЗД2. Остава въпросът по какъв механизъм полиморфизмите в гените *TLR4* и *PPARG* повлияват риска от заболяването и фактът, че кодираните от тях протеини имат пряко или индиректно участие в имунния отговор, се отразява на хроничното-възпалително състояние, модулирайки по този начин инсулиновата резистентност. Още повече, не установихме данни за честотата на тези полиморфизми в българската популация. Ролята и честотата на диабет-асоциираните антитела при пациенти, диагностицирани със ЗД2 също подлежи на уточняване. Разликата в метаболитния и инфламаторен профил при ЗД2 и LADA налага необходимостта пациенти с вероятен автоимунен ЗД да бъдат отдиференцирани в анализа на изследваните цитокини, разтворими рецептори и моноцитна експресия.

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-1 β , IL-6, TNF α , 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 Участници в проучването

3.1.1 Пациенти със ЗД2

В проучването бяха включвани лица със ЗД2, набирани от хоспитализираните в клиниката пациенти, отговарящи на следните критерии:

Включващи критерии:

- мъже и жени на възраст между 36 и 64 г.
- поставена диагноза ЗД2 с давност на заболяването до 10 години.

Изключващи критерии:

- 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

3.1.2 Пациенти с латентен автоимунен захарен диабет (LADA)

Включени бяха лица с LADA, набирани от хоспитализираните в клиниката пациенти, отговарящи на следните критерии:

Включващи критерии:

- мъже и жени на възраст между 36 и 64 г.
- 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.

Исключващи критерии:

- 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

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

В проучването бяха включвани лица, набирани от хоспитализираните в клиниката пациенти, при които е показано провеждането на орален глюкозотолерансен тест (ОГТТ) (поради затлъстяване и/или метаболитен синдром, фамилна обремененост, ендократно установена висока ПГГ), отговарящи на следните критерии:

Включващи критерии:

- мъже и жени на възраст между 36 и 64 г.
- резултат от ОГТТ със 75 г глюкоза, показващ наличието на НГГ: ПГГ ≥ 5.6 и < 7.0 mmol/l; и/или НВТ с плазмена глюкоза на 120-та минута ≥ 7.8 и < 11.1 mmol/l съгласно критериите на ADA с оглед обхващането на по-голям брой участници в риск [24]

Исключващи критерии:

- възраст под 36 и над 64 г.
- резултат от ОГТТ, сочещ диагноза ЗД
- 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/м², 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.

Всички участници в изследванията дадоха информирано съгласие. За всички беше създадена база данни в програма SPSS 21 (Chicago, Illinois). Всеки от тях получи индивидуален код, с който бяха означени и пробите, предназначени за биохимичен и генетичен анализ. В табличен вид бяха отразени данни на пациентите и контролните лица, включващи:

- Паспортни данни – дата на раждане, възраст, пол
- За участниците със ЗД2 – давност на заболяването и възрастта на която е поставена диагнозата, провежданото антидиабетно лечение, наличие на изследвани диабет-асоциирани антитела
- Анамнеза за придружаващи заболявания, прием на медикаменти, тютюнопушене
- Наличие на метаболитен синдром съгласно критериите на IDF'2005 [274].
- Антропометрични данни – ръст, тегло, ИТМ, обиколка на талията
- Хемоглобин, левкоцити, СУЕ, а за участниците, при които е предвидена флоуцитометрия – и диференциална кръвна картина
- ППГ. За участниците със ЗД2 – постпрандиална плазмена глюкоза (ППГ), измерена два часа след обедното хранене и HbA1c. За участниците с предиабетно състояние – плазмена глюкоза на втория час след ОГТТ.
- Липиден профил - общ холестерол, HDL, LDL, VLDL, триглицериди

- Серумен креатинин и изчислена гломерулна филтрация – estimated glomerular filtration rate (eGFR) по формула на The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD):

$$186 \times (\text{креатинин, } \mu\text{mol/l} / 88.4)^{-1.154} \times (\text{възраст})^{-0.203} (\times 0.742 \text{ за жени}).$$

Хематологичните и биохимични изследвания са извършвани по стандартни методики в Централна клинична лаборатория към УМБАЛ „Александровска“, която е референтна за България.

При участниците със ЗД2 се проведе оценка на **неврологичния статус** полуколичествено чрез Neuropathy Disability Score [653, 694]. При тях се проведе **фундоскопия** от офталмолог с цел скрининг за наличието на ДРП.

От участниците от всички групи е взета венозна кръв на гладно (след поне 8 часа гладуване през нощта) чрез венепункция в епруветки с КЗЕДТА – 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 -80°C 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 +4°C за не повече от 48 ч преди доставянето в лабораторията.

3.2 Изследване на инфламаторни показатели в серум

3.1.1 Hs-CRP

За количествено определяне на С-реактивен протеин (CRP) в човешки серум използвахме 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). По данни на производителя обхватът на изследване на теста е 0.15-20.0 mg/L, с функционална чувствителност 0.3mg/L.

Реактивите са готови за употреба. Апаратът изчислява автоматично концентрацията на анализ в във всяка проба в mg/l.

3.2.2 IL-6

За количественото определяне на IL-6 използвахме Електрохемилюминисцентен имунотест (ECLIA) (Roche Diagnostics GmbH, Германия), с анализатор Elecsys 2010 (Roche Diagnostics GmbH, Германия). По данни на производителя обхватът на изследване на теста е 1.5 - 5000 pg/mL.

Реактивите са във фабрично подготвени, готови за употреба модули, които не могат да се разделят. Анализаторът автоматично изчислява концентрацията на анализ в във всяка проба в pg/mL.

3.2.3 TNF α

За определяне на TNF α в серум използвахме имуноензимен тест - Human TNF α enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Diacclone, Франция). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на TNF α е 8 pg/ml.

За изпълнение на метода следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита. Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 6 стандарта и Blank. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива.

3.2.4 IL-1 β

За определяне на IL-1 β в серум използвахме Human IL-1 β ELISA kit (Diacclone, Франция). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на IL-1 β е 6.5 pg/ml.

За изпълнение на метода следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита. Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 6 стандарта и Blank. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива.

3.2.5 IL-18

За определяне на IL-18 в серум използвахме Human IL-18 ELISA kit (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Япония). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на IL-18 е 12.5 pg/ml.

Методът беше изпълнен съгласно инструкциите на производителя, приложени в кита. Използван беше инкубатор Merck. Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 5 стандарта и Blank. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива и умножени по 5 поради предварителното разреждане.

3.2.6 Soluble TLR2 и Soluble TLR4

За определяне на разтворими фракции на TLR2 и TLR4 в серум използвахме Human TLR2 ELISA kit и Human TLR4 ELISA kit (Elabscience, САЩ). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция е в диапазона е 0.31-20 ng/ml.

Методът беше изпълнен съгласно указанията на производителя. Използва се инкубатор Merck. Резултатите се отчетоха на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със 7 стандарта. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо, включително тези извън посочения обхват, се преизчисляват като концентрация на TLR2 и TLR4 в тестваните проби в ng/ml, съгласно построената калибрационна крива (4-PL).

3.3 Изследване на диабет-асоциирани антитела

3.3.1 Анти GAD65 антитела (GAD65A)

За определяне на GAD65A в серум използвахме Anti-GAD (IgG) ELISA kit (Euroimmune Medizinische Labordiagnostika AG, Германия). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на GADA е 0.2 IU/ml. В програмата Diabetes Autoantibody Standardization Program (DASP) 2005 използваният ELISA kit е оценен с 98% специфичност и 92% чувствителост.

Методът беше проведен съгласно инструкциите на производителя, приложени в кита. Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 6 стандарта. Резултатите са количествени и се представят в U/ml.

Референтни граници съгласно производителя:

< 10 U/ml - отрицателен

≥ 10 U/ml – положителен

3.3.2 Анти IA-2 антитела (IA-2A)

За определяне на анти IA-2A в серум използвахме Anti-IA2 (IgG) ELISA kit (Euroimmune Medizinische Labordiagnostika AG, Германия). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на IA-2A е 0.7 IU/ml. В програмата DASP 2005 използваният ELISA kit е оценен с 99% специфичност и 66% чувствителост.

Методът беше изпълнен съгласно указанията на производителя. Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 6 стандарта. Резултатите са количествени и се представят в U/ml.

Референтни граници съгласно производителя:

< 10 U/ml - отрицателен

≥ 10 U/ml - положителен

3.3.3 Анти ZnT8 антитела (ZnT8A)

За определяне на ZnT8A в серум използвахме Anti-ZnT8 (IgG) ELISA kit (BioVendor – Laboratorní medicína a.s., Чехия). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на ZnT8A е 1.2 U/ml. В проучването IASP 2012 използваният кит BioVendor ZnT8 Ab ELISA kit е оценен с 99% специфичност и 72% чувствителост.

Методът беше изпълнен съгласно указанията на производителя. Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 405/450 nm и програма PGM с 6 стандарта. Резултатите са количествени и се дават в U/ml.

Референтни граници съгласно производителя:

< 15 U/ml - отрицателен

≥ 15 U/ml – положителен

Посочените антитела и инфламаторните маркери са изследвани в Централна клинична лаборатория на УМБАЛ „Александровска“. Разтворимите фракции на TLR2 и TLR4 са изследвани в Лабораторията по клинична имунология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“.

3.4 Изследване на моноцитни маркери чрез флоуцитометрия

Флоуцитометрията се проведе в Лабораторията по клинична имунология на ВМА, София.

За определяне на моноцитните подтипове е използвана цяла венозна кръв взета с К₃ЕДЕТА (етилен диамин тетраацетат) като антикоагулант. Пробите са съхранявани на стайна температура за не повече от 24ч. Те са обработени съгласно методичните указания на фирмата производител на използваните моноклонални антитела (МКА).

За провеждането на флоуцитометрия е приложено директно имунофлуоресцентно маркиране, като МКА 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). Анализът 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 подложи 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⁺⁺) [718].

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.

3.5 Генетичен анализ

Генетичният анализ е проведен в УАГБ “Майчин дом”, Национална генетична лаборатория.

За генетичен анализ се използва високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки. По международни изисквания 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 $+4^{\circ}C$ в продължение на максимум 48 часа преди изследването.

3.5.1 Изолиране на високомолекулна ДНК

Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв се осъществи чрез изсолване на белтъците по протокол на Miller и сътр [406].

Принцип на работа:

Етапи на екстракция:

- Разрушаване на кръвните клетки с хипотоничен солеви разтвор;
- Утаяване на ядрата чрез центрофугиране;
- Лизиране на ядрата с подходящ за целта буфер (еритроцит лизиращ буфер) и протеиназа К в присъствието на детергент – натриев додецил сулфат (SDS), при което протеините губят структурата си и така се създават условия за по-лесно действие на протеиназата;
- Изсолване на остатъците от белтък с преситен разтвор на NaCl;
- Утаяване на ДНК с абсолютен алкохол.

Буфери реактиви, използвани при солево изолирането на ДНК:

- Еритроцит лизиращ буфер: 155 mM NH_4Cl , 10 mM $KHCO_3$, 0.1 mM Na_2EDTA (pH 7.4);
- Нуклеолизиращ буфер (SE buffer): 75 mM NaCl, 25 mM Na_2EDTA (pH 8.0);
- Трис – EDTA буфер (TE buffer): 10mM TRIS/HCl (7.4 pH), 1mM EDTA (pH 7.4);
- Протеиназа К (10 mg/ml);
- 10% Натриев додецил сулфат (SDS);

- 6M NaCl;
- 80% Етилов алкохол.

Използвана апаратура:

- Хладилна центрофуга (MPW 360);
- Устройство за разбъркване (Vortex–Genie 550);
- Хоризонтални електрофоретични вани (Pharmacia®).

Техника:

В пластмасова епруветка от 50ml се изливат от 6 до 10ml кръв и се добавя 1x студен лизиращ буфер до обем 50ml. Пробите се поставят на 30мин. в лед при неколккратно разклащане. Следва центрофугиране за 10мин. при 3000 rpm и температура +4°C. Супернатантата внимателно се отстранява и пробите се оставят да се отцедят върху филтърна хартия. Утайката се суспендира с 10ml 1x студен лизиращ буфер, центрофугира се еднократно при същите условия и супернатантата се отлива.

Ядрените клетки в утайката от предходния етап се лизират в разтвор със състав 5ml SE буфер, 25µl протеиназа К с концентрация 10mg/ml, 400µl 10% SDS.

Пробите се инкубират цяла нощ при 37°C, или при 55°C – за 5 часа.

След протеолитичното действие на ензима, в пробите се добавя 2 ml преситен разтвор на NaCl, разбъркват се добре на вортекс и се центрофугират 15 мин. при 3000 rpm на стайна температура. Надутаечната течност се отлива внимателно в чиста епруветка от 50ml и към нея се добавят 2 обема ледено студен абсолютен етанол. След няколко секунди ДНК видимо преципитира и изплува на повърхността. Тя се навива на стерилна, извита пастърка и се промива от солите чрез потапяне в епруветка с 80% етанол. Изсушава се за 5мин, след което в зависимост от количеството ѝ се разтваря в съответен обем TE буфер на шейкър за няколко часа при стайна температура или цяла нощ.

3.5.2 Полимеразната верижна реакция.

Качествена оценка на изолираната ДНК се проведе чрез полимеразната верижна реакция (PCR).

Във всяка амплификационна реакция участват:

- ДНК едновержна матрица за осъществявания процес, получена след термична денатурация на геномната ДНК;

- Таq-полимераза за размножаване на желаната ДНК последователност.
- Праймери (зародиши) – къси синтетични олигонуклеотиди (14–40 нуклеотида), комплементарни на ограничаващите размножаваната последователност участъци.
- Дезоксинуклеотидтрифосфати–дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ като субстрат за изграждане на новосинтезиращата се верига.
- Реакционен буфер за подходящото рН=8.3–9.0 на средата и необходимите йони за работа на ензима. Включва в състава си 10–50 μM Tris–HCl с рН=8.3–9.0; до 50 μM KCl и 0.5–5.0 mM MgCl₂. Освен това, може да съдържа и желатин, говежди серумен албумин (BSA), нейонни детергенти (като DMSO–диметил сулфооксид) и други.

Етапи:

Полимеразната верижна реакция започва с първоначална продължителна денатурация, която цели разделяне на двойноспиралната верига на геномната ДНК. Амплифицирането на желания участък се осъществява при многократно повтаряне на серия от цикли с определена температура, всеки от които включва следните три стъпки:

- *Термична денатурация (denaturation)* при 90 до 95°C - пълно разделяне на двойноверижната ДНК до едновержни матрици за амплификация;
- *Хибридизация (annealing)* между праймерите и комплементарните им участъци от матричната едновержна ДНК.
- *Нарастване (extension)* или синтезиране на нова, комплементарна на матричната, ДНК верига в посока 5'–3', обикновено при температура 72°C.

За целите на PCR бяха използвани следните праймери:

Таблица 4. Нуклеотидна последователност на използваните праймери.

Полиморфизъм	Нуклеотидна последователност на праймерите
<i>PPARG</i> Pro12Ala	F 5'GCCAATTCAA GCCCAGTC3' R 5'GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGCTTTCCG3'
<i>TLR4</i> Asp299Gly	F 5'GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG3' R 5'GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC3'
<i>TLR4</i> Thr399Ile	F 5'GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA3' R 5'ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGAGTTAAATGCT3'

За ензимното намножаване на анализирани гени чрез PCR метода бяха използвани компонентите, показани на таблица 5. За да се предпазят пробите от изпарение, на микроепруветките се надсложва течен парафин. Епруветките се фиксират върху статива на PCR апарата.

Таблица 5. Компоненти на реакционната смес за осъществяване на амплификацията на полиморфния участък в анализирани гени.

Компоненти за реакционната смес за PCR	Количество (µl)
dd H ₂ O	11.2
Буфер	1.5
дНТФ	0.6
Праймер F	0.3
Праймер R	0.3
Таг –полимераза	0.1
ДНК	1
Краен обем	15
ddH ₂ O - двойно дестилирана вода, дНТФ – дезоксинуклеотид трифосфат	

Оптималните условия са посочени в таблица 6.

Таблица 6. Условия за амплификация при изследваните полиморфизми.

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

3.5.3. Рестрикционен анализ

PCR се последва от рестрикционен анализ. Използват се рестрикционни ендонуклеази (рестриктази), които разпознават строго специфични палиндромни последователности. В резултат на нуклеотидни промени се създават или се унищожават вече съществуващи рестрикционни места. Тези промени могат да се установят чрез амплификация на изследвания ДНК участък и обработка на PCR продуктите със съответната рестриктаза. Получените фрагменти се разделят по молекулна маса в полиакриламидна или в агарозна електрофореза.

За доказване на полиморфизмите с помоща на рестрикционен анализ бяха използвани отбелязаните в таблица 7 рестриктази, а съставът и количеството на използваните реактиви са описани в таблица 8. Анализът се провежда overnight на 37⁰C. Разделянето на фрагментите се осъществява на 2.5% агарозен гел.

Таблица 7. Използвани при рестриционния анализ ензими.

Полиморфизъм	Рестриктаза	Секвенционна последователност	Див тип (б.д.)	Нов тип (б.д.)
<i>PPARG</i> Pro12Ala	BSTU I	5'GCCAATTCAA GCCCAGTC3' 5'GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGTG AAGGAATCGCTTCCG3'	270	227+43
<i>TLR4</i> Asp299Gly	Nco I	5'GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG3' 5'GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC3'	249	223+26
<i>TLR4</i> Thr399Ile	Hinf I	5'GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA3' 5'ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGAGTTAAATGCT3'	407	378+29
б.д. – базови двойки				

Таблица 8. Състав и количество на използваните реактиви и разтвори при рестриционен 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 ₂ O	9.8 µl	10 µl	9.8 µl
Краен обем	25 µl	25 µl	25 µl
BSA - говежди серумен албумин , ddH ₂ O- двойно дестилирана вода			

3.6 Статистически анализ

Данните бяха въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 21.0.

За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе избрано $p < 0,05$.

Бяха приложени следните методи:

- **Дескриптивен анализ** – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.
- **Графичен анализ** – за визуализация на получените резултати.
- **Точен тест на Fisher и тест χ^2** – за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни променливи.
- **Непараметричен тест на Shapiro-Wilk или тест на Kolmogorov-Smirnov** – за проверка вида на разпределението.
- **T-тест на Student** – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки при правилно разпределение.
- **Непараметричен тест на Mann-Whitney** – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки при неправилно разпределение.
- **One Way ANOVA** за различие при повече от две независими извадки с правилно разпределение с тест на Tukey за post-hoc анализ.
- **Тест на Kruskal Wallis** за различие при повече от две независими извадки с неправилно разпределение.
- **Корелационен анализ** – за търсене на линейна зависимост между количествени признаци.

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 9).

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.

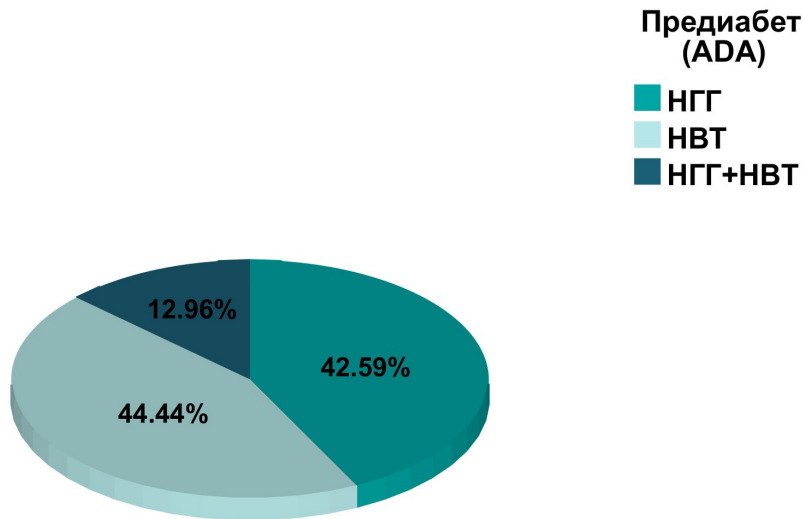
В нивото на TNF α не констатирахме сигнификантна разлика между групите. Нивото на IL-1 β беше измеримо само при 18 от всички пациенти със ЗД и 7 от контролните участници, поради което резултатите не бяха подложени на статистически анализ.

Таблица 9. 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/m²)	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
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 ОГГТ	-	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)	3.03±0.96	3.35±1.00^	2.39±1.21	3.28±1.02
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/1.73m²)	95.0±24.5**	85.5±21.3‡^	100.1±22.7**	82.0±15.5
Hs-CRP (mg/l)	2.40±1.61**^	2.44±1.73**^	1.44±1.39†*	0.92±1.27
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

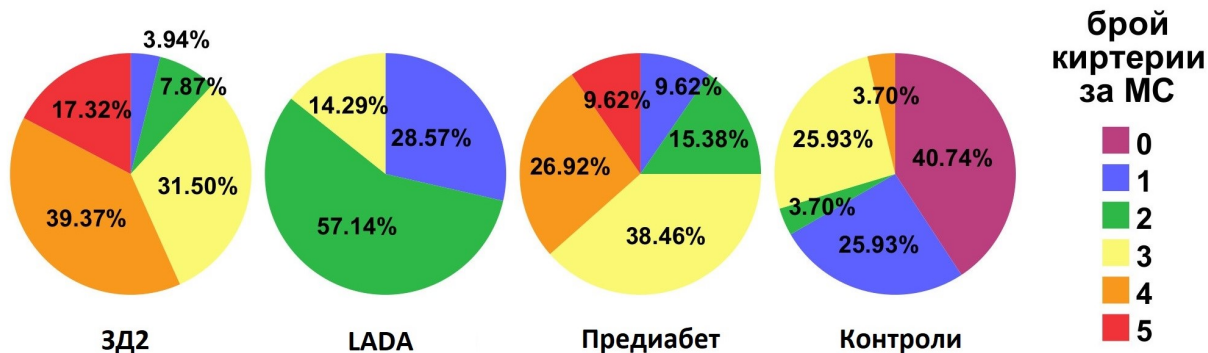
*p<0.05 спрямо контролите; **p<0.01 спрямо контролите; †p<0.05 спрямо Аб-ЗД2; ‡ p<0.01 спрямо Аб-ЗД2; ^p<0.05 спрямо LADA; ^^p<0.01 спрямо LADA; МС- метаболитен синдром

Разпределението на участниците с предиабет е отразено на фигура 2. От тях 44.44% бяха с НГГ според критериите на ADA, 42.59% - с НВТ, а при 12.96% се установиха и двете.



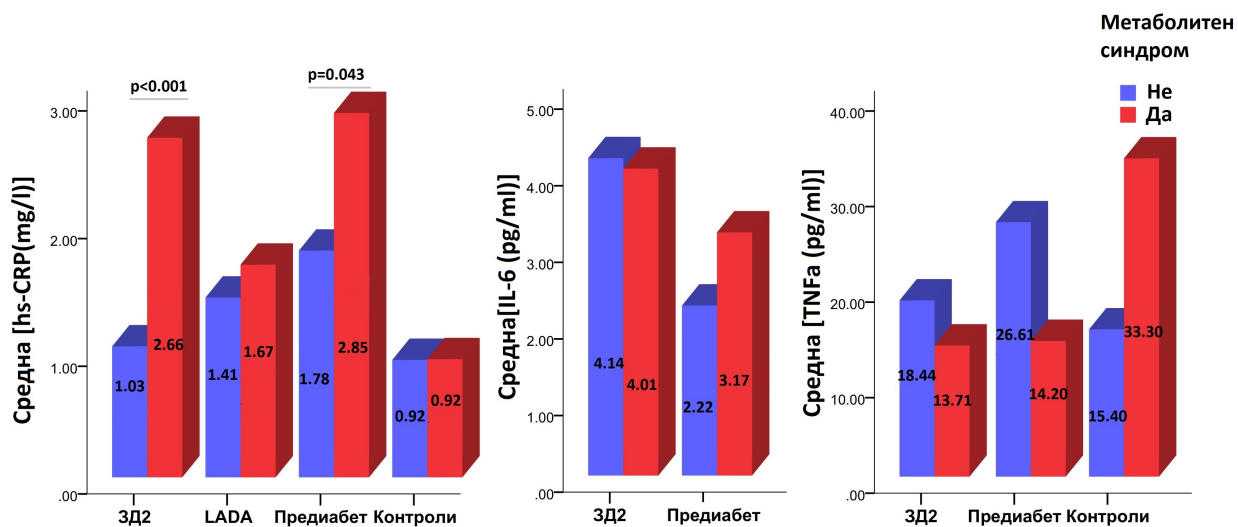
Фигура 2. Разпределение на участниците с предиабетно състояние.

Фигура 3 отразява разпределението на броя критерии за диагноза на метаболитен синдром при включените лица. Вижда се, че в групата със ЗД2 и предиабет, при които честотата му е най-висока, водещи са случаите на 3 или 4 критерия за диагностицирането му, а сред лицата с LADA и контролите наличието на повече от 3 критерия е рядко – само при един участник. Сред нито една от групите със ЗД и лица в предиабетно състояние няма случаи, при които да не се установява нито един критерий за метаболитен синдром (Фигура 3).



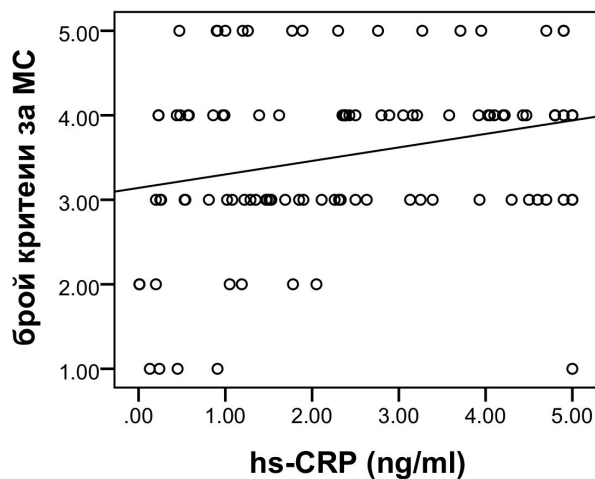
Фигура 3. Разпределение на броя критерии за метаболитен синдром сред групите.

Нивото на hs-CRP, IL-6 и TNF α 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 4).



Фигура 4. 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 ($r=0.249$, $p=0.012$) (Фигура 5).



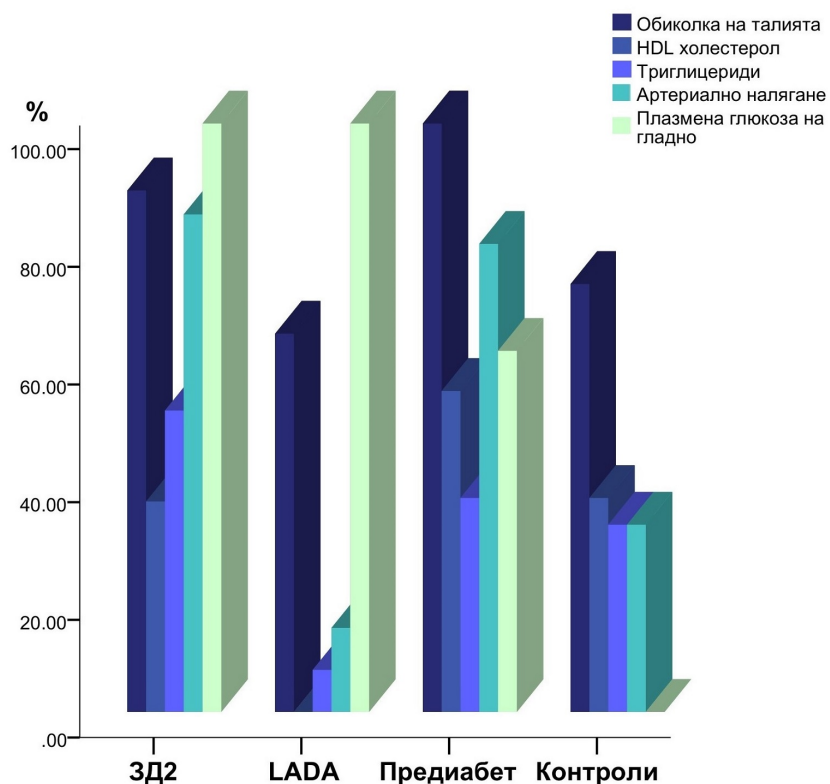
Фигура 5. Корелация между hs-CRP и броят критерии за МС при пациенти със ЗД2.

За останалите изследвани инфламаторни параметри не беше констатирана зависимост в нито една от групите (Таблица 10).

Таблица 10. Корелационни коефициенти между броя критерии за МС и инфламаторните параметри при участниците.

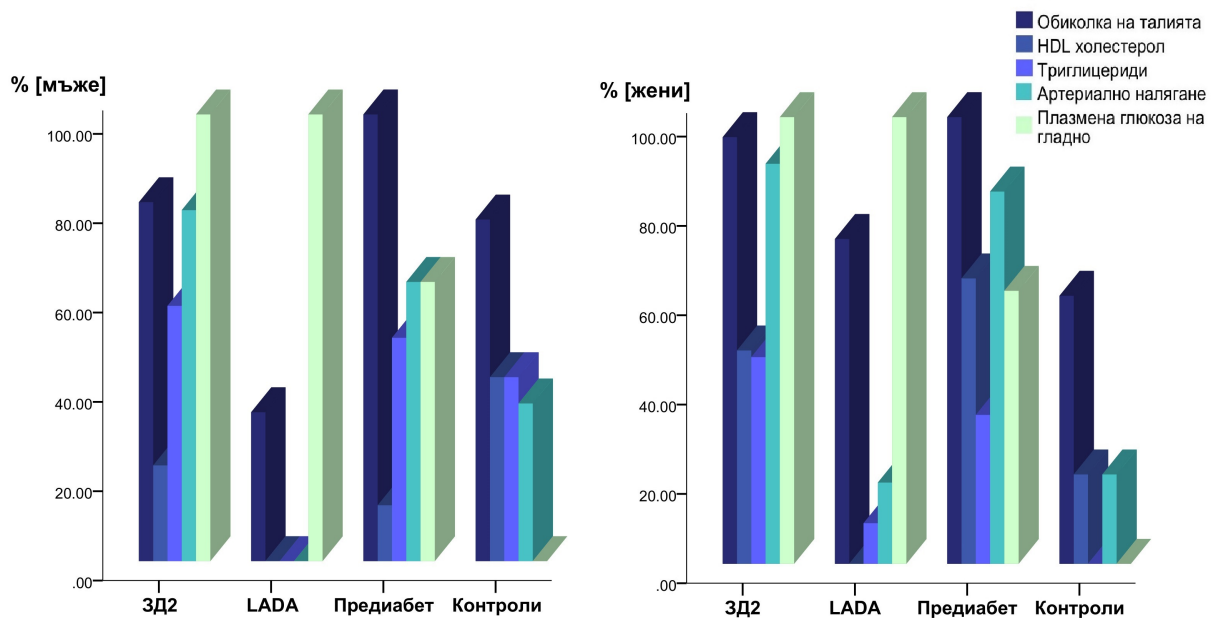
	ЗД2	Предиабет	LADA	Контроли
Hs-CRP	0.249*	0.240	-0.094	0.300
IL-6	-0.022	0.084	-	0.239
TNFα	0.129	-0.430	0.204	0.466

* $p<0.05$



Фигура 6. Честота на критериите за МС при участниците.

Най-често наблюдаваният критерий след ПГГ, която е водещ такъв поради естеството на анализиранияте участници, е обиколката на талията, следван от критерия за артериално налягане (Фигура 6). Предвид разликата в разпределение по пол за сметка на групата с предиабет, сравнението на честотата на критериите и в двата пола потвърди тенденцията – обиколката на талията е водеща след критерия за ПГГ (Фигура 7). Следва честотата на критерия за артериално налягане.



Фигура 7. Разпределение на критериите за метаболитен синдром по пол.

Корелационният анализ с параметрите, участващи като критерии за диагнозата на метаболитния синдром, но и допълнителни антропометрични, липидни и метаболитни показатели е отразен в таблица 11. 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.

Имайки предвид описаните изходни характеристики при отделните групи участници, бяха проведени и следващите анализи, целящи изпълнение на задачите по дисертационния труд.

Таблица 11. Корелационен анализ между възпалителните 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*
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
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*	-	-
ПГ на 120 ^{та} мин (ОГТТ)	-	-	-	0.126	0.068	-0.171	-	-	-	-

*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 12.

Таблица 12. 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%)

Основно положително антитяло сред лицата, включени като участници със ЗД2 е GAD65A. При всички участници с известен аутоимунен 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 12).

Нивото на GAD65A при лица, диагностицирани със ЗД2 и лица, покриващи критериите за LADA, се различава статистически в полза на последните (Таблица 13). 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 (255.73 IU/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 13. 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, N - number,			

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), пациентите с LADA и контролите са отразени в таблица 14. Половото разпределение не се различава статистически ($p = 0.310$). Възрастта при участниците със ЗД2 е по-висока от тази при контролите (Таблица 14). 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. Сравнителният анализ между участниците със ЗД2 с положителни и отрицателни антитела показва 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 аутоимунен 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 оказва статистически незначителна. Тя е несигнификантна и за двете групи спрямо контролите (Таблица 14).

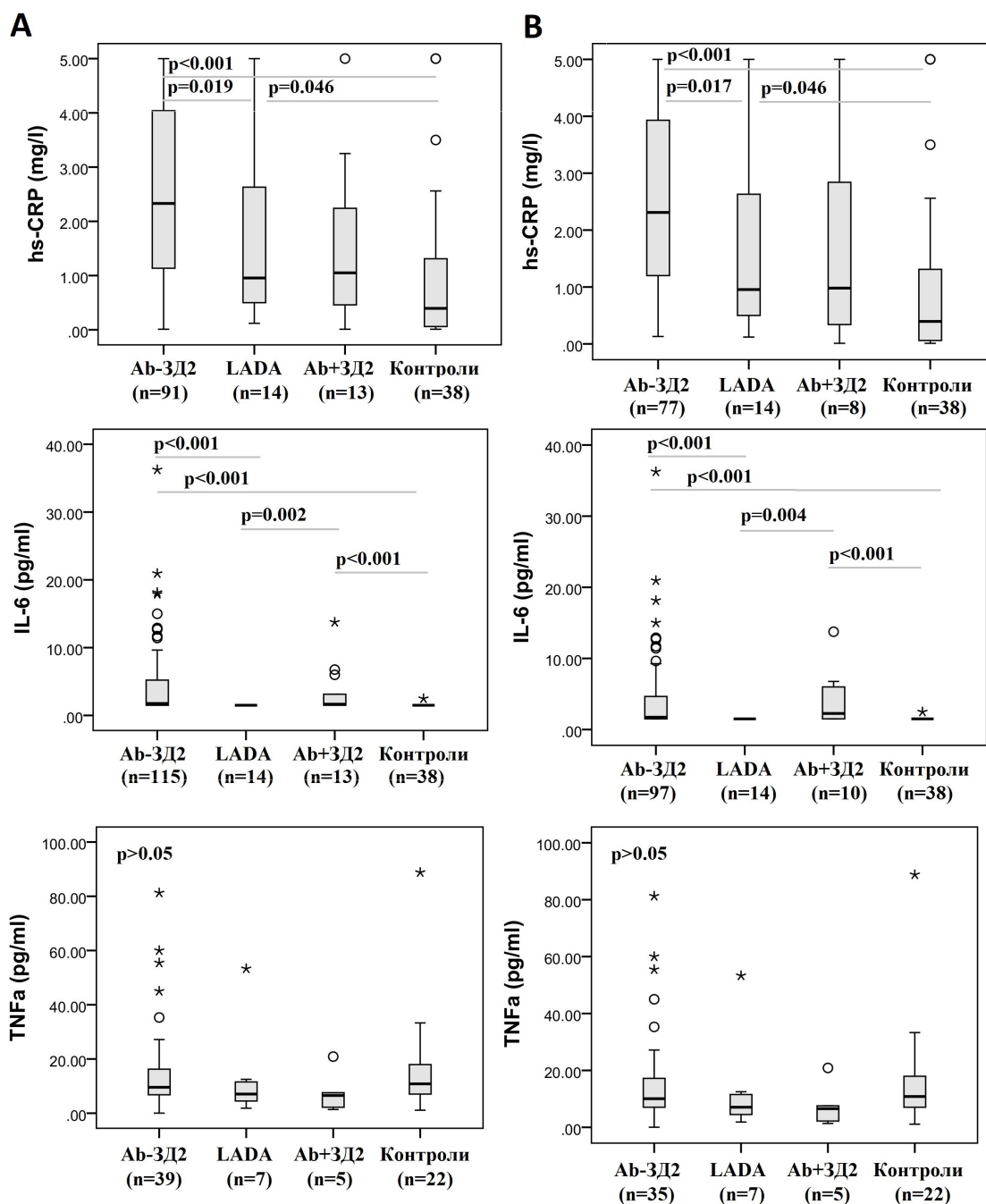
Нивото на инфламаторните показатели е сравнено и на фигура 8. Статистическа разлика беше констатирана спрямо hs-CRP и IL-6. Двата показателя са значително по-високи при пациенти със ЗД2 с отрицателни антитела както спрямо лицата с известен аутоимунен диабет, така и спрямо контролите. Спрямо участниците 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 8). За TNF α 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 8).

Таблица 14. Клинични и биохимични характеристики на участниците след разделянето им на Ab-3Д2 и Ab+3Д2.

	Ab-3Д2 (n=115)	Ab+3Д2 (n=13)	LADA (n=14)	Контроли (n=38)
Възраст (г)	53.8 \pm 6.7*	54.5 \pm 7.9*	50.1 \pm 7.9	52.3 \pm 4.2
Пол (ж/м)	64/51	6/7	11/3	20/18
Възраст при пост. диагноза (г)	49.4 \pm 7.4	50.7 \pm 8.7	45.9 \pm 8.4	-
Давност на 3Д (г)	4.4 \pm 3.2	3.8 \pm 2.4	3.3 \pm 2.5	-
МС (%)	89.6**^^	46.2‡	14.3‡	18.4
Акт. пушач(%)	40.0	53.8	28.6	52.6
ИТМ (kg/m²)	33.2 \pm 6.4**^^	28.5 \pm 7.1†*	24.9 \pm 3.5‡	23.7 \pm 3.3
ОТ (cm)	104.4 \pm 14.0**^^	96.8 \pm 17.4	85.4 \pm 9.3‡	88.3 \pm 13.2
САН (mmHg)	136.8 \pm 19.5**^^	127.3 \pm 13.9^	112.9 \pm 12.5‡	119.0 \pm 16.1
ДАН (mmHg)	84.0 \pm 1.0**^^	83.1 \pm 8.6*^	73.2 \pm 9.1‡	74.6 \pm 10.1
HbA1c (%)	7.9 \pm 1.9^^	8.9 \pm 1.7†	9.4 \pm 1.2‡	-
ПГГ (mmol/l)	7.8 \pm 2.7**	9.5 \pm 4.2**	7.8 \pm 2.6*	5.1 \pm 0.4
ППГ (mmol/l)	8.1 \pm 3.1	11.3 \pm 3.5 ‡	9.5 \pm 4.2	-
ОХ (mmol/l)	5.2 \pm 1.1	5.7 \pm 1.4	5.0 \pm 1.1	5.3 \pm 0.9
HDL (mmol/l)	1.3 \pm 0.4^^	1.7 \pm 0.6†*	1.8 \pm 0.5‡*	1.3 \pm 0.6
LDL (mmol/l)	3.0 \pm 0.9	3.1 \pm 1.5	2.4 \pm 1.2	3.3 \pm 1.0
VLDL (mmol/l)	0.8 \pm 0.3^^	0.8 \pm 0.5^	0.4 \pm 0.1‡	0.7 \pm 0.5
ТГ (mmol/l)	1.9 \pm 1.0**^^	1.8 \pm 1.2	1.1 \pm 1.0‡	1.3 \pm 1.2
eGFR (ml/min/1.73m²)	94.6 \pm 24.9**	98.9 \pm 20.2**	100.1 \pm 22.7**	82.0 \pm 15.5
Hs-CRP (mg/l)	2.50 \pm 1.60**^	1.61 \pm 1.52	1.44 \pm 1.39†*	0.92 \pm 1.27
IL-6 (pg/ml)	4.1 \pm 5.0**^^	3.5 \pm 3.6**^^	<1.5‡	<1.5
TNFα (pg/ml)	15.5 \pm 17.4	7.7 \pm 7.8	13.5 \pm 18.0	16.2 \pm 18.1

*p<0.05 спрямо контролите; **p<0.01 спрямо контролите; †p<0.05 спрямо Ab-3Д2; ‡ p<0.01 спрямо Ab-3Д2; ^p<0.05 спрямо LADA; ^^p<0.01 спрямо LADA; МС- метаболитен синдром



Фигура 8. Инфламаторни показатели при А) всички изследвани участници; В) след изключване на пациентите, приемали ацетил-салицилова киселина.

За hs-CRP и IL-6 са посочени само стойности от статистическа значимост.

Приеманата антидиабетна, антихипертензивна и липидо-понижаваща терапия е обобщена на таблица 15. Отразената терапия е тази, при която пациентите са включени в проучването. Необходимо е да се отбележи, че 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 секретарог (СУП, Инкретин-базирана терапия), се касае за използването на базален инсулин в схемата на лечение.

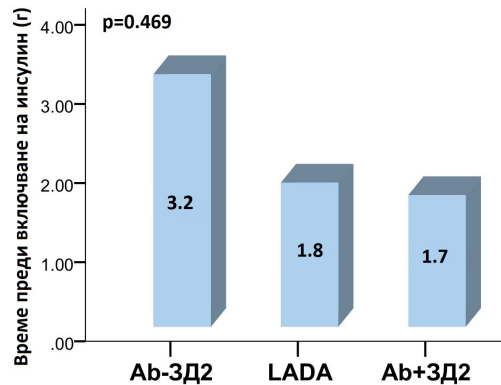
Таблица 15. Провеждано лечение при пациентите със ЗД.

Медикаменти	Ab-ЗД2	Ab+ЗД2	LADA
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 инхибитори	13/102(12.2)	1/12(7.7)	2/12(14.3)
GLP-1 агонисти/аналози	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)
АСЕ инхибитор	36/79(31.3)	5/8(46.2) [^]	1/13(7.1) [†]
АРВ	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 показва най-дълъг период при участниците с отрицателни

антитела, но разликата между трите групи остана статистически несигнификантна (фигура 9).



Фигура 9. Сравнителен анализ за периода от поставяне на диагноза ЗД до включване на инсулинолечение.

Предвид критериите, въз основа на които са включени участниците с LADA [75], общо 11 (8.59%) от установените в настоящия анализ случаи на положителни антитела сред пациентите със ЗД2 могат да бъдат класифицирани като LADA.

Статистическата значимост в използването на метформина при анализираниите пациенти касае само сравнението между лицата с отрицателни антитела и с LADA, а не тези с новооткрити положителни антитела – обект на основен интерес в рамките на настоящия анализ, целящ изпълнението на задачите на дисертационния труд.

Въпреки това повторихме анализа сред участниците, които не приемат метформин (Таблица 16). 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 16).

Таблица 16. Сравнителен анализ между участниците след изключване на лицата, приемали метформин преди изследването.

	Ab-3Д2 (n=28)	Ab+3Д2 (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 3Д (г)	48.4±8.1	53.3±5.3	45.7±9.9	-
Давност на 3Д (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/1.73m²)	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 спрямо контролите; †p<0.05 спрямо Ab-3Д2; ‡ p<0.01 спрямо Ab-3Д2; ^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 3Д2 (Таблица 11). За IL-6 те се губят при лицата с новоустановени положителни антитела, но персистира зависимостта, касаеща hs-CRP (Таблица 17). Такива зависимости не се наблюдаваха при пациентите с LADA (Таблица 11).

Таблица 17. 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
ППГ (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-CRP сред всички включени диабетици с положителни антитела в зависимост от нивото (под или над 200 IU/ml) на антителата и броя на положителните такива показва 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 оказва 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 18).

Участниците с положително едно антитяло и концентрация по-ниска от 200 IU/ml, за които се счита, че е по-вероятно да се доближават до пациентите със ЗД2, се установи значително по-голям брой показатели (ИТМ, обиколка на талията, HDL, VLDL холестерл и триглицериди, HbA1c и ППГ), включително hs-CRP спрямо антитяло отрицателните диабетици (Таблица 18).

Таблица 18. 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/m l (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

Честотата на **хроничните микросъдови усложнения** като ДПНП и ДРП, оценени съответно чрез NDS score и фундоскопия, не се различаваше между пациентите, включени с диагноза ЗД2 и LADA. Сравнителният анализ между всички антитяло позитивни и антитяло негативни случаи на ЗД също не показва статистически значима разлика в честота на тези хронични усложнения (Таблица 19). Статистическият анализ се проведе след групиране на случаите с и без ДПНП, както и с и без ДРП.

Таблица 19. Честота на ДПНП и ДРП при пациентите със ЗД.

Усложнение	Ab-ЗД2 n(%)	Ab+ЗД2 n(%)	LADA n(%)	P*	P†	P^
ДПНП				0.267	0.385	0.133
Не	17(16.2%)	7(25.9%)	5(20.8%)			
неболезнена	79(75.2%)	17(63%)	9(64.3%)			
болезнена	9(8.6%)	3(11.1%)	0			
ДРП				0.520	1.00	0.459
Не	71(81.6%)	20(90.9%)	12(92.3%)			
непролиферативна	13(14.9%)	2(9.1%)	1(7.7%)			
пролиферативна	3(3.4%)	0	0			
Ab-ЗД – случаи на ЗД с отрицателни антитела; Ab+ЗД – случаи на ЗД с положителни антитела						
*между Ab-ЗД2 и Ab+ЗД2; †между LADA и Ab+ЗД2; ^между Ab-ЗД2 и LADA						

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 цитираните 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

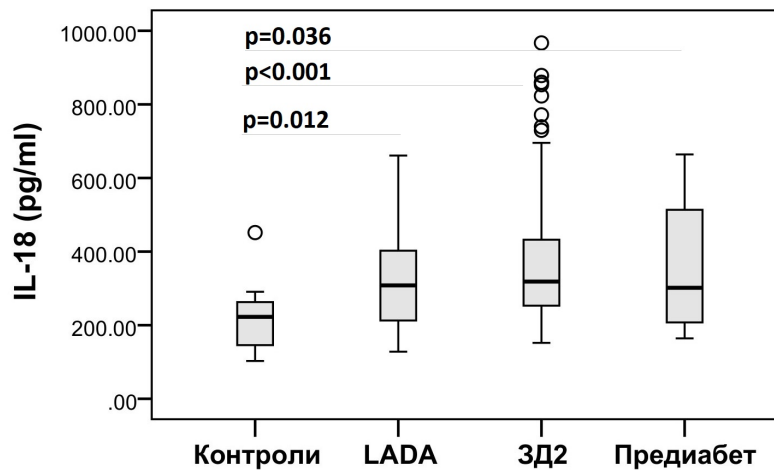
В изследването бяха включени 76 души със ЗД2 и 24 пациента с LADA, 26 участника с предиабет, както и 14 контроли. Характеристиките на изследваните лица са обобщени в таблица 20.

Таблица 20. 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±3.3	3.4±2.3	-	-
Акт. пушачи (%)	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±0.6
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‡	2.2±1.0‡	1.6±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<0.01 спрямо контроли; †p<0.05 спрямо ЗД2; ‡p<0.01 спрямо ЗД2; ^p<0.05 спрямо LADA, ^^p<0.01 спрямо LADA

Установихме, че нивото на IL-18 е значително по-високо сред пациенти със ЗД2, LADA и предиабет спрямо контролите (Фигура 10).



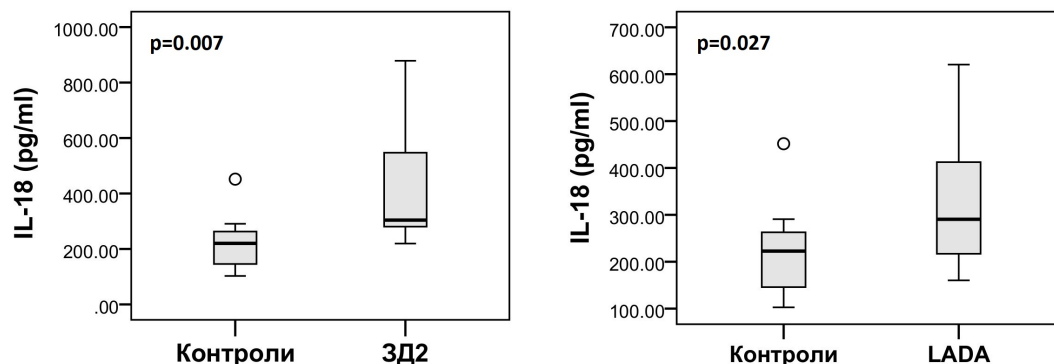
Фигура 10. Ниво на IL-18 при анализирани групи.

Това наблюдение за разлики 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 (IL-18 = 430.9 ± 224.9 срещу 218.7 ± 94.6 pg/ml) (Фигура 11).

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 11).

Такова сравнение между контроли и предиабет не се осъществи поради високия ИТМ при последните. Между двете диабетни групи не констатирахме значителна разлика (Фигура 10).

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 21).



Фигура 11. IL-18 при сравними по ИТМ пациенти и контроли.

Таблица 21. 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 10). Не се различаваше и спрямо лицата с LADA (фигура 10), но на фона на по-неблагоприятни антропометрични показатели (Таблица 20).

Корелационният анализ, касаещ IL-18 и антропометрични, метаболитни и инфламаторни показатели, е отразен в таблица 22. 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 корелационни зависимости между IL-18 и IL-6 и hs-CRP се потвърдиха и при ЗД2, но не и в останалите групи участници (Таблица 22).

Таблица 22. 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/m ²)	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#	-
НbA1c (%)	-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
СУЕ (mm/h)	0.357**	0.592**	-0.179	0.142	-0.276

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

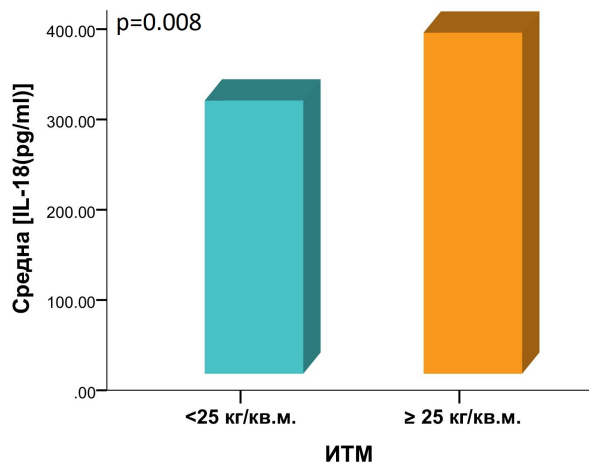
Описаните корелации с IL-6 и hs-CRP при ЗД2 персистират и при пациентите, селектирани за анализ между участници със сравним ИТМ (Таблица 23). Описаните зависимости не се потвърждават при контролната група и групата с LADA (Таблицы 22 и 23), където и честотата на метаболитния синдром е сигнификантно по-ниска (Таблицы 20 и 21).

Таблица 23. Корелационен анализ между IL-18 и клинични, метаболитни и инфламаторни показатели при сравними по ИТМ лица.

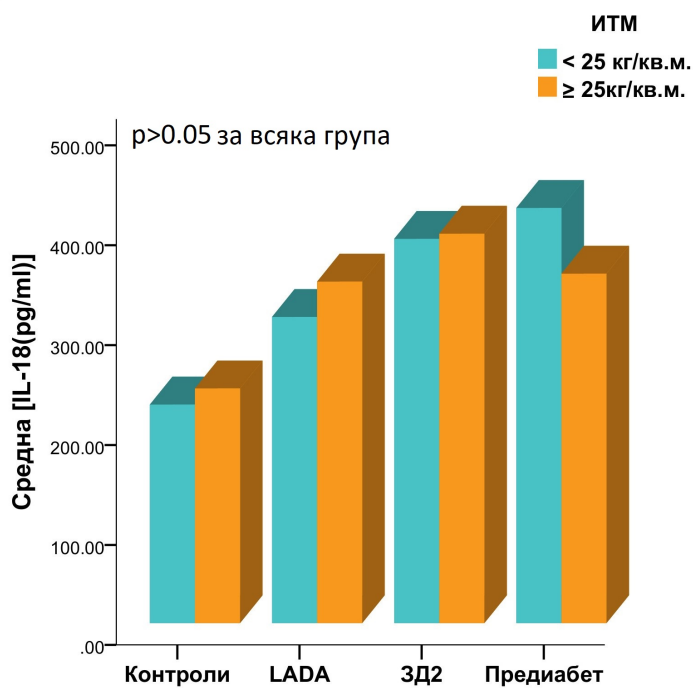
	ЗД2 (n=28)		LADA (n=20)	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
ИТМ (kg/m ²)	0.240	0.219	0.328	0.158
ОТ (cm)	0.219	0.262	0.379	0.110
САН (mmHg)	0.172	0.382	0.228	0.333
ДАН (mmHg)	0.080	0.687	0.067	0.780
ПГГ (mmol/l)	0.152	0.449	-0.261	0.280
ППГ (mmol/l)	0.290	0.151	-0.001	0.997
HbA1c (%)	0.059	0.771	0.157	0.508
LDL (mmol/l)	-0.099	0.645	0.059	0.823
HDL (mmol/l)	-0.464	0.019	-0.412	0.101
ТГ (mmol/l)	0.044	0.829	0.281	0.231
hs-CRP (mg/l)	0.493	0.017	0.128	0.591
IL-6 (pg/ml)	0.408	0.035	0.020	0.934
СУЕ (mm/h)	0.655	0.001	-0.322	0.193

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/м² и тези чийто ИТМ беше над тази стойност (Фигура 12), макар в отделните групи разликата да не беше статистически значима (Фигура 13). Нивото на IL-18 показва тенденция към нарастване в зависимост от тежестта на отклоненията в контрола на телото, което въпреки, че не се различаваше статистически значимо в отделните

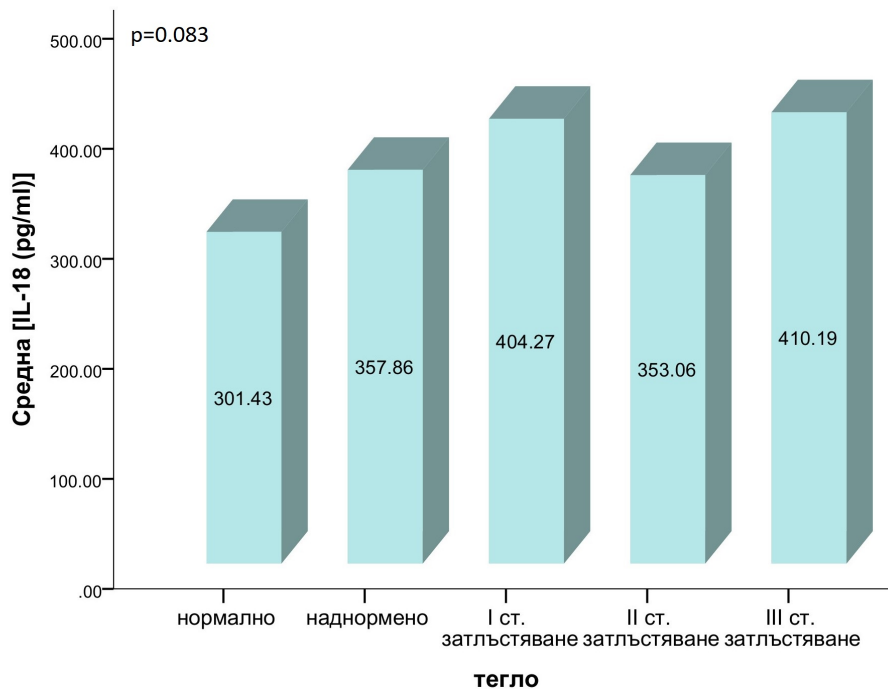
категории на отклонения в ИТМ, корелираше положително с нарастването на степента на затлъстяване (фигура 14 и 15).



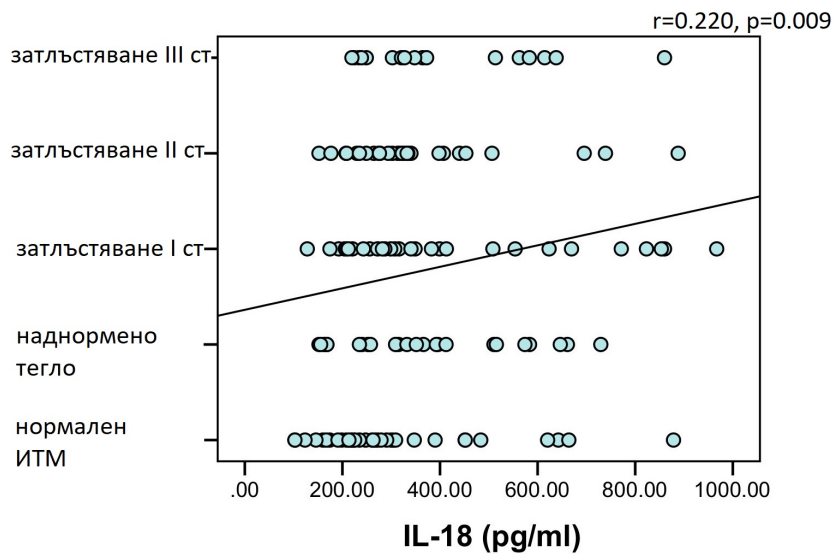
Фигура 12. IL-18 при нормален и повишен ИТМ при всички участници.



Фигура 13. IL-18 при нормален или повишен ИТМ при отделните групи.

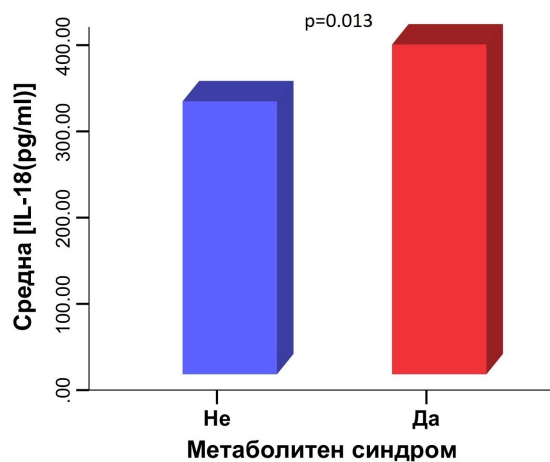


Фигура 14. Ниво на IL-18 в зависимост от категорията отклонения в ИТМ.



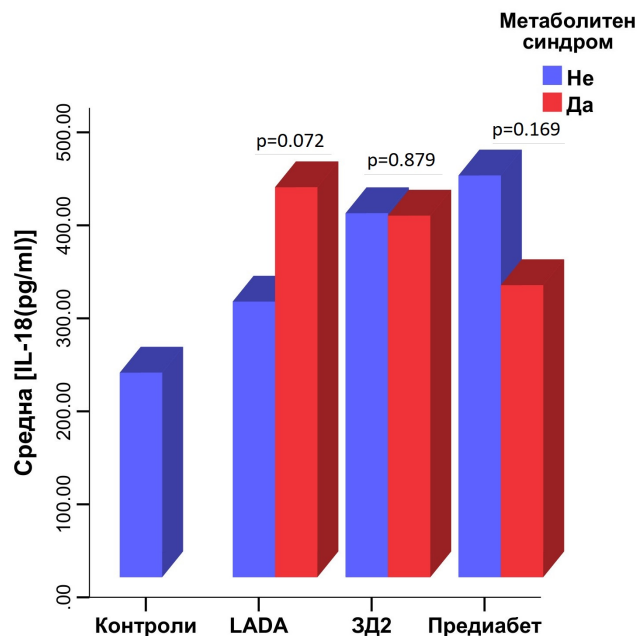
Фигура 15. Нивото на IL-18 корелира положително с нарастване степента на отклонения в ИТМ.

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 16).

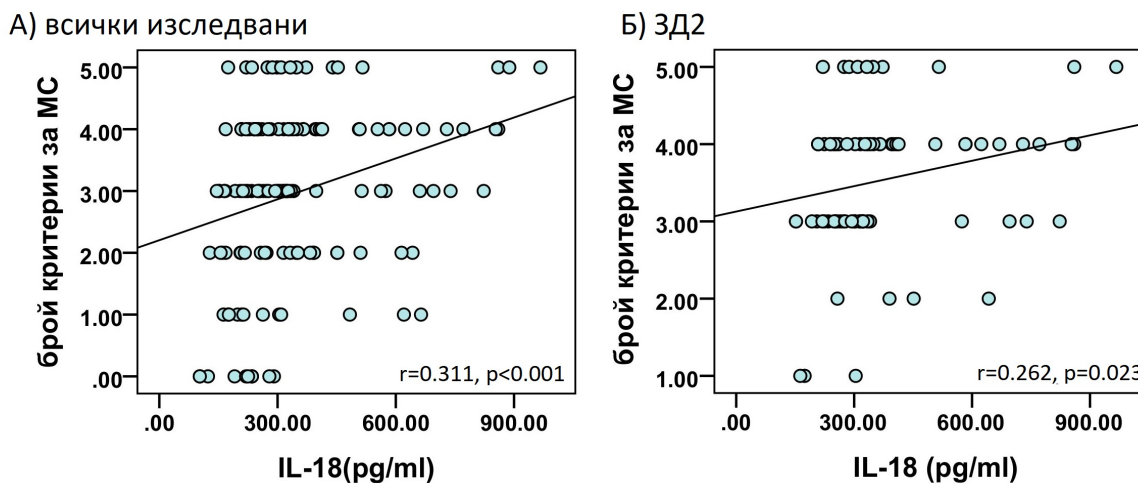


Фигура 16. Ниво на IL-18 в зависимост от наличието на метаболитен синдром.

Въпреки, че при отделните групи пациентите не се констатира сигнификантна разлика в нивото на IL-18 в зависимост от наличието на метаболитен синдром (фигура 17) концентрацията на интерлевкина в серума корелира положително с броя на критериите за диагностицирането на синдрома – както в общата популация, така и в рамките на ЗД2 (Фигура 18).

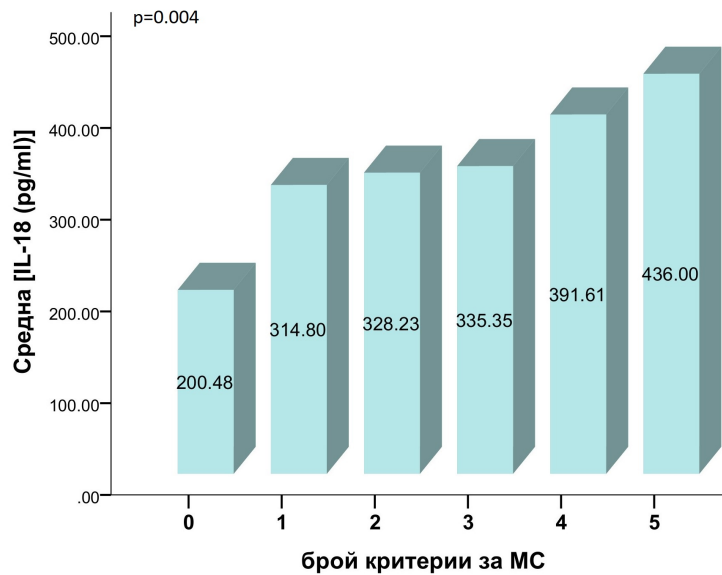


Фигура 17. Ниво на IL-18 при отделните групи в зависимост от наличието на метаболитен синдром.



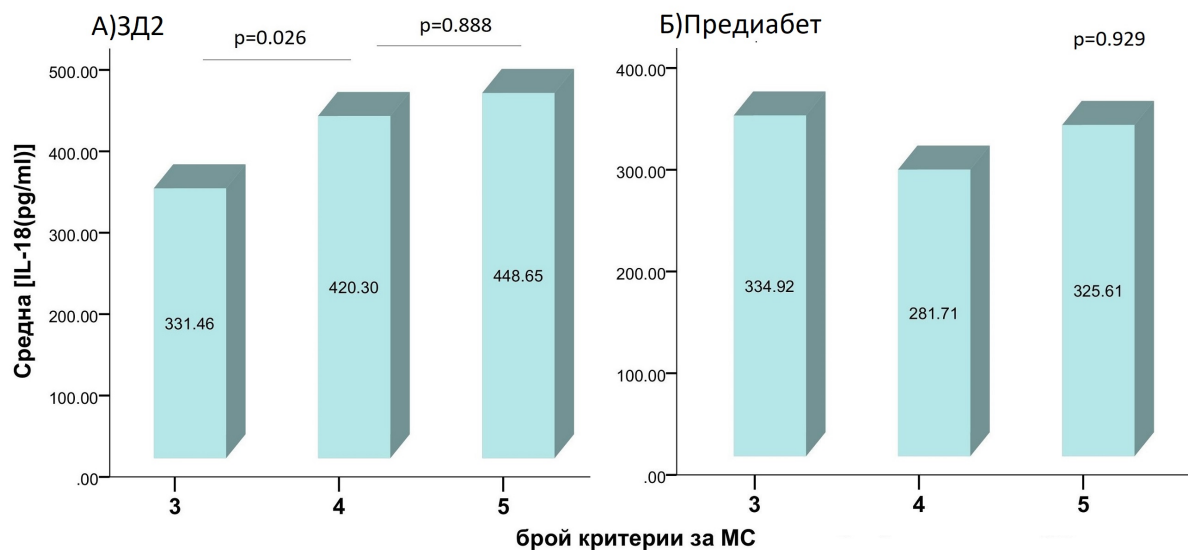
Фигура 18. Зависимост между броя на критерии за МС и нивото на IL-18.

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 19).

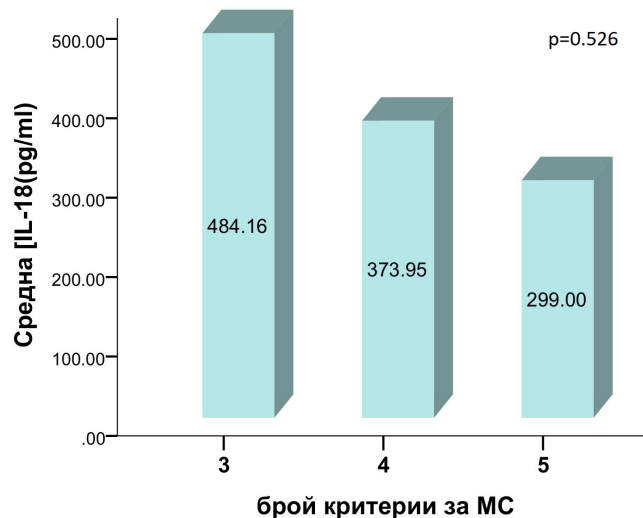


Фигура 19. Ниво на IL-18 в зависимост от броя критерии за метаболитен синдром.

Тенденцията беше ясно наблюдавана при участниците със ЗД2 (фигура 20А), докато при предиабет не констатирахме сигнификантна разлика (фигура 20Б). При участниците с LADA се проследи обратното явление, макар и без статистическа значимост (фигура 21), което потвърждава липсата на асоциация на IL-18 с метаболитните промени при тези лица.



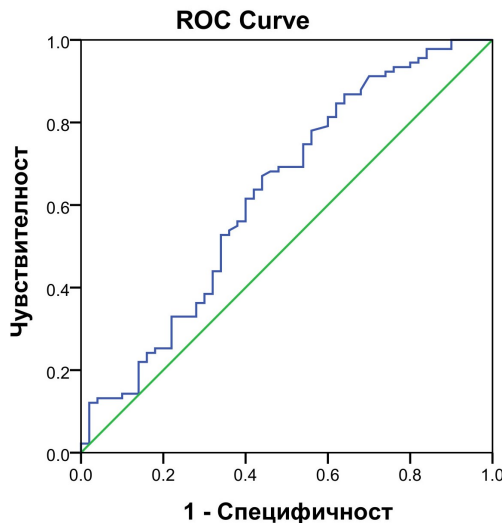
Фигура 20. Ниво на IL-18 според брой критерии за МС при пациентите със ЗД2 и предиабет.



Фигура 21. 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 22). От площта под кривата се установи слаба, но сигнификантна предиктивна

стойност на нивото на интерлевкина (Таблица 24). Най-добра прагова стойност беше IL-18 = 296.5 pg/ml с 60% специфичност и 60% чувствителност.



Фигура 22. ROC крива за нивото на IL-18 като предиктор за метаболитния синдром.

Таблица 24. ROC анализ за предиктивната способност на IL-18 в разграничаването на метаболитен синдром.

AUC	Ст. грешка	<i>p</i>	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 диабетите с ДПНП (Таблица 25). 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 ($r = -0.082$, $p = 0.342$).

Таблица 25. Сравнителен анализ за концентрацията на IL-18 при пациентите със ЗД в зависимост от наличието на ДРП и ДПП.

	Всички диабетици		ЗД2	
	Без ДРП (n=67)	С ДРП (n=10)	Без ДРП (n=49)	С ДРП (n=10)
IL-18 (pg/ml)	355.6±180.9	402.6±218.9	373.9±191.6	380.8±217.8
Възраст (г)	52.7±7.1	52.7±2.8	53.2±7.0	55.1±4.2
Давност на ЗД (г)	3.8±2.8	5.0±3.0	4.1±2.9	5.0±3.0
HbA1c (%)	8.2±2.0	8.6±1.8	7.4±2.1	8.4±1.7
ПГГ (mmol/l)	8.2±3.1	8.6±1.8	8.2±3.0	9.7±2.9
ППГ (mmol/l)	9.0±3.6	10.4±3.1	8.4±3.3	10.2±3.3
	Без ДПП (n=17)	С ДПП (n=75)	Без ДПП (n=10)	С ДПП (n=58)
IL-18 (pg/ml)	388.3±237.9	367.5±181.1	485.5±263.4	370.0±190.0
Възраст (г)	52.9±6.4	53.8±7.0	54.8±5.3	53.8±6.8
Давност на ЗД (г)	2.8±2.4	4.5±3.0*	2.9±2.2	4.8±3.2
HbA1c (%)	7.7±1.9	8.5±1.9	6.6±0.9	8.3±2.1
ПГГ (mmol/l)	7.3±1.6	8.6±3.2	7.0±1.3	8.7±3.0
ППГ (mmol/l)	8.3±3.7	9.3±3.5	8.0±3.7	8.8±3.2

*p<0.05

В обобщение, концентрацията на IL-18 в серума беше значително по-висока при всички групи с отклонение от гликимичния 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.

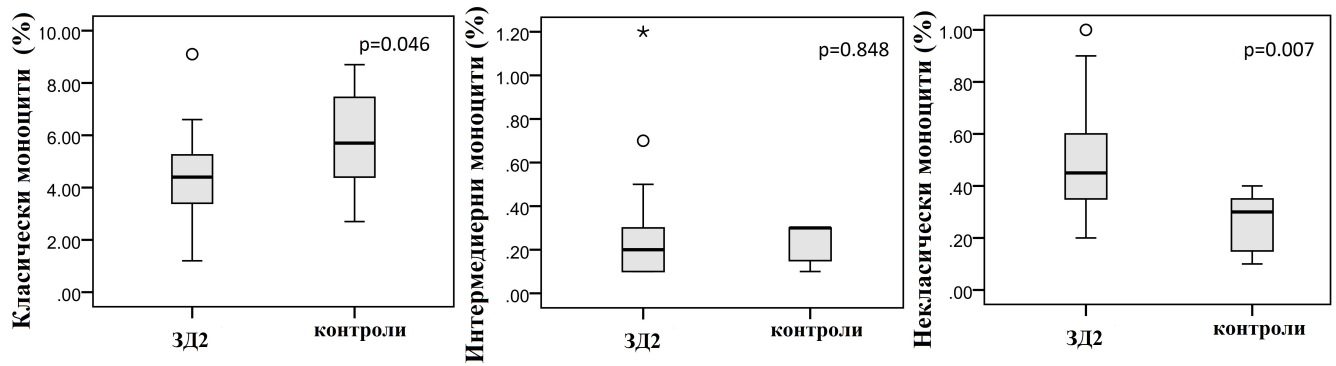
4.4 Повърхностна експресия на периферни моноцити

Клиничните характеристики на участниците, при които се проведе флоуцитометрия, са отразени в таблица 26. 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.

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 23. Наблюдавахме значително по-ниско ниво на класическите моноцити в периферната циркулация при ЗД2 спрямо контролите (4.36 ± 1.54 срещу $5.83 \pm 2.21\%$) докато при некласическите констелацията беше противоположна (0.47 ± 0.20 срещу $0.26 \pm 0.13\%$). При междинния подтип не констатирахме значима разлика (0.29 ± 0.23 срещу $0.23 \pm 0.10\%$) (Фигура 22).

Таблица 26. Клинични, метаболитни и инфламаторни характеристики при участниците.

	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 диабета (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	72.4±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



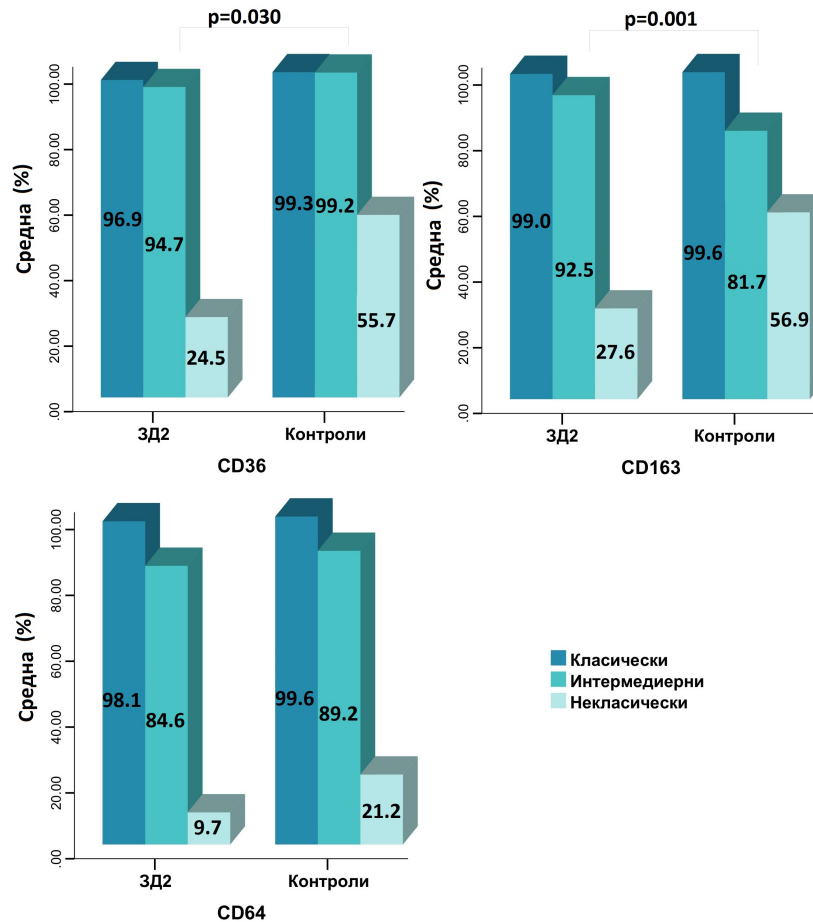
Фигура 23. Сравнителен анализ между моноцитните подтипове при участниците.

Корелационният анализ между процента моноцитите от всеки подтип и WBC и общия моноцитен брой не показва наличието на корелация сред диабетците. Такава не беше установена и при анализирането на моноцитите и изследваните антропометрични и метаболитни показатели (Таблица 27).

Таблица 27. Корелационен анализ с процент моноцити от всеки подтип при ЗД2.

	Моноцитни подтипове					
	Класически (%)		Интермедиерни (%)		Некласически (%)	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
WBC(10⁹/l)	0.081	0.690	0.317	0.107	-0.291	0.141
Моноцити (10⁹/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/m²)	-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	0.889
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 24. Въпреки, че интермедиерният подтип моноцити не се различават 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 24).



Фигура 24. Сравнителен анализ между повърхностната експресия на анализираниите моноцитни маркери в отделните подтипове моноцити.

Проведеният корелационен анализ между повърхностната експресия на изследваните моноцитни маркери и количествените показатели на белите кръвни клетки и моноцитите – общо и според подтипа, неколккратно показва положителна корелация между експресията на CD36 и процента на класическите и некласически моноцити, докато за другите два маркера такива зависимости се констатират еднократно (Таблица 28). Тези находки частично се потвърждават и при контролната група (Таблица 29).

Таблица 28. Корелационен анализ между количествени показатели на моноцитите и експресията на CD36, CD163, CD64 при ЗД2.

	Класически (%)			Интермедиерни (%)			Некласически (%)		
	CD36	CD163	CD64	CD36	CD163	CD64	CD36	CD163	CD64
WBC (10 ⁹ /l)	-0.118	-0.115	0.319	0.566	-0.187	0.304	-0.218	-0.135	0.220
Мо (10 ⁹ /l)	0.014	-0.170	0.143	0.947	-0.248	0.055	0.013	-0.100	0.203
Тотални Мо (%)	0.027	-0.189	0.126	0.899	-0.231	-0.035	0.068	-0.260	0.146
Класически Мо (%)	0.199	0.122	0.120	0.313	0.123	0.097	0.426*	0.471*	0.348
Интермедиерни Мо (%)	0.260	-0.019	0.201	0.299	-0.183	0.198	0.328	0.274	0.442*
Некласически Мо (%)	0.517**	0.087	-0.011	0.634**	0.264	-0.028	0.363	0.300	0.126

Мо – моноцити, *p<0.05; **p<0.01

Таблица 29. Корелационен анализ между количествени показатели на моноцитите и експресията на CD36, CD163, CD64 при контроли.

	Класически (%)			Интермедиерни (%)			Некласически (%)		
	CD36	CD163	CD64	CD36	CD163	CD64	CD36	CD163	CD64
WBC (10 ⁹ /l)	0.185	0.321	0.408	-0.401	0.607	0.179	0.406	-0.800	0.321
Тотални Мо (10 ⁹ /l)	0.224	0.700	0.112	0.894*	0.100	0.200	0.281	0.400	0.700
Тотални Мо (%)	0.783	0.100	-0.447	0.335	0.300	0.100	0.718	0.200	0.900*
Класически Мо (%)	-0.519	0.036	-0.593	0.134	-0.036	-0.571	0.145	1.0**	-0.71
Интермедиерни Мо (%)	-0.289	0.120	0.496	-0.522	-0.120	0.498	0.429	0.258	0.598
Некласически Мо (%)	0.876**	-0.128	0.724	0.252	-0.037	0.716	0.493	-0.316	0.642

Мо – моноцити, *p<0.05; **p<0.01

Проведе се и корелационен анализ между самите повърхностно експресирани моноцитни маркери при пациентите със ЗД2 и контролите. Наблюдавахме силни корелации в експресията между отделните подтипове за всеки от маркерите CD36, CD163 и CD64, което не се потвърди при контролите. Освен това, експресията на CD163 корелира положително с тази на CD36 при неklasическите и отрицателно с CD64 при класическите и неklasическите моноцити – наблюдения, които също не потвърдихме при контролите. Обратно – при участниците без ЗД се констатира силна положителна корелация между експресията на CD36 и CD64, засягаща всички подтипове, която се губи сред диабетиците – при тях не наблюдаваме зависимост между тези два показателя (Таблицы 30 и 31).

Корелационният анализ не установи зависимост на експесираните маркери и метаболитни и инфламаторни показатели с изключение на негативна корелация между HbA1c и повърхностната експресия на CD64 от неklasически моноцити (Таблица 32).

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

Таблица 30. Корелационен анализ между повърхността 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 31. Корелационен анализ между повърхността 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 32. Корелационен анализ с повърхностно експресирани моноцитни маркери при пациенти със ЗД2.

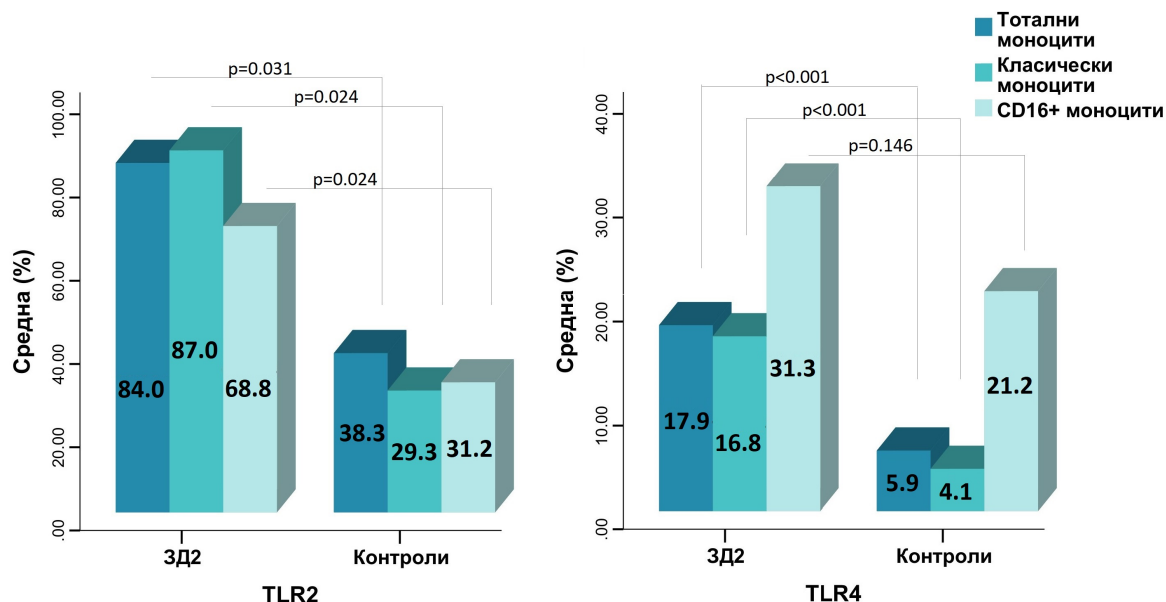
	Класически (%)			Интермедиерни (%)			Некласически (%)		
	CD36	CD163	CD64	CD36	CD163	CD64	CD36	CD163	CD64
ИТМ (kg/m ²)	0.237	-0.338	-0.012	0.234	-0.147	0.041	-0.234	-0.326	0.095
ОТ (cm)	0.255	-0.367	0.008	0.199	-0.047	0.181	-0.111	-0.304	0.162
ОХ (mmol/l)	-0.106	0.100	0.001	0.600	-0.120	0.143	-0.274	-0.263	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
CYE (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
TNF α (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 26). Резултатите, представени в процент от съответната популация моноцити, са обобщени на Фигура 25.



Фигура 25. Повърхностна експресия на TLR2 и TLR4.

Проведе се корелационен анализ между количествени показатели на белите кръвни клетки и моноцити, както и между самите повърхностно експресирани маркери. Констатира се положителна корелация между експресията на маркерите при CD16+ моноцити и WBC при ЗД2, които не се потвърждават сред контролната група. Силните корелации между тоталния моноцитен брой и експресираните TLR2 и TLR4 се губят при ЗД2 (Таблица 33).

Таблица 33. Корелационен анализ между количествени показатели на WBC и TLR2/TLR4 фенотип на моноцити в двете групи.

	Тотални моноцити (%)		Класически моноцити (%)		CD16+ моноцити (%)	
	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4
ЗД2						
WBC (G/l)	-0.041	0.277	-0.142	0.139	0.379*	0.434*
Моноцити (G/l)	0.038	-0.141	0.127	-0.110	-0.118	-0.205
Моноцити (%)	-0.045	0.105	0.027	0.074	0.124	0.191
Контроли						
WBC (G/l)	0.300	0.200	0.200	0.000	0.200	0.500
Моноцити (G/l)	0.100	0.900*	0.500	0.100	0.900*	-0.400
Моноцити (%)	0.000	0.500	-0.200	0.100	0.500	-0.400
*p< 0.05						

Корелационният анализ между самите TLR при ЗД2 показва ясна корелация между експресията на всеки от тях в различните моноцитни популации, което се наблюдава 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 (Таблицы 34 и 35).

Таблица 34. 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 35. 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.						

Корелационният анализ между експресията на TLR2 и TLR4 с останалите изследвани моноцитни маркери (CD36, CD163, CD64) при ЗД2 показва тенденция към отрицателна корелация между експресията на CD163 и тази на TLR2 и положителна такава между експресията на CD64 и TLR2 (Таблица 36). Не наблюдавахме тенденция за зависимост между анализирания маркери при контролната група (Таблица 37).

Таблица 36. 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.

Таблица 37. Корелационен анализ между повърхностно експресирани маркери при контроли.

	Тотални моноцити (%)		Класически моноцити (%)		CD16+ моноцити (%)	
	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4	TLR2	TLR4
Класически (%)						
CD36	-0.335	0.894*	0.671	0.894*	0.894*	-0.783
CD163	0.200	-0.200	-0.700	-0.500	-0.200	0.000
CD64	0.112	0.447	0.894*	0.671	0.447	0.112
Интермедиерни (%)						
CD36	-0.224	0.783	0.447	0.783	0.783	-0.894*
CD163	0.800	0.200	0.300	0.100	0.200	0.600
CD64	-0.900*	0.400	0.100	0.300	0.400	-0.700
Некласически (%)						
CD36	0.462	0.564	0.154	0.410	0.564	-0.359
CD163	0.600	-0.200	-0.400	-0.200	-0.200	-0.200
CD64	0.400	0.600	0.100	0.300	0.600	-0.200

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

Корелационен анализ между повърхностната експресия на TLR2 и TLR4 и метаболитните и инфламаторни показатели показва положителна корелация на TLR4 с антропометричните показатели (ИТМ и обиколка на талията) и гликемичния контрол (HbA1c, ППГ, ПППГ). За TLR2 такива се констатираха за липидните показатели – общ холестерол и LDL холестерол. Само TLR2 обаче корелира положително с hs-CRP (Таблица 38).

Таблица 38. 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/m²)	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

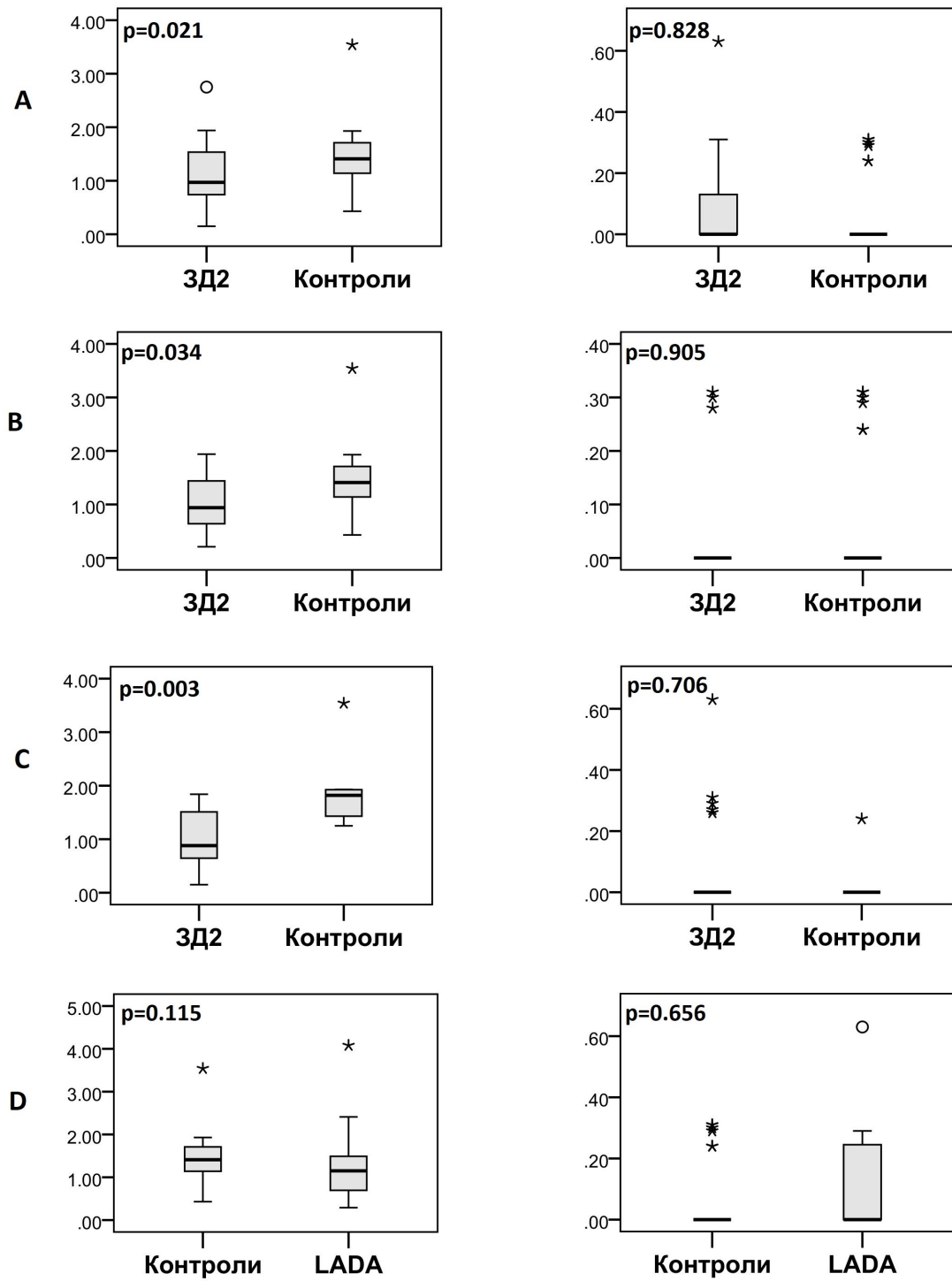
Разтворимите фракции на TLR бяха анализирани при 47 души със ЗД2, 16 души с LADA и 25 контроли. Констатирахме значително по-ниско ниво на sTLR2 сред лицата със ЗД2 спрямо контролите, докато нивото на sTLR4 беше без сигнификантна разлика (Фигура 26А). Тази разлика е констатирана на фона на по-лош метаболитен профил при диабетиците спрямо контролните участници и анализът беше повторен и при сравними по ИТМ участници от двете групи (Таблица 39). При сравним ИТМ, но все още по-висока честота на метаболитния синдром, резултатите, касаещи sTLR2 и sTLR4, бяха потвърдени (Фигура 26В).

Сравняването им сред лицата, при които беше изследвана и повърхностната експресия на рецепторите, отново показва по-ниско серумно ниво на разтворимата фракция на първия, въпреки по-високия процент TLR2+ моноцити при диабетици (Фигура 26С).

При лицата с положителни GAD65A нивото на рецепторите остана без значителна разлика спрямо контролите (Фигура 26D). 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, $p=0.856$.

sTLR2 (ng/ml)

sTLR4 (ng/ml)



Фигура 26. Сравнителен анализ на нивото на sTLR2 и sTLR4.

Таблица 39. 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/m²)	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*	115.6±14.5	115.6±13.9
ДАН (mmHg)	83.9±9.6**	79.3±9.2*	75.9±10.2	73.2±8.0
НbA1c (%)	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±1.2	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)	2.9±1.0	2.9±1.3	2.6±1.7	3.1±0.8
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
Нs-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±15.3	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; **p<0.01 спрямо контролите

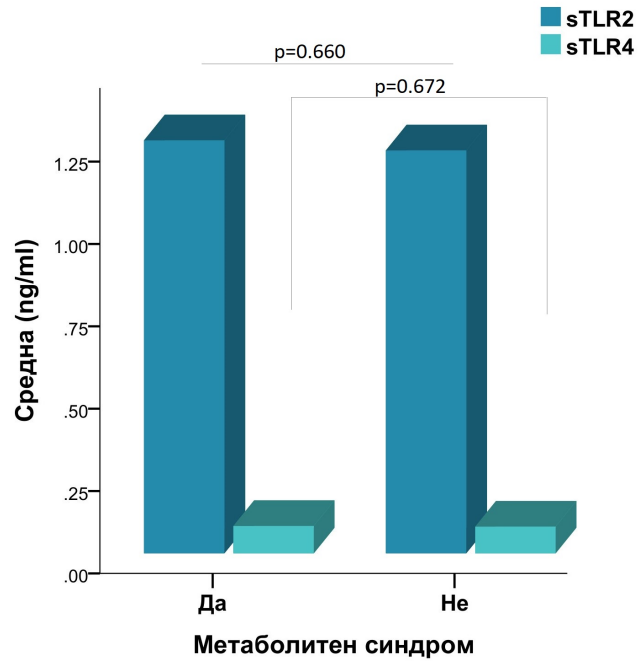
Проведеният корелационен анализ между нивото на sTLR2 и sTLR4 и описаните метаболитни и инфламаторни параметри при пациентите със ЗД2 показва положителна корелация за VLDL-холестерола и триглицеридите с нивото на sTLR2(Таблица 40).

Таблица 40. Корелационни коефициенти за анализа между sTLR и метаболитни параметри.

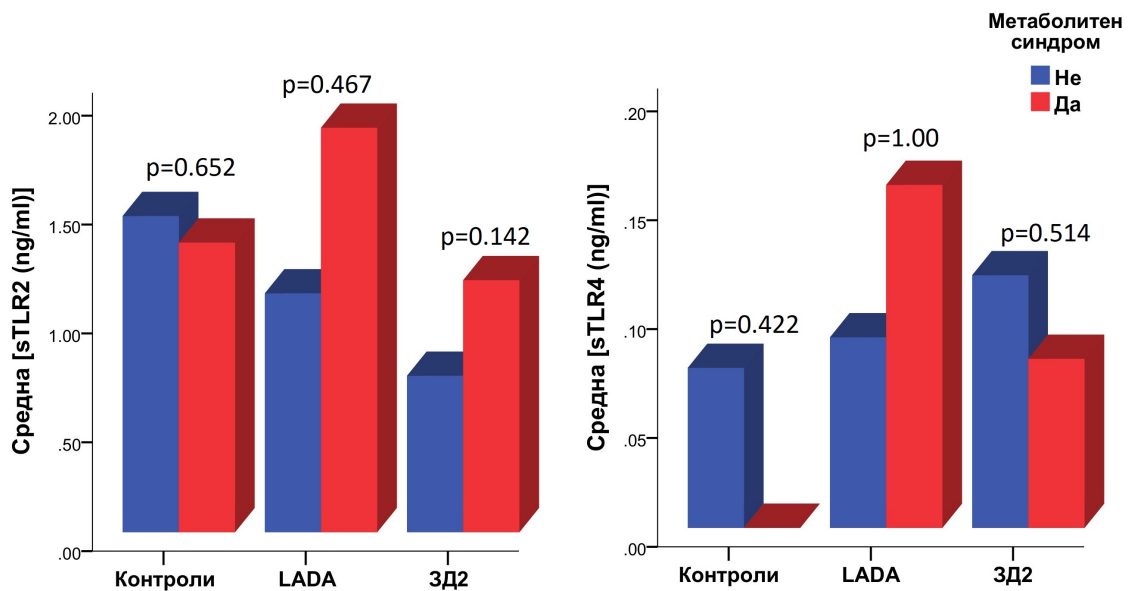
	sTLR2 (ng/ml)		sTLR4 (ng/ml)	
	ЗД2	LADA	ЗД2	LADA
ИТМ (kg/m²)	-0.062	0.390	0.073	0.061
ОТ (cm)	-0.011	0.292	0.185	-0.292
ОХ (mmol/l)	0.233	-0.212	-0.176	0.111
HDL(mmol/l)	-0.173	-0.137	0.022	0.011
LDL (mmol/l)	0.089	0.214	-0.159	-0.045
VLDL (mmol/l)	0.367*	-0.053	-0.068	0.052
ТГ (mmol/l)	0.349*	-0.171	-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 показва сигнификантна разлика, както в общата популация, така и в групата със ЗД2, където честотата му е най-висока (Фигури 27 и 28).



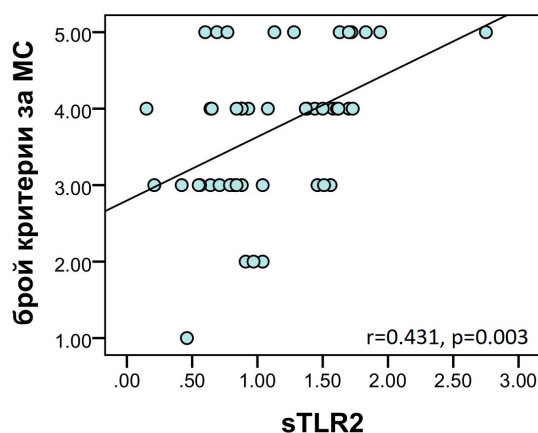
Фигура 27. Сравнителен анализ на нивото на sTLR2 и sTLR4 в зависимост от наличието на метаболитен синдром.



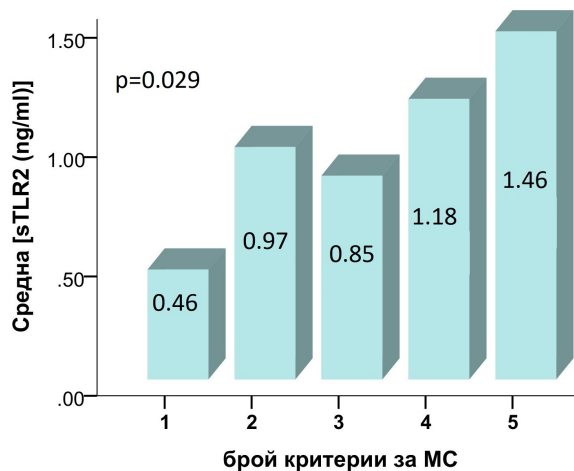
Фигура 28. Сравнителен анализ на нивото на sTLR2 и sTLR4 в зависимост от наличието на метаболитен синдром в отделните групи.

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 29 и 30). 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 29. Корелационна зависимост между броя критерии за метаболитен синдром и нивото на sTLR2 при ЗД2.



Фигура 30. Сравнителен анализ на нивото на sTLR2 при пациенти със ЗД2 в зависимост от броя критерии за метаболитен синдром.

Не установихме корелация и между серумното ниво на sTLR2 и sTLR4 и нивото на анализиранияте инфламаторни параметри, освен отрицателна корелация между sTLR4 и СУЕ при ЗД2 (Таблица 41).

Таблица 41. 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
TNF α (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 42).

Таблица 42. Корелационни коефициенти за анализа между sTLR и повърхностната експресия на рецепторите при пациенти със ЗД2.

Моноцити		sTLR2 (ng/ml)		sTLR4 (ng/ml)	
		<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
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 диабетичите в случаите, в които се установяваше ДПНП спрямо тези без това усложнение.

При ДРП обаче се наблюдаваше значително по-ниско ниво на sTLR4 сред лицата със ЗД2, които нямат това усложнение спрямо тези с ретинопатия ($p = 0.021$). 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 43).

Серумното ниво на двата рецептора не корелираше с eGFR при диабетите 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 43. Сравнителен анализ на концентрацията на sTLR2 и sTLR4 между пациентите със ЗД в зависимост от наличието на ДРП и ДПП.

	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	6.7±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 ДПП (n=12)	С ДПП (n=49)	Без ДПП (n=7)	С ДПП (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

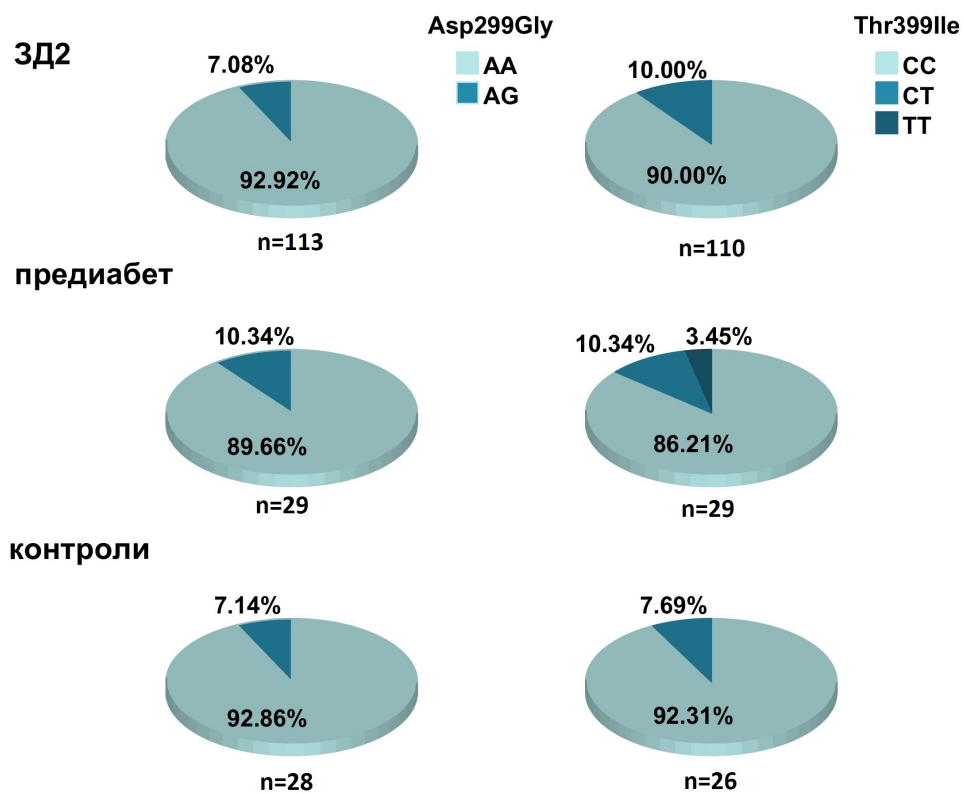
показатели от метаболитния контрол. Само експресията на TLR2 корелира положително с hs-CRP. Установихме положителна корелационна зависимост между TLR2 и CD64, а отрицателна с CD163.

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. sTLR4 беше сигнификантно повишен при лицата с ДРП спрямо диабетиците без това усложнение.

4.6 Генотипиране

4.6.1 Генотипиране на Asp299Gly и Thr399Ile

Генотипирането по отношение на полиморфизмите на *TLR4* беше проведено при 114 души със ЗД, 29 участника с предиабет и 28 контроли. 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%. Генотипното честотно разпределение между групите е показано на фигура 31.



Фигура 31. Генотипно честотно разпределение на полиморфизмите на *TLR4*

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 Thr399Ile; предиабет: $p = 0.768$ и $p = 0.064$; контроли: $p = 0.845$ и $p = 0.838$, съответно за всеки полиморфизъм).

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 32). Сравнимо беше и алелното честотно разпределение на двата полиморфизма (Таблица 44).

Таблица 44. Алелно честотно разпределение на полиморфизмите на *TLR4*.

Полиморфизъм	Алел	ЗД2 n(%)	Предиабет n(%)	Контроли n(%)	P^*	P^\dagger	P^\ddagger
Asp299Gly	A	218 (96.5)	55(94.8)	54 (96.4)	1.0	1.0	0.701
	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	0.443	0.339
	T	11 (5.0)	5 (8.6)	2 (3.8)			
	Общо	220 (100)	58 (100)	52 (100)			

p^* -ЗД2 спрямо контроли, p^\dagger -предиабет спрямо контроли, p^\ddagger -ЗД2 спрямо предиабет.

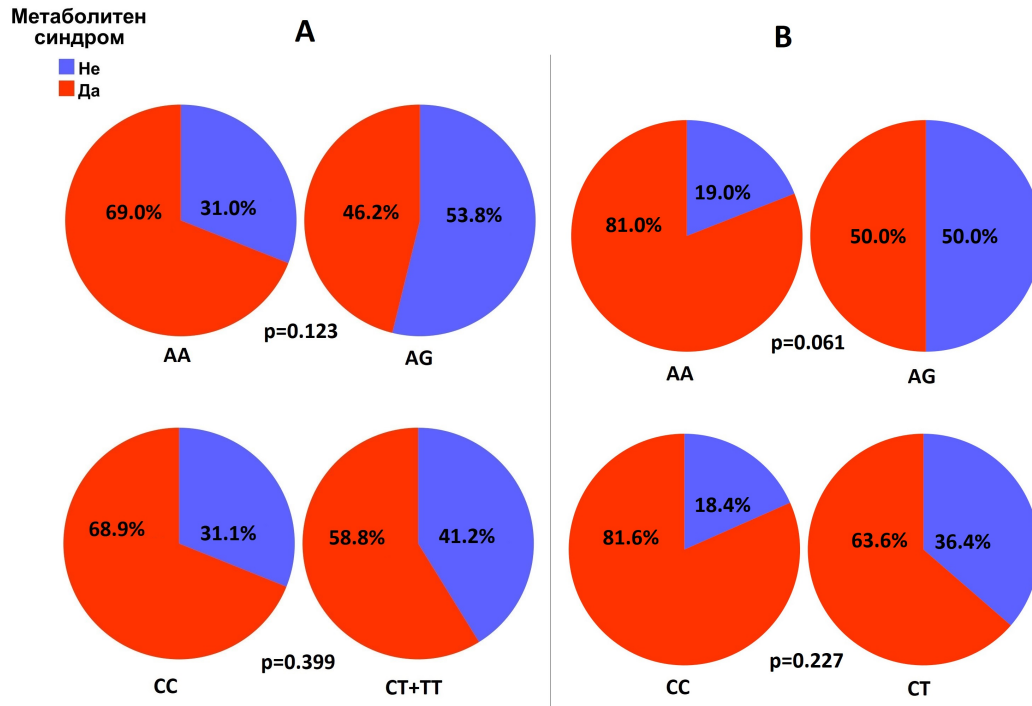
Носителството на рецесивните алели на двата полиморфизма се наблюдаваше косегрегирано, както в останалите изследвани популации в Европа. Изолирано носителство на рецесивния алел на Thr399Ile беше констатирано при трима (2.7%) участници със ЗД2. За Asp299Ile не установихме такъв случай. Хомозиготно носителство беше установено за Thr399Ile, само при един случай на предиабет (Фигура 32).

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 45). При групите с предиабет и контролни участници такова сравнение не беше възможно поради малкия брой лица с рецесивен алел.

Таблица 45. Сравнителен анализ на клинични и метаболитни показатели при пациентите със ЗД2 в зависимост от присъствието 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/m²)	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				

Присъствието на рецесивен алел се свързваше с по-ниска честота на метаболитния синдром в общата изследвана популация, въпреки че разликата в генотипното честотно разпределение за полиморфизмите Asp299Gly и Thr399Ile не беше сигнификантна (Фигура 32). Такава не се установи и изолирано при пациентите със ЗД2. Броят пациенти с хетерозиготен генотип с предиабетно състояние беше много нисък за достоверност на статистически анализ.



Фигура 32. Генотипно честотно разпределение в зависимост от наличието на метаболитен синдром в А) общата изследвана популация, В) пациентите със ЗД2.

Двата полиморфизма не се свързват с разлика в анализираниите цитокини, СУЕ и hs-CRP, както и нивото на разтворимата фракция на sTLR2 и sTLR4 (Таблица 46). Сред лицата, при които е проведена флоуцитометрия, само при двама души се установи хетерозиготен генотип за анализираниите полиморфизми на *TLR4*, което беше недостатъчно за провеждане на статистически анализ.

Таблица 46. Сравнителен анализ на инфламаторни показатели при пациенти със ЗД2 в зависимост от присъствието на полиморфизми в *TLR4*.

	Asp299Gly		Thr399Ple	
	AA(n=105)	AG(n=8)	CC(n=99)	CT(n=11)
СУЕ (mm/h)	9.9±6.4	9.1±5.0	9.8±6.2	9.4±5.2
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

При сравнима възраст, давност на диабета, сходен метаболитен контрол и контрол над артериалното налягане оценихме честотното разпределение на генотиповете по отношение наличието на ДПНП и ДРП (Таблица 47).

Сравнителният анализ показва значително по-висока честота на ДРП при носителството на рецесивния алел на Asp299Gly при диабетици. 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 47).

Таблица 47. Полиморфизми на *TLR4* и хронични усложнения на ЗД2.

Усложнения от ЗД2	Генотип, n (%)			
	Asp299Gly		Thr399Ple	
	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/1.73m²)	96.5±26.3, n=105	106.1±21.6, n=8	100.0±25.8, n=99	99.8±22.3 n=11
	P 0.172		0.498	

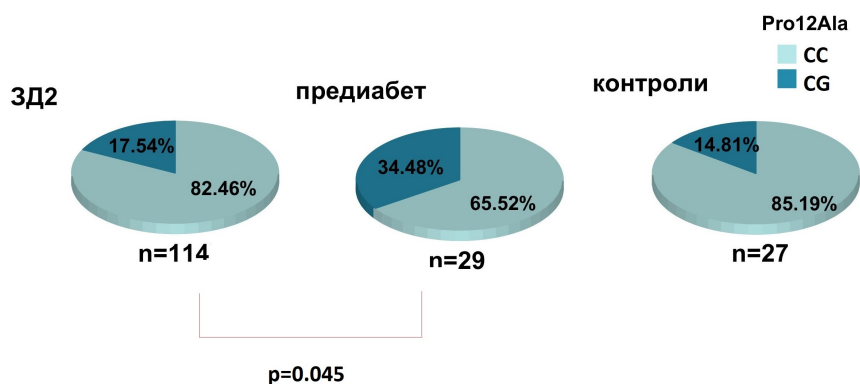
В заключение, не се установи асоциация между полиморфизмите Asp299Gly и Thr399Ile и ЗД2 или предиабет, но хетерозиготният генотип при първия е с по-висока честота при ДРП. Двата полиморфизма не са свързани с разлика в метаболитния контрол и нивото на изследваните цитокини, hs-CRP и sTLR2 и sTLR4.

4.6.2 Генотипиране на Pro12Ala

Генотипното разпределение за Pro12Ala полиморфизъм на *PPARG* е показано на фигура 34. 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 показва 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 33).



Фигура 32. Генотипно честотно разпределение на полиморфизма Pro12Ala.

По отношение на алелното честотно разпределение нямаше статистически значима разлика (Таблица 48).

Таблица 48. 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	0.116	0.060
	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

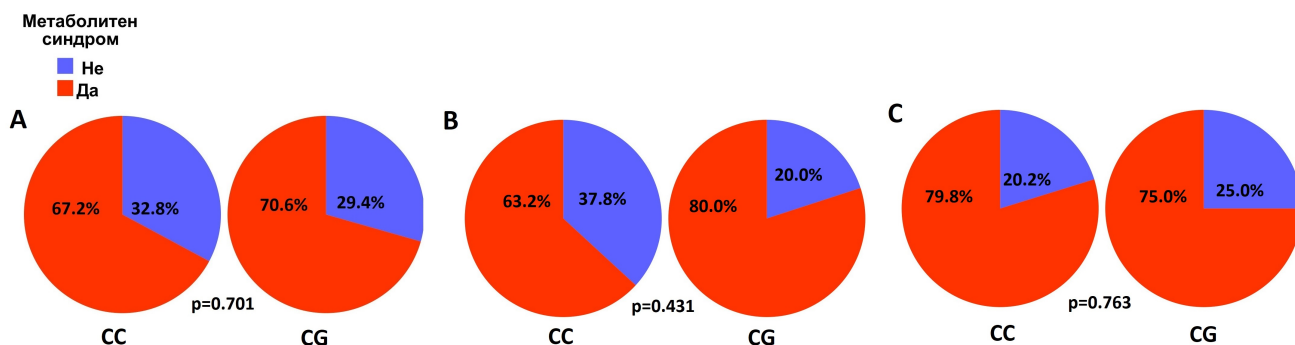
Сравнителният анализ при лицата със ЗД2 и предиабет не показва разлика в контрола на артериалното налягане, ИТМ и обиколката на талията, гликемичния контрол и липидния профил, с изключение на общия холестерол, който е по-висок при хомозиготен генотип (Таблица 49).

Таблица 49. 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
НbA1c (%)	8.2±1.9	7.9±1.8	-	-
ПГГ (mmol/l)	8.33±3.0	6.9±2.5	5.4±0.7	5.6±0.9
ППГ (mmol/l)	8.2±3.4	7.8±3.4	7.6±1.7	7.7±1.8
ОХ (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

Полиморфизмът не се асоциира и с честотата на метаболитния синдром в общата изследвана популация и отделно групите с предиабет и ЗД2 (Фигура 34).



Фигура 33. Честота на метаболитния синдром в зависимост от генотипа за Pro12Ala полиморфизъм в А) общата изследвана популация; В) предиабет; С)ЗД2.

Инфламаторните показатели също не се различаваха статистически в зависимост от генотипа (Таблица 50).

Таблица 50. 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)
CYE (mm/h)	9.5±6.1	11.4±6.7	9.9±6.2	9.5±7.9
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±0.0
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	-	-

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 51).

Таблица 51. Полиморфизмът Pro12Ala и хронични усложнения на ЗД2.

Усложнения от ЗД2	Pro12Ala генотип		p
	CC	CG	
ДРП, n(%)			0.172
ДА	7 (9.6)	3 (23.1)	
НЕ	66 (90.4)	10 (76.9)	
ДПП, 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 метаболитния синдром и 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

Пандемичните размери на заболяемостта от ЗД2, неговата социална значимост и невъзможността за пълна профилактика на хроничните му усложнения задълбочават интереса към патогенезата на заболяването в търсене на нови подходи в прогностичен и терапевтичен план. Интересът към имунната система в диабетологията нараства едва през последните две десетилетия, но се натрупаха много доказателства, че хроничното ниско-степенно възпаление участва в инсулиновата резистентност и бета-клетъчна дисфункция. С настоящата работа си поставихме за цел да оценим мястото на това възпаление от няколко аспекта – чрез повърхностна моноцитна експресия, чрез серумни нива на разтворими рецептори, CRP и цитокини и чрез влиянието на полиморфизми в гени, кодиращи белтъци с ключово участие в контрола над имунния отговор.

Сравнителният анализ на показателите сред включените участници в първоначалното разпределение в групите ЗД2, предиабет, LADA и контроли, подкрепя наличието на ниско-степенно, субклинично хронично възпаление при първите две от тях. По-високите стойности на IL-6 и hs-CRP при участниците със ЗД2 и предиабет съответстват на по-висока честота на затлъстяване и метаболитен синдром спрямо тези при лицата, включени като LADA и контроли.

Тази разлика потвърдихме и в рамките на групата със ЗД2, която се оказва, че е нехомогенна по отношение на анализираният диабет-асоцииран антигенов комплекс. Отново пациентите с класически ЗД2 имаха по-високи стойности на IL-6 и hs-CRP спрямо лицата, при които за първи път установихме положителни антигенов комплекс, макар и разликата между двата показателя да не беше статистически значима, както наблюдавахме при сравнението им между ЗД2 и LADA.

5.1 Диабет-асоциирани антигенов комплекс и латентен автоимунен диабет при възрастни

Съобщенията за честота на LADA между 4 и 14% сред диагностицираните със ЗД2 [340] и значителните разлики в метаболитно и имунологично естество между тях [233, 467] наложиха изследването на диабет-асоциираните антигенов комплекс сред анализираният пациенти с оглед характеризирането на показатели за оценка на хроничното възпаление.

При прегледа на литературата не намерихме данни за този проблем за българската популация.

Настоящото проучване показва честота на положителни диабет-асоциирани антитела при ЗД2 от 10.16%, което е в рамките на резултатите от други проучвания в Европа [340] и 3.8% при предиабет, което е по-малко от публикуваните при други анализи в българската популация (18-22%), но и на фона на по-млада средна възраст и по-ниски стойности на средния ИТМ [592]. Резултатът при предиабет обаче беше по-близо до тези от други европейски проучвания при възраст на пациентите между 50 и 70 г (0.9-5.3%) [517]. GAD65A беше водещо по честота позитивно антитяло, следвано от IA-2A. Изследването на двете, но не и на ZnT8A допринесе за установяването на нови случаи на ЗД с позитивни диабет-асоциирани антитела.

Над 40% от участниците, които бяха включени в групата с LADA бяха позитивни за поне две антитела, докато сред лицата със ЗД2 нямаше такива случаи. Също така, нивото на GAD65A беше значително по-високо при LADA отколкото при изследваните, диагностицирани като ЗД2. Въпреки тези сигнификантни разлики участниците 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 [372]. 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 диабетичите 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.** Фактът, че все още сред пациенти със ЗД2 се откриват случаи на LADA, говори, че макар и последният да е обект на множество епидемиологични, имунологични и клинични проучвания, заболяването все още остава недиагностицирано.

Разсъждавайки върху въпроса за хетерогенността на LADA, не можем да кажем, че и броят и титърът на антителата могат да разграничат два погледа от заболяването [372].

Въпреки, че метаболитният профил на участниците с едно антитяло и ниска концентрация беше по-неблагоприятен, сигнификантни разлики спрямо участниците с повече на брой позитивни антитела с висока концентрация бяха констатирани само в отделни показатели. Тези пациенти са по-близки в метаболитно отношение помежду си отколкото пациентите с едно антитяло и ниски GAD65A спрямо лицата с отрицателни антитела.

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 [340]. Настоящото проучване обаче има срез характер и отразява актуалното ниво на антителата, въз основа на което се провежда и сравнителният анализ. Според него пациентите, чийто метаболитен фенотип не е бил достатъчна индикация за изследване на антителата, е по-вероятно да имат едно позитивно антитяло и то в по-нисък титър отколкото при лица с клинична картина, доближаваща се до тази на класическия аутоимунен ЗД. Проследяването на тези пациенти би потвърдило позитивния статус на антителата.

Поддържането на оптимален гликемичен контрол е един от най-важните аспекти в лечението на ЗД [25]. Осъществяването му в присъствието на антитела обикновено изисква по-големи усилия [28, 123, 414] и това се свързва с по-малката бета-клетъчна маса при тези пациенти, отколкото при лица с негативни антитела [94]. 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 [91, 609]. За съжаление понякога дори инсулинолечението не позволява постигането на по-добър гликемичен контрол спрямо диабетици, които са с отрицателни антитела и имат съхранена ендогенна инсулинова секреция. Това беше наблюдавано и в настоящите изследвания, въпреки провежданото инсулинолечение. По-съществен клиничен проблем обаче 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.

През последните десетилетия се обърна изключително внимание на неспецифичния имунен отговор и възпалителните промени, съпътстващи отклоненията в контрола на теглото и плазмената глюкоза [709]. По-високото ниво на hs-CRP и IL-6, което беше описано в рамките на настоящия дисертационен труд при лицата със ЗД2 и предиабет спрямо пациентите 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

Докато мястото на hs-CRP и IL-6 е добре познато в рамките на затлъстяването и свързаните с него метаболитни усложнения [638, 640] и има предиктивна стойност в определянето на риска от ЗД2 [193, 560], то интересът към IL-18 едва сега нараства. **Не установихме 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, което важеше обаче само за отделни метаболитни показатели. 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 [301]. Наблюденията, че групата с предиабет имаше ниво на IL-18, което не се различаваше 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 **влиянieto на теглото и метаболитния синдром има по-съществен принос за повишението на IL-18**. Доказателства в тази насока бихме получили при проспективно проучване с проследяване ефекта на показателите върху нивото на интерлевкина в динамика или при сравнението му сред пациенти със ЗД2 и предиабет с нормален ИТМ, което сред включените тук лица не беше осъществимо.

Причините за повишението на IL-18 при двете диабетни групи явно е различна. IL-18 е цитокин, който участва активно в патогенезата на много автоимунни заболявания – миастения гравис, синдром на Съогрен, ревматоиден артрит, системен лупус еритематодес [6, 67], тиреоидит на Хашимото [3]. Повишение в нивото на цитокина е наблюдавано и в рамките на ЗД1 – както в циркулацията, така и чрез по-силна локална експресия в лангерхансовите острови [227, 301], което демонстрира ролята му в автоимунния отговор към инсулин-продуциращите клетки. **Имайки предвид, че LADA се разглежда като част от клиничния спектър на ЗД1 [495, 510], тогава не е изненадващо, че нивото на IL-18 беше повишено и сред участниците с тази група спрямо контролите.**

Все пак, LADA се отличава от класическия ЗД1 [232], макар и да са много сходни в метаболитен аспект [233]. Въпреки, че при ЗД1 са описвани корелации между серумната концентрация на IL-18 и HDL-холестерола, ППГ и HbA1c [23], такива не се потвърдиха при LADA. **Липсата на корелации с 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 не е свързано с теглото и метаболитния риск, а е по-скоро отражение на автоимунен отговор. Имайки предвид хетерогенността на пациентите [232], които могат да отговарят на посочените от Brooks-Worrell и сътр. критерии за LADA [75], сравнението на нивото на цитокина и връзката му с другите анализирани тук параметри сред по-голяма популация би могло да ориентира по-задълбочено дали повишението на IL-18 няма различен произход при лица, които се доближават клинично повече до ЗД1 или до ЗД2. Допълнителна индикация за необходимостта от такова изследване са резултатите за намаляващо ниво на IL-18 с увеличаване броя критерии за метаболитен синдром – явление, което е обратно на наблюденията за ЗД2 и което задълбочава интереса за произхода на повишената интерлевкинова секреция при двете състояния.

5.3 Повърхностна моноцитна експресия при ЗД2

В подкрепа на инфламаторното състояние при ЗД2 е и повишението на процента неklasически моноцити при него, считани за важна част от възпалителния процес [564]. Увеличението им е описано при редица инфламаторни състояния [690], както и при затлъстяване и атеросклероза [507]. Тези резултати се наблюдаваха на фона на по-висок брой левкоцити при ЗД2, но въпреки това сравним абсолютен брой и процент на моноцитите спрямо тези при контролите. Липсата на статистически значима разлика в нивото на анализирани 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 неklasически моноцити [507]. Увеличение на CD16⁺ моноцити е описано и преди при диабетици със затлъстяване [475]. Редуцирането на теглото и физическата работа са свързани с намаляване на неklasическия подтип, повдигайки въпроса за мястото му в инсулиновата резистентност [475, 605].

Смята се, че всеки подтип моноцити представлява етап от матурацията на клетките [34, 674] и експресията на CD16 при класическия може да бъде инициирана в условията на възпаление [564]. **Мястото на класическите моноцити при хроничното възпалително състояние, наблюдавано при ЗД2, не е добре изучено.** Понижението им, което наблюдаваме сред диабетиците, е основание за допълнителен анализ и изясняване дали промяната в повърхностно експресирани молекули на клетките или преразпределение на моноцитите от циркулацията могат да обяснят тези резултати.

Въпреки, че междинният подтип 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 [559], 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** [413], въпреки че не корелираше нито с метаболитните показатели, нито с IL-6 и hs-CRP, които също имат такава стойност [193, 560]. CD163 има комплексно участие в имунния отговор, но има много доказателства за неговите анти-инфламаторни качества – стимулация секретията на анти-инфламаторни цитокини, опосредстване разграждането на хема до анти-инфламаторни метаболити, повишаване на повърхностната експресия на CD163 върху тъканни макрофаги във фаза на резолюция на възпалителен процес и др [325, 411, 687]. Възможно е 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 [407].

Въпреки, че CD36 също е свързан с повишена повърхностна експресия [579] и с увеличена разтворима фракция при ЗД2 [225], настоящият анализ не установи статистическа разлика в процента на CD36+ моноцити нито в класическия (съставляващ на 90% от тоталния брой), нито в некласическия подтип, дори при междинните моноцити тя беше понижена за ЗД2. При прегледа на литературата не се 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 [520, 579, 712], тъй като междинния подтип представлява малък процент от тях [718]. Предвид ролята на CD36 в патогенезата на атеросклерозата като скавенджър рецептор за окислени липиди [455] и натрупването на данни за участието на междинните моноцити във възпалението при съдови инциденти [564], 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 показва, 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 показва 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-CRP и IL-6 в извадката, в която се проведе

флоуцитометрия. 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.

За разлика от експресията на CD36, CD163 и CD64, тази 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 [117] и ги допълват с чрез представените данни, касаещи не само CD14+ моноцити, но и CD16+ популация от тях. Както и при предходните анализирани маркери, и тук експресията на двата рецептора корелира между тоталните, класически и CD16+ моноцити при ЗД2 – явление, което отново е по-слабо представено при контролите. Промяната в експресията на двата рецептора при ЗД2 вероятно се осъществява с различни темпове, тъй като силната корелация между процента TLR2+ и TLR4+ моноцити при контролните участници напълно липсва сред диабетиците.

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. Това противоречи на наблюденията, че активирането на TLR стимулира отцепването на хаптоглобин-хемоглобиновия рецептор от мембранно-свързаната молекула, което от своя страна индуцира по-висока повърхностна експресия върху моноцитите [651]. Последното обаче не се потвърждава при инфилтриращи мастната тъкан макрофаги [187]. Това ясно демонстрира, че наблюдаваната от нас отрицателна корелационна зависимост не противоречи на описаната роля на sCD163 като маркер за хроничното възпалително състояние при ЗД2 [413]. Тя е в синхрон със съобщения за липса на повишена експресия на CD163 в тоталния моноцитен брой, но повишено отцепване на мембранно-свързания рецептор при това заболяване [354].

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 [360, 22], но досега не е свързана 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. Става ясно, че промените в експресията на изследваните молекули не трябва да се разглеждат изолирано, така както е и комплексно участието на различни рецептори, цитокини и други, ангажирани в осъществяването на възпалителния процес протеини. Не можем напълно да изключим динамика в експресията на Fcγ рецептора при ЗД2, особено след като и концентрацията на интерлевкините и hs-CRP при извадката, при която се проведе флоуцитометрия, също не беше по-висока от тази при контролите.

Повърхностната експресия на двата TLR върху периферни моноцити не беше в корелационна зависимост с тази на CD36, въпреки съобщенията за взаимодействия между двата вида рецептори при индуцирането на възпаление в стерилна среда [571]. Най-вероятно динамиката в експресията на двата вида рецептори настъпва с различни темпове при ЗД2. А такава със сигурност има предвид корелационните зависимости за всеки рецептор при отделните подтипове моноцити сред диабетиците.

Процентът на експресиращи TLR2 и/или TLR4 моноцити корелираше положително с hs-CRP сред CD16+ клетки, но не и с нивото на анализирани цитокини. Въпреки това, описаните промени в повърхностната експресия на TLR2 и TLR4 са в синхрон с наблюдаваните по-високи стойности на IL-6, IL-18 и hs-CRP сред диабетиците спрямо контролните участници при разглеждането им в по-големи извадки и потвърждава за пореден път наличието на субклинична имунологична активност при ЗД2.

5.4 Разтворими фракции на TLR2 и TLR4 при ЗД2

Интерес представляват резултатите за sTLR2. Въпреки, че е описвано повишение на нивото на разтворимата фракция на рецептора при инфламаторни състояния от различен характер [602], при свързаното със ЗД2 хронично възпаление беше установено понижение на sTLR2. За sTLR4 също не се установи повишение при диабетиците.

Литературният преглед показва данни за негативния контрол, който разтворимата фракция оказва върху активирането на повърхностно експресирания рецептор [343]. Би могло да се спекулира, че тези резултати онагледяват нарушение в обратния контрол върху сигнализацията чрез TLR2, както е наблюдавано за други разтворими рецептори [482]. Намаление на sTLR2 е констатирано и при други заболявания, освен ЗД2 – при

бронхиална астма [600], системен лупус еритематодес [258], сърдечна недостатъчност след остър инфаркт на миокарда [623]. Понижение на sTLR2 въпреки повишена TLR2 експресия от моноцити описват и при псориазис [321]. Въпреки това са необходими още проучвания за изясняване мястото на sTLR2 при ЗД2 и дали понижението му участва в нарушената регулация на възпалителния отговор при това и други заболявания.

Несъответствията между моноцитната експресия и концентрацията на разтворимата фракция могат да бъдат обяснени и с нивото на отцепване на мембранно-свързаните рецептори от металлопротеинази, 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 (за TLR4), експресия от различни от моноцитите клетки и не на последно място клирънс на разтворимите рецептори от циркулацията [343, 602].

Описаните промени за ЗД2 не се наблюдаваха при LADA, където метаболитният профил е по-благоприятен с изключение на гликемичния контрол. Въпреки, че ЗД2 се отличаваше със сигнификантно по-ниско ниво на sTLR2 спрямо контролите, учудващо нивото му нарастваше с броя на критериите за метаболитен синдром именно при тези пациенти. Макар и да не се намери зависимост между концентрацията на sTLR2 и тази на анализираниите инфламаторни параметри, не можем да изключим място на разтворимите рецептори в субклиничното възпаление при ЗД2. 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. Анализиранието им при динамиката на гликемичните и антропометрични параметри би обогатило познанията за функцията на TLR към този момент.

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, който беше разгледан, е честотата на полиморфизмите Asp299Gly и Thr399Ile в гена *TLR4* и тяхното отношение към анализираниите протеини. В литературния обзор бяха представени противоречивите заключения от различни студии относно протективаната му стойност в развитието на ЗД2

и метаболитен синдром. Честотата на хетерозиготния генотип и хомозиготния за рецесивните алели на двата полиморфизма в общата изследвана извадка беше в рамките на докладваната от други европейски проучвания (0-10%) [429, 430]. Настоящите резултати изключиха асоциация между двата полиморфизма и ЗД2 или предиабетно състояние. Генотипното и алелно честотно разпределение не показва и промяна на риска за прогресия от предиабет към ЗД2 сред обхванатите лица. Не се констатира и асоциация с присъствието на метаболитен синдром или който и да било от критериите за диагностицирането му.

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 анализирани цитокини. Макар основно Asp299Gly да е свързан с изменения във функцията на TLR4 [35, 373, 444], не можем да свържем този полиморфизъм с хроничното ниско-степенно възпаление при ЗД2.

Не беше наблюдавана и зависимост между генотипа и нивото на sTLR4. Дори и липсата на повишение при последния да е част от дефектна имунорегулация в активирането на TLR4, както можем да спекулираме, съдейки по наблюденията за други рецептори [482], то не бихме могли да посочим ролята на нито един от двата полиморфизма в гена *TLR4* като причина за нарушението в обратната негативна връзка между повърхностно експресирания и разтворимия рецептор.

По отношение на хроничните диабетни усложнения се констатира по-високата честота на рецесивния алел на полиморфизма Asp299Gly сред лица с ДПП, което подкрепя литературните данни за предразполагаща му роля към това усложнение [78]. Още по-комплексна става ролята на рецепторите в патогенезата на хроничните диабетни усложнения, предвид наблюдаваното по-високо ниво на sTLR4 при пациентите с ДПП. Въпреки, че не установихме пряка зависимост между Asp299Gly и разтворимата фракция на рецептора, очевидно той има отношение към риска от това усложнение и заслужава

внимание не само относно повърхностната му експресия [644]. 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.

Не се установи асоциация с ДПНП или нивото на изчислената гломерулна филтрация. Резултатите, касаещи микросъдови усложнения от ЗД2, са анализирани на фона на сравнима възраст, давност на заболяването, сходни гликемични и липидни показатели и контрол на артериалното налягане, който биха повлияли на развитието на късния дегенеративен синдром.

Предвид съобщенията за протективна роля на Pro12Ala в развитието на ЗД2 [210] и мястото на PPAR γ и тиазолидиндионите в хроничното възпалително състояние при заболяването [5], полиморфизмът беше изследван в анализирането на имунологичните промени при континуума от предиабет, ЗД2 и хроничните му усложнения.

Честотата на хетерозиготния генотип на полиморфизма Pro12Ala отново беше в рамките на цитираната за Европа (12-25%) [431]. Настоящото проучване не установи асоциация между полиморфизма Pro12Ala и развитието на ЗД2 в изследваната извадка от българската популация. Честотата на хетерозиготния генотип не се различава и при лицата с предиабет спрямо контролната група. Установената му по-висока честота сред лица с предиабет спрямо ЗД2 поставя въпроса за генетичното влияние върху риска от прогресия на предиабетното състояние в диабет.

Генетичният фактор в развитието на НГГ и НВТ е търсен в множество полиморфизми, за които е описан модифициращ предразположеността към ЗД2 ефект, включително и в Pro12Ala в *PPARG* [724]. Както показаха и нашите резултати, той няма такава роля и в това отношение отстъпва място на други полиморфизми като rs972283 в *KLF14* (Kruppel-like factor 14), rs5945326 в *DUSP9* (dual specificity phosphatase 9), rs13266634 в *SLC30A8* (solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8) [724]. Въпреки това се търси протективна стойност на алел G при Pro12Ala в еволюцията на предиабета към ЗД2 [31, 32, 188], което се констатира и в настоящето проучване.

Носителството на рецесивния алел на Pro12Ala не е свързано с контрола над теглото и гликемията, честотата на метаболитния синдром или показателите, по които оценихме свързаното с тях хронично субклинично възпаление при ЗД2 и лица с предиабет. Такива

бяха потърсени поради литературни данни за наличие на асоциация между полиморфизма и ИТМ, когато стойностите на последния показват затлъстяване [395].

Влиянието на полиморфизма Pro12Ala върху риска от ЗД2, оценено като Odd Ratio, варира в литературата между едва 0.79 и 0.86 [210]. Размерът на настоящата извадка може да бъде причина за липсата на потвърждение на протективната роля. Изследвания по проблема в по-голям мащаб биха допринесли за изясняването на модифициращата роля на полиморфизма Pro12Ala в прогресията на предиабет в ЗД2, но и в развитието на всяко едно от тях по отделно.

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 от настоящите резултати, 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.

6. 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.

В тази работа сме търсели изясняване на елементи от патогенезата на ЗД. В някои случаи ни се е отдало да добавим нова информация за някои патогенетични сегменти, а в други – резултатите са били неочаквани.

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. В изследваната извадка от българската популация честотата му беше в рамките на наблюдаваната в други европейски проучвания.

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 анализирани антропометрични, липидни, гликемични параметри. Това потвърждава различния им метаболитен профил и посочва необходимостта от по-мощни изследвания за разграничаване мястото на асоциираното 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 анализирани 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.

7. 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 показатели 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-CRP.
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 полиморфизма 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.

8. Справка за приносите

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.

С национална значимост:

6. Определи се честотата на диабет-асоциираните антитела GAD65A и IA-2A сред пациенти със ЗД2, предиабет и здрави контроли в извадка от българската популация.
7. Проведе се генотипиране за полиморфизмите Asp299Gly, Thr399Ile и Pro12Ala в българската популация.

С потвърдителен характер:

8. 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.
9. 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.
10. Подкрепени бяха данни за предразполагащата роля на Asp299Gly в развитието на диабетна ретинопатия и протективния характер на Pro12Ala в еволюцията на предиабет към ЗД2.

9. 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.

Участия в научни форуми - 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.

Участия в научни проекти:

1. ГРАНТ договор № 54/2013 г., проект №83/2013г, МУ-София. Тема на научния проект: “Асоциация между маркери на възпаление и експресия на TLR рецептори върху моноцити с давността, степента на гликемични нарушения и придружаващи хронични усложнения при пациенти с предиабет, захарен диабет тип 2 и захарен диабет тип LADA сред българската популация”. *Водещ изследовател:* Проф. Здравко Каменов. *Базова организация за изпълнение на проекта:* Медицински факултет, Катедра по Вътрешни Болести, УМБАЛ „Александровска” ЕАД, Клиника по ендокринология.

2. Млад Изследовател договор № 22-Д/2013г, проект №32-Д/2013г, МУ-София. Тема на научния проект: „Асоциация между полиморфизми в TLR4 и PPARG кандидат-гени и етиологията на захарен диабет тип 2 и захарен диабет тип LADA и хроничните им усложнения при българските пациенти“. *Изпълнител:* д-р Емануела Захариева. *Базова организация за изпълнение на проекта:* Медицински факултет, Катедра по Вътрешни Болести, УМБАЛ „Александровска” ЕАД, Клиника по ендокринология.

3. Млад Изследовател договор №6-Д/2014г, проект № 27-Д/2014г, МУ-София. Тема на научния проект: “Серумни нива на маркери на възпаление при пациенти със захарен диабет тип 2 и латентен автоимунен захарен диабет и връзката им със степента на гликемични нарушения и придружаващи хронични усложнения сред българската популация”. *Изпълнител:* д-р Емануела Захариева. *Базова организация за изпълнение на проекта:* Медицински факултет, Катедра по Вътрешни Болести, УМБАЛ „Александровска” ЕАД, Клиника по ендокринология.

4. ГРАНТ №1/2014, Sanofi. Тема на научния проект: “Innate Immunity and Autoimmunity in Prediabetes, Diabetes type 2 and Latent Autoimmune Diabetes of the Adults (IAPD2LADA). *Водещ изследовател:* Проф. Здравко Каменов. *Базова организация за изпълнение на проекта:* Медицински факултет, Катедра по Вътрешни Болести, УМБАЛ „Александровска” ЕАД, Клиника по ендокринология.

10. Книгопис

1. Българско Дружество по Ендокринология. Препоръки за добра клинична практика при захарен диабет, 2016
2. Ганева С, Тодорова К, Луканов Ц. Имунна дисфункция и захарен диабет тип 2. Ендокринология. 2015; 1; 15-20.
3. Геренова Ж, Манолова И. Серумни нива на интерлевкин – 18 и интерлевкин – 10 при пациенти с тиреоидит на Hashimoto. Ендокринология. 2009; 2; 98-102.
4. Грозева Г, Чакърова Н, Димова Р, Танкова Ц, Атанасова И. Честота и диагностична стойност на антителата към цинков транспортер 8 (ZnT8) в българска популация пациенти със захарен диабет тип 1. Ендокринология. 2017; 1: 21-26.
5. Каменов З, Гатева А, Христов В. Медикаментозно лечение на захарен диабет тип 2. Глава 2.2 Инсулинови сенсибилизатори с действие предимно в периферните тъкани – Тиазолидиндиони. 2011. 149-178.
6. Манолова И, Иванова М, Бояджиева В, Платиканова М, Станилова С, Стоилов Р. Повишени серумни нива на IL-18 при болни с ревматоиден артрит и анкилозиращ спондилит. Ревматология. 2013; 2.
7. Милчева Б, Орбецова М. Мастната тъкан - ендокринен орган. Ендокринология. 2014; 2; 64-72.
8. Танкова Ц. Захарен диабет. Рискови фактори за захарен диабет тип 2. 2013. 76-80.
9. Танкова Ц. Захарен диабет. Хронични усложнения на захарния диабет. 2013. 289-382.
10. Achenbach P, Warncke K, Reiter J, Naserke HE, Williams AJ, Bingley PJ, Bonifacio E, Ziegler AG. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes*. 2004; 53:384-392.
11. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med*. 2006;355:763–778.
12. Agrawal NK, Kant S. Targeting inflammation in diabetes: Newer therapeutic options. *World Journal of Diabetes*. 2014;5:697-710.
13. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin. *J Biol Chem*. 2000 Mar 24;275:9047-9054.
14. Ahmad R, Al-Mass A, Atizado V, Al-Hubail A, Al-Ghimlas F, Al-Arouj M, Bennakhi A, Dermime S, Behbehani K. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. *Journal of Inflammation (London, England)*. 2012;9:48.
15. Ahmadian M, Duncan RE, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future lipidology*. 2007;2:229-237.
16. Akash MS, Shen Q, Rehman K, Chen S. Interleukin-1 receptor antagonist: a new therapy for type 2 diabetes mellitus. *J Pharm Sci*. 2012;101:1647-1658.
17. Akashi S., Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, Miyake K. Cutting Edge: Cell Surface Expression and Lipopolysaccharide Signaling Via the Toll-Like Receptor 4-MD-2 Complex on Mouse Peritoneal Macrophages. *J. Immunol*. 2000; 164, 3471-3475.
18. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783–801.
19. Alberti KGMM, DeFronzo RA, Zimmet P, editors. International textbook of diabetes mellitus. 2nd ed. Chichester ; New York: J. Wiley; 1997.
20. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059-62.
21. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413:732–738.
22. Allen E, Bakke A, Purtzer M, Deodhar A. Neutrophil CD64 expression: distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2002;61:522-525
23. Altinova AE, Yetkin I, Akbay E, Bukan N, Arslan M. Serum IL-18 levels in patients with type 1 diabetes: relations to metabolic control and microvascular complications. *Cytokine*. 2008; 42;217-221.

24. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 2010; 33(Suppl 1), S62–S69.
25. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. 6. Glycemic Targets. *Diabetes Care* 2017; 40(Suppl. 1):S48 – S56.
26. Amyot J, Semache M, Ferdaoussi M, Fontes G, Poitout V. Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via Toll-like receptor-4 and NF- κ B signalling. *PloS One* 2012;7, e36200.
27. Ancuta P, Liu KY, Misra V, Wacleche VS, Gosselin A, Zhou X, Gabuzda D. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocytes. *BMC Genomics* 2009;10:403.
28. Andersen CD, Bennet L, Nyström L, Lindblad U, Lindholm E, Groop L, Rolandsson O. Worse glycaemic control in LADA patients than in those with type 2 diabetes, despite a longer time on insulin therapy. *Diabetologia*. 2013;56:252-258.
29. Andersen MK, Lundgren V, Turunen JA, Forsblom C, Isomaa B, Groop PH, Groop L, Tuomi T. Latent autoimmune diabetes in adults differs genetically from classical type 1 diabetes diagnosed after the age of 35 years. *Diabetes Care*. 2010;33:2062-2064.
30. Andersson C, Kolmodin M, Ivarsson SA, Carlsson A, Forsander G, Lindblad B, Ludvigsson J, Kockum I, Marcus C, Samuelsson U, Orqvist E, Lernmark A, Elding Larsson H, Törn C; Better Diabetes Diagnosis Study Group. Islet cell antibodies (ICA) identify autoimmunity in children with new onset diabetes mellitus negative for other islet cell antibodies. *Pediatr Diabetes*. 2014;15:336-344.
31. Andrulionyte L, Peltola P, Chiasson JL, Laakso M; STOP-NIDDM Study Group. Single nucleotide polymorphisms of PPARG in combination with the Gly482Ser substitution of PGC-1 α and the Pro12Ala substitution of PPARG2 predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. *Diabetes*. 2006; 55:2148-2152.
32. Andrulionyte L, Zacharova J, Chiasson J-L, Laakso M. Common polymorphisms of the PPAR- γ 2 (Pro12Ala) and PGC-1 α (Gly482Ser) genes are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes in the STOP-NIDDM trial. *Diabetologia*. 2004;47:2176–2184.
33. Angelova P, Kamenov Z, Tsakova A, El-Darawish Y, Okamura H. Interleukin-18 and testosterone levels in men with metabolic syndrome. *Aging Male*. 2017; 23:1-8.
34. Appleby LJ, Nausch N, Midzi N, Mduluzi T, Allen JE, Mutapi F. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunology Letters*. 2013;152:32-41.
35. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000;25:187-191.
36. Arce-Mendoza A, Rodriguez-de Ita J, Salinas-Carmona MC, Rosas-Taraco AG. Expression of CD64, CD206, and RAGE in adherent cells of diabetic patients infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res*. 2008; 39:306-311.
37. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med*. 2005; 11: 191–198.
38. Arner P, Pollare T, Lithell H. Different aetiologies of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in obese and non-obese subjects. *Diabetologia*. 1991;34:483-487.
39. Aso Y, Okumura K, Takebayashi K, Wakabayashi S, Inukai T. Relationships of plasma IL-18 concentrations to hyperhomocysteinemia and carotid intimal-media wall thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26: 2622–2627.
40. Axelsson J, Møller HJ, Witasp A, Qureshi AR, Carrero JJ, Heimbürger O, Bárány P, Alvestrand A, Lindholm B, Moestrup SK, Stenvinkel P: Changes in fat mass correlate with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *Am J Kidney Dis* 2006; 48:916-925.
41. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*. 1990 Sep 13;347:151-156.
42. Baekkeskov S, Lernmark A. Rodent islet cell antigens recognized by antibodies in sera from diabetic patients. *Acta Biol Med Ger*. 1982;41:1111-1115.
43. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marnier B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*. 1982 Jul 8;298:167-169.

44. Bagarolli RA, Saad MJ, Saad ST. Toll-like receptor 4 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms are associated with Type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2010;24:192-198.
45. Bakhtadze E, Cervin C, Lindholm E, Borg H, Nilsson P, Arnqvist HJ, Bolinder J, Eriksson JW, Gudbjörnsdóttir S, Nyström L, Agardh CD, Landin-Olsson M, Sundkvist G, Groop LC. Common variants in the TCF7L2 gene help to differentiate autoimmune from non-autoimmune diabetes in young (15-34 years) but not in middle-aged (40-59 years) diabetic patients. *Diabetologia*. 2008 Dec;51:2224-2232.
46. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001 Feb 17;357:539-545.
47. Ballak DB, Stienstra R, Tack CJ, Dinarello CA, van Diepen JA. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine*. 2015;75:280-290.
48. Barbieri M, Rizzo MR, Papa M, Acampora R, De Angelis L, Olivieri F, Marchegiani F, Franceschi C, Paolisso G.. Role of interaction between variants in the PPAR γ and interleukin-6 genes on obesity related metabolic risk factors. *Experimental Gerontology*. 2005;40:599-604.
49. Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, Cushman M, Kuller LH, Resnick HE, Tracy RP: The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes*. 2001; 50 :2384 –2389.
50. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(9):3338-3342.
51. Bayram MT, Soyulu A, Ateş H, Kızıldağ S, Kavukçu S. TLR-4 polymorphisms and leukocyte TLR-4 expression in febrile UTI and renal scarring. *Pediatr Nephrol*. 2013;28(9):1827-1835.
52. Behme MT, Dupre J, Harris SB, Hramiak IM, Mahon JL. Insulin resistance in latent autoimmune diabetes of adulthood. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1005:374-377.
53. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168(7):3536-3542.
54. Bell JA, Kivimaki M, Hamer M. Metabolically healthy obesity and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Obesity Reviews*. 2014;15(6):504-515.
55. Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(9):351-6.
56. Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, Moore SC, Tobias GS, Anton-Culver H, Freeman LB, Beeson WL, Clipp SL, English DR, Folsom AR, Freedman DM, Giles G, Hakansson N, Henderson KD, Hoffman-Bolton J, Hoppin JA, Koenig KL, Lee IM, Linet MS, Park Y, Pocobelli G, Schatzkin A, Sesso HD, Weiderpass E, Willcox BJ, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Willett WC, Thun MJ. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med*. 2010;363(23):2211-2219.
57. Bernstein LE, Berry J, Kim S, Canavan B, Grinspoon SK. Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome. *Arch Intern Med*. 2006;166(8):902-908.
58. Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, Bourlier V, Duffaut C, Bonnafous S, Blin-Wakkach C, Anty R, Iannelli A, Gugenheim J, Tran A, Bouloumié A, Gual P, Wakkach A. Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes*. 2012;61(9):2238-2247.
59. Bhatt SP, Misra A, Sharma M, Luthra K, Guleria R, Pandey RM, Vikram NK. Ala/Ala Genotype of Pro12Ala Polymorphism in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 2 Gene Is Associated with Obesity and Insulin Resistance in Asian Indians. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2012;14(9):828-834.
60. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81:1–5.
61. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA: Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 1997; 46:1701–1710.
62. Bonen A, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Heigenhauser GJ. The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:877–883.
63. Böni-Schnetzler M, Boller S, Debray S, Bouzakri K, Meier DT, Prazak R, Kerr-Conte J, Pattou F, Ehses JA, Schuit FC, Donath MY. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology*. 2009;150(12):5218-5229.

64. Böni-Schnetzler M, Ehse JA, Faulenbach M, Donath MY. Insulitis in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2008;10 Suppl 4:201-204.
65. Böni-Schnetzler M, Thorne J, Parnaud G, Marselli L, Ehse JA, Kerr-Conte J, Pattou F, Halban PA, Weir GC, Donath MY. Increased Interleukin (IL)-1 β Messenger Ribonucleic Acid Expression in β -Cells of Individuals with Type 2 Diabetes and Regulation of IL-1 β in Human Islets by Glucose and Autostimulation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2008;93(10):4065-4074.
66. Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, Dean BM, Dunger D, Gale EA, Bottazzo GF: Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1990; 335:147–149.
67. Boraschi D, Dinarello CA. IL-18 in autoimmunity: review. *Eur. Cytokine Netw.* 2006; 17: 224-252.
68. Borg H, Gottsäter A, Fernlund P, Sundkvist G.A 12-year prospective study of the relationship between islet antibodies and beta-cell function at and after the diagnosis in patients with adult-onset diabetes. *Diabetes.* 2002;51(6):1754-1762.
69. Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab.* 2011;14: 575–585.
70. Bost F, Aouadi M, Caron L, Even P, Belmonte N, Prot M, Dani C, Hofman P, Pagès G, Pouysségur J, Le Marchand-Brustel Y, Binétruy B. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes.* 2005;54(2):402-411.
71. Bottazzo GF, Bosi E, Cull CA, Bonifacio E, Locatelli M, Zimmet P, Mackay IR, Holman RR. IA-2 antibody prevalence and risk assessment of early insulin requirement in subjects presenting with type 2 diabetes (UKPDS 71). *Diabetologia.* 2005;48(4):703-708.
72. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet.* 1974;2(7892):1279-1283.
73. Bottazzo GF, Mann JI, Thorogood M, Baum JD, Doniach D. Autoimmunity in juvenile diabetics and their families. *Br Med J.* 1978;2(6131):165-168.
74. Brahimaj A, Ligthart S, Ghanbari M, Ikram MA, Hofman A, Franco OH, Kavousi M, Dehghan A. Novel inflammatory markers for incident pre-diabetes and type 2 diabetes: the Rotterdam Study. *European Journal of Epidemiology.* 2017;32(3):217-226.
75. Brooks-Worrell BM, Palmer JP. *Latent autoimmune diabetes in adults: Immunoendocrinology: Scientific and Clinical Aspects (Contemporary Endocrinology)*, New York: Humana Press. 2011:315-330.
76. Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, Evans GA, Tobin AJ. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(6):2115-2119.
77. Buckle AM, Hogg N. The effect of IFN-gamma and colony-stimulating factors on the expression of neutrophil cell membrane receptors. *J Immunol.* 1989;143:2295–2301.
78. Buraczynska M, Baranowicz-Gaszczyk I, Tarach J, Ksiazek A. Toll-like receptor 4 gene polymorphism and early onset of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Hum Immunol.* 2009;70:121–124.
79. Buraczynska M, Zukowski P, Ksiazek K, Wacinski P, Dragan M. The effect of Toll-like receptor 4 gene polymorphism on vascular complications in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016;116:7-13.
80. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003;52(1):102-110.
81. Buzzetti R, Di Pietro S, Giaccari A, Petrone A, Locatelli M, Suraci C, Capizzi M, Arpi ML, Bazzigaluppi E, Dotta F, Bosi E; Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes Study Group. High titer of autoantibodies to GAD identifies a specific phenotype of adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30(4):932-938.
82. Cai H, Cai J, Tao G. Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *APMIS.* 2013;121(7):605-611.
83. Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene.* 2004;23(38):6365-6378.
84. Calsolari MR, Rosário PW, Reis JS, Silva SC, Purisch S. Latent autoimmune diabetes of adult or slim type 2 diabetes mellitus? *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(2):315-321.
85. Calvin AD, Albuquerque FN, Lopez-Jimenez F, Somers VK. Obstructive Sleep Apnea, Inflammation, and the Metabolic Syndrome. *Metabolic Syndrome and Related Disorders.* 2009;7(4):271-277.
86. Cameron AR, Morrison VL, Levin D, Mohan M, Forteach C, Beall C, McNeilly AD, Balfour DJ, Savinko T, Wong AK, Viollet B, Sakamoto K, Fagerholm SC, Foretz M, Lang CC, Rena G. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Circ Res.* 2016;119(5):652-665.

87. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005;54(8):2277-2286.
88. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, Prelovsek O, Hohnen-Behrens C, Watt MJ, James DE, Kemp BE, Pedersen BK, Febbraio MA. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 2006;55(10):2688-2697.
89. Carlsson A, Sundkvist G, Groop L, Tuomi T. Insulin and glucagon secretion in patients with slowly progressing autoimmune diabetes (LADA). *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Jan;85(1):76-80.
90. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*. 2012 Feb;53(2):227-246.
91. Cernea S, Buzzetti R, Pozzilli P. Beta-cell protection and therapy for latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2:S246-252.; Brophy S, Davies H, Mannan S, Brunt H, Williams R. Interventions for latent autoimmune diabetes (LADA) in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011; 9: CD006165.
92. Cerrone GE, Caputo M, Lopez AP, González C, Massa C, Cédola N, Targovnik HM, Frechtel GD. Variable number of tandem repeats of the insulin gene determines susceptibility to latent autoimmune diabetes in adults. *Mol Diagn*. 2004;8(1):43-9.
93. Cervin C, Lyssenko V, Bakhtadze E, Lindholm E, Nilsson P, Tuomi T, Cilio CM, Groop L. Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2008;57(5):1433-7.
94. Chaillous L, Bouhanick B, Kerlan V, Mathieu E, Lecomte P, Ducluzeau PH, Delamaire M, Sonnet E, Maugendre D, Maréchaud R, Rohmer V, Saï P, Charbonnel B. Clinical and metabolic characteristics of patients with latent autoimmune diabetes in adults (LADA): absence of rapid beta-cell loss in patients with tight metabolic control. *Diabetes Metab*. 2010;36(1):64-70.
95. Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9850-5.
96. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1634-5.
97. Chen R, Gu N, Gao Y, Cen W. TLR4 Asp299Gly (rs4986790) polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis. *Mehra M, ed. PeerJ*. 2015;3:e1412.
98. Cheng Y, Zhu Y, Huang X, Zhang W, Han Z, Liu S. Association between TLR2 and TLR4 Gene Polymorphisms and the Susceptibility to Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126803.
99. Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes*. 2004;53(9):2330-7.
100. Chistiakov DA, Potapov VA, Khodirev DS, Shamkhalova MS, Shestakova MV, Nosikov VV. The PPARgamma Pro12Ala variant is associated with insulin sensitivity in Russian normoglycaemic and type 2 diabetic subjects. *Diab Vasc Dis Res*. 2010; 7(1):56-62.
101. Chiu HK, Tsai EC, Juneja R, Stoeber J, Brooks-Worrell B, Goel A, Palmer JP. Equivalent insulin resistance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(2):237-44.
102. Christie M, Landin-Olsson M, Sundkvist G, Dahlquist G, Lernmark A, Baekkeskov S. Antibodies to a Mr-64,000 islet cell protein in Swedish children with newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1988;31(8):597-602.
103. Cildir G, Akıncılar SC, Tergaonkar V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol Med*. 2013;19(8):487-500.
104. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S97-107.
105. Coen PM, Flynn MG, Markofski MM, Pence BD, Hannemann RE. Adding exercise to rosuvastatin treatment: influence on C-reactive protein, monocyte toll-like receptor 4 expression, and inflammatory monocyte (CD14 + CD16+) population. *Metab Clin Exp*. 2010;59:1775-1783.
106. Cole JE, Georgiou E, Monaco C. The Expression and Functions of Toll-Like Receptors in Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*. 2010;2010:393946.

107. Consentino A, Gambelunghe G, Tortocoli C, Falorni A. CTLA-4 gene polymorphism contributes to the genetic risk for latent autoimmune diabetes in adults. *Ann NY Acad Sci* 2002; 958: 337-340.
108. Considine RV. Activated Monocytes: Yet Another Link Between Systemic Inflammation and Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 99, Issue 7, 2014, Pages 2347–2349.
109. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334:292–295.
110. Costa, A., Fernández-Real JM, Vendrell J, Broch M, Casamitjana R, Ricart W, Conget I. Lower rate of tumor necrosis factor- α -863A allele and higher concentration of tumor necrosis factor- α receptor 2 in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2003; 52:1068–1071.
111. Cottam DR, Schaefer PA, Shaftan GW, Velcu L, Angus LD. Effect of surgically-induced weight loss on leukocyte indicators of chronic inflammation in morbid obesity. *Obes Surg*. 2002;12:335–342.
112. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 2010;33(3):375-386.
113. Cuda C, Badawi A, Karmali M, El-Sohehy A. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 are associated with factors of the metabolic syndrome and modify the association between dietary saturated fat and fasting high-density lipoprotein cholesterol. *Metabolism*. 2011;60(8):1131-1135.
114. Czernichow S, Kengne AP, Stamatakis E, Hamer M, Batty GD. Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio: which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk?: evidence from an individual-participant meta-analysis of 82 864 participants from nine cohort studies. *Obes Rev*. 2011;12(9):680-687.
115. Dalziel B, Gosby AK, Richman RM, Bryson JM, Caterson ID. 2002. Association of the TNF α -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity. *Obes. Res*. 10:401–407.
116. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ*. 2000;321:199–204.
117. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2010;33:861-868.
118. Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. High Glucose Induces Toll-Like Receptor Expression in Human Monocytes: Mechanism of Activation. *Diabetes*. 2008;57(11):3090-3098.
119. Dasu MR, Jialal I. Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(1):E145-154.
120. Davies H, Brophy S, Fielding A, Bingley P, Chandler M, Hilldrup I, Brooks C, Williams R. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) in South Wales: incidence and characterization. *Diabet Med*. 2008; 25(11):1354-1357.
121. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(6):1248-1255.
122. Davis BH, Zarev PV. Human monocyte CD163 expression inversely correlates with soluble CD163 plasma levels. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 63:16-22.
123. Davis TM, Wright AD, Mehta ZM, Cull CA, Stratton IM, Bottazzo GF, Bosi E, Mackay IR, Holman RR. Islet autoantibodies in clinically diagnosed type 2 diabetes: prevalence and relationship with metabolic control (UKPDS 70). *Diabetologia*. 2005;48(4):695-702.
124. Decochez K, Tits J, Coolens JL, Van Gaal L, Krzentowski G, Winnock F, Anckaert E, Weets I, Pipeleers DG, Gorus FK. High frequency of persisting or increasing islet-specific autoantibody levels after diagnosis of type 1 diabetes presenting before 40 years of age. *The Belgian Diabetes Registry*. *Diabetes Care*. 2000;23(6):838-844.
125. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*. 1998; 20(3):284–287.
126. Derosa G, Maffioli P, Ferrari I, Fogari E, D'Angelo A, Palumbo I, Randazzo S, Bianchi L, Cicero AF. Acarbose actions on insulin resistance and inflammatory parameters during an oral fat load. *Eur J Pharmacol*. 2011;651(1-3):240-250.

127. Desai M, Clark A. Autoimmune diabetes in adults: lessons from the UKPDS. *Diabet Med.* 2008 Aug;25 Suppl 2:30-34.
128. Desai M, Cull CA, Horton VA, Christie MR, Bonifacio E, Lampasona V, Bingley PJ, Levy JC, Mackay IR, Zimmet P, Holman RR, Clark A. GAD autoantibodies and epitope reactivities persist after diagnosis in latent autoimmune diabetes in adults but do not predict disease progression: UKPDS 77. *Diabetologia.* 2007;50(10):2052-2060.
129. Desai M, Zeggini E, Horton VA, Owen KR, Hattersley AT, Levy JC, Hitman GA, Walker M, Holman RR, McCarthy MI, Clark A. The variable number of tandem repeats upstream of the insulin gene is a susceptibility locus for latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes.* 2006;55(6):1890-1894.
130. Devaraj S, Chen X, Adams-Huet B, Jialal I. Increased expression of Fc- γ receptors on monocytes in patients with nascent metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(9):E1510-1515.
131. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(2):578-583.
132. Devaraj S, Du Clos TW, Jialal I. Binding and internalization of C-reactive protein by Fc γ receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1359-1363.
133. Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein polarizes human macrophages to an M1 phenotype and inhibits transformation to the M2 phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1397-1402.
134. Devaraj S, Jialal I, Yun JM, Bremer A. Demonstration of increased toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in monocytes of type 1 diabetes mellitus patients with microvascular complications. *Metabolism.* 2011;60(2):256-259.
135. Devaraj S, Singh U, Jialal I. Human C-reactive protein and the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology.* 2009;20(3):182-189.
136. Devaraj S, Tobias P, Jialal I. Knockout of toll-like receptor-4 attenuates the pro-inflammatory state of diabetes. *Cytokine.* 2011;55(3):441-445.
137. Devaraj S, Tobias P, Kasinath BS, Ramsamooj R, Afify A, Jialal I. Knockout of toll-like receptor-2 attenuates both the proinflammatory state of diabetes and incipient diabetic nephropathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011b;31(8):1796-1804.
138. Diabetes Prevention Program Research Group. Long-term effects of lifestyle intervention or metformin on diabetes development and microvascular complications over 15-year follow-up: the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(11):866-875.
139. Diabetes Prevention Program Research Group, Dabelea D, Ma Y, Ma Y, Knowler WC, Marcovina S, Saudek CD, Arakaki R, White NH, Kahn SE, Orchard TJ, Goldberg R, Palmer J, Hamman RF. Diabetes autoantibodies do not predict progression to diabetes in adults: the Diabetes Prevention Program. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association.* 2014;31(9):1064-1068.
140. Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11(3):483-486.
141. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20(5 Suppl 27):S1-13.
142. Ding J, Zhu C, Mei X, Zhou Y, Feng B, Guo Z. Peroxisome proliferator-activated receptor γ Pro12Ala polymorphism decrease the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes: a meta analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2015;8(5):7655-7660.
143. Dittillo M, Pandit V, Rhee P, Aziz H, Hadeed S, Bhattacharya B, Friese RS, Davis K, Joseph B. Morbid obesity predisposes trauma patients to worse outcomes: a National Trauma Data Bank analysis. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014;76(1):176-179.
144. Dominguez H, Storgaard H, Rask-Madsen C, Storgaard H, Rask-Madsen C, Steffen Hermann T, Ihlemann N, Baunbjerg Nielsen D, Spohr C, Kober L, Vaag A, Torp-Pedersen C. Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. *J Vasc Res.* 2005;42:517-525.
145. Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes.* 1999; 48: 738-744.
146. Dong F, Yang G, Pan HW, Huang WH, Jing LP, Liang WK, Zhang N, Zhang BH, Wang M, Liu Y, Zhang LJ, Zhang SH, Li H, Chen C, Nie LH, Jing CX. The association of PTPN22 rs2476601 polymorphism and CTLA-4 rs231775 polymorphism with LADA risks: a systematic review and meta-analysis. *Acta Diabetologica.* 2014;51(5):691-703.

147. Doupis J, Lyons TE, Wu S, Gnardellis C, Dinh T, Veves A. Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(6):2157-2163.
148. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 2010;464(7293):1357-1361.
149. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan Z-Q. Expression of Toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002;105:1158-61.
150. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, Yagi N, Ohto U, Kimoto M, Miyake K, Tobe K, Arai H, Kadowaki T, Nagai R. Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab.* 2012;15(4):518-533.
151. Ehses JA, Meier DT, Wueest S, Rytka J, Boller S, Wielinga PY, Schraenen A, Lemaire K, Debray S, Van Lommel L, Pospisilik JA, Tschopp O, Schultze SM, Malipiero U, Esterbauer H, Ellingsgaard H, Rützi S, Schuit FC, Lutz TA, Böni-Schnetzler M, Konrad D, Donath MY. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia.* 2010;53(8):1795-1806.
152. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2007 Sep;56(9):2356-70.
153. Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Hansen L, Carstensen B, Borch-Johnsen K, Drivsholm T, Berglund L, Hansen T, Lithell H, Pedersen O. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant Caucasians. *Diabetologia.* 2001, 44(9):1170-1176.
154. Elks ML, Sawyer JW. Misunderstanding in the classification of diabetes mellitus. What's in a name? *Western Journal of Medicine.* 1993;159(1):44-49.
155. Escobar-Morreale HF, Botella-Carretero JJ, Villuendas G, Sancho J, San Millán JL. Serum interleukin-18 concentrations are increased in the polycystic ovary syndrome: relationship to insulin resistance and to obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Feb;89(2):806-811.
156. Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Di Palo C, Ciotola M, Barbieri M, Paolisso G, Giugliano D. Cytokine milieu tends toward inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003;26(5):1647.
157. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation.* 2002; 106: 2067-2072.
158. Esposito K, Pontillo A, Ciotola M, Di Palo C, Grella E, Nicoletti G, Giugliano D. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(8):3864-3866.
159. Etzerodt A, Maniecki MB, Møller K, Møller HJ, Moestrup SK: Tumor necrosis factor α -converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2010; 88:1201-1205.
160. Etzerodt A, Moestrup SK: CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013; 18:2352-2363.
161. Evans J, Collins M, Jennings C, Merwe L van der, Soderstrom I, Olsson T. The association of interleukin-18 genotype and serum levels with metabolic risk factors for cardiovascular disease. *Eur J Endocrinol.* 2007;157:633-640.
162. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes.* 2003;52(1):1-8.
163. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997 Jul; 20(7): 1183-1197.
164. Fabriek BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RP, Dijkstra CD, van den Berg TK: The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 2009; 113:887-892.
165. Faggioni R, Fantuzzi G, Fuller J, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C. IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation. *Am J Physiol.* 1998;274:R204-R208.

166. Fain JN, Tichansky DS, Madan AK. Most of the interleukin 1 receptor antagonist, cathepsin S, macrophage migration inhibitory factor, nerve growth factor, and interleukin 18 release by explants of human adipose tissue is by the non-fat cells, not by the adipocytes. *Metabolism*. 2006;55:1113–1121.
167. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem*. 1997; 272(30):18779-18789.
168. Falck-Hansen M, Kassiteridi C, Monaco C. Toll-Like Receptors in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(7):14008-14023.
169. Farhangkhoe H, Khan ZA, Barbin Y, Chakrabarti S. Glucose-induced up-regulation of CD36 mediates oxidative stress and microvascular endothelial cell dysfunction. *Diabetologia*. 2005;48:1401-1410.
170. Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide and IFN- γ induce toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF- κ B activation. *J Immunol*. 2001;166:2018–24.
171. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation and lipid metabolism. *J Clin Inv* 2001; 108: 785–791.
172. Febbraio M.A., Pedersen B.K. Contraction-induced myokine production and release: Is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2005;33:114–119.
173. Feeney SJ, Myers MA, Mackay IR, Zimmet PZ, Howard N, Verge CF, Rowley MJ: Evaluation of ICA512As in combination with other islet cell autoantibodies at the onset of IDDM. *Diabetes Care*. 1997; 20:1403–1407.
174. Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernández-Castañer M, Vendrell J, Richart C, Soler J. The TNF- α gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes*. 1997; 46:1468–1472.
175. Fernandez-Real JM, Vendrell J, Ricart W, Broch M, Gutiérrez C, Casamitjana R, Oriola J, Richart C. Polymorphism of the tumor necrosis factor- α receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2000; 23:831–837.
176. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, Van der Meer JW, Netea MG. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med*. 2008; 14: 346-352.
177. Ferwerda B, McCall MB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, Syafruddin D, Kibiki G, Cristea T, Hijmans A, Hamann L, Israel S, ElGhazali G, Troye-Blomberg M, Kumpf O, Maiga B, Dolo A, Doumbo O, Hermsen CC, Stalenhoef AF, van Crevel R, Brunner HG, Oh DY, Schumann RR, de la Rúa C, Sauerwein R, Kullberg BJ, van der Ven AJ, van der Meer JW, Netea MG. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; 104:16645-16650.
178. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell. Microbiol*. 2008; 10, 2058–2066.
179. Fessler MB, Rudel LL, Brown M. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology*. 2009;20(5):379-385.
180. Festa A, D'Agostino Jr R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000; 102:42-47.
181. Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM: Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*. 2002; 51:1131–1137.
182. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009;15(8):930-939.
183. Figueroa L, Xiong Y, Song C, Piao W, Vogel SN, Medvedev AE. The Asp299Gly Polymorphism Alters TLR4 Signaling by Interfering with Recruitment of MyD88 and TIR domain-containing adapter inducing IFN- β . *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2012;188(9):4506-4515.
184. Fischer CP, Perstrup LB, Berntsen A, Eskildsen P, Pedersen BK. Elevated plasma interleukin-18 is a marker of insulin-resistance in type 2 diabetic and non-diabetic humans. *Clin Immunol*. 2005;117(2):152-160.

185. Fjaertoft G, Håkansson LD, Pauksens K, Sisask G, Venge P. Neutrophil CD64 (FcγRI) expression is a specific marker of bacterial infection: a study on the kinetics and the impact of major surgery. *Scand J Infect Dis.* 2007;39:525–535.
186. Fjeldborg K, Christiansen T, Bennetzen M, J Møller H, Pedersen SB, Richelsen B. The macrophage-specific serum marker, soluble CD163, is increased in obesity and reduced after dietary-induced weight loss. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(12):2437-43.
187. Fjeldborg K, Møller HJ, Richelsen B, Pedersen SB. Regulation of CD163 mRNA and soluble CD163 protein in human adipose tissue in vitro. *J Mol Endocrinol.* 2014;53(2):227-35.
188. Florez JC, Jablonski KA, Sun MW, Jablonski KA, Sun MW, Bayley N, Kahn SE, Shamon H, Hamman RF, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D; Diabetes Prevention Program Research Group. Effects of the type 2 diabetes-associated PPARγ P12A polymorphism on progression to diabetes and response to troglitazone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2007;92(4):1502–1509.
189. Fonseca SG, Gromada J, Urano F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta cell death. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2011;22(7):266-274.
190. Frankenberger, M., T. Sternsdorf, H. Pechumer, A. Pforte, H. W. Ziegler-Heitbrock. 1996. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87: 373.
191. Frederich RC, Lollmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, Flier JS. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents: Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest.* 1995;96:1658–1663.
192. Frederiksen L, Brødbæk K, Fenger M, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, Urhammer SA. Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-γ gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(8):3989-92.
193. Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, O'Reilly DS, Packard CJ, Sattar N: C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes.* 2002; 51:1596–600.
194. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):847-50.
195. Frings W, Dreier J, Sorg C: Only soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect. *FEBS Letters* 2002; 526:93–96.
196. Frohlich M, Imhof A, Berg G, Hutchinson WL, Pepys MB, Boeing H, Muche R, Brenner H, Koenig W. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care.* 2000;23:1835-1839.
197. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe M. Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes.* 2009;58(11):2574-2582.
198. Furuta M, Yano Y, Ito K, Gabazza EC, Katsuki A, Tanaka T, Ohtake K, Hirata N, Hori Y, Araki-Sasaki R, Sumida Y, Adachi Y. Relationship of the tumor necrosis factor-α -308 A/G promoter polymorphism with insulin sensitivity and abdominal fat distribution in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2002; 56:141–145.
199. Gacka M, Bednarska-Chabowska D, Dobosz T, Szymaniec S, Jakobsche U, Lebioda A, Adamiec R. The Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ and immunological processes in patients with type 2 diabetes and insulin resistance. *Przegl Lek.* 2007;64(6):393-397.
200. Gale EA. Latent autoimmune diabetes in adults: a guide for the perplexed. *Diabetologia.* 2005 Nov;48(11):2195-2199.
201. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κB kinase complex. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48115–48121.
202. The GBD 2013 Obesity Collaboration, Ng M, Fleming T, et al. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980–2013: A systematic analysis. *Lancet (London, England).* 2014; 384(9945):766-781.
203. Gerold G., Ajaj K. A., Bienert M., Laws H. J., Zychlinsky A., de Diego J. L. (2008). A toll-like receptor 2-integrin [β]3 complex senses bacterial lipopeptides via vitronectin. *Nat. Immunol.* 9, 761–768.

204. Gerling I, Baekkeskov S, Lernmark A. Islet cell and 64K autoantibodies are associated with plasma IgG in newly diagnosed insulin-dependent diabetic children. *J Immunol.* 1986;137(12):3782-3785.
205. Ghossaini M, Meyre D, Lobbens S, Charpentier G, Clément K, Charles MA, Tauber M, Weill J, Froguel P. Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population. *BMC Med Genet.* 2005; 6:11.
206. Glance LG, Li Y, Osler TM, Mukamel DB, Dick AW. Impact of Obesity on Mortality and Complications in Trauma Patients. *Ann Surg.* 2014;259(3):576–581.
207. The Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration (BMI Mediated Effects). Metabolic mediators of the effects of body-mass index, overweight, and obesity on coronary heart disease and stroke: a pooled analysis of 97 prospective cohorts with 1.8 million participants. *Lancet.* 2014;383(9921):970-983.
208. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature. Rev. Immunol.* 2003; 3: 2-35.
209. Gorus FK, Goubert P, Semakula C, Vandewalle CL, Schepper JD, Scheen A, Christie MR, Pipeleers DG, the Belgian Diabetes Registry: IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. *Diabetologia* 1997; 40:95–99.
210. Gouda HN, Sagoo GS, Harding AH, Yates J, Sandhu MS, Higgins JP. The association between the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2010; 171(6):645-655.
211. Gottsäter A, Landin-Olsson M, Fernlund P, Lernmark A, Sundkvist G. Beta-cell function in relation to islet cell antibodies during the first 3 yr after clinical diagnosis of diabetes in type II diabetic patients. *Diabetes Care.* 1993;16(6):902-910.
212. Gottsäter A, Landin-Olsson M, Lernmark A, Fernlund P, Sundkvist G, Hagopian WA. Glutamate decarboxylase antibody levels predict rate of beta-cell decline in adult-onset diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 1995;27(2):133-140.
213. Graham J, Hagopian WA, Kockum I, Li LS, Sanjeevi CB, Lowe RM, Schaefer JB, Zarghami M, Day HL, Landin-Olsson M, Palmer JP, Janer-Villanueva M, Hood L, Sundkvist G, Lernmark A, Breslow N, Dahlquist G, Blohmé G; Diabetes Incidence in Sweden Study Group; Swedish Childhood Diabetes Study Group. Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(5):1346-1355.
214. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415-45.
215. Griffin E, Re A, Hamel N, Fu C, Bush H, McCaffrey T, Asch AS. A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med.* 2001;7:840-846.
216. Groop LC, Bottazzo GF, Doniach D (1986) Islet cell antibodies identify latent Type 1 diabetes in patients aged 35–75 years at diagnosis. *Diabetes* 35:237–241.
217. Gupta M, Teoh H, Kajil M, Tsigoulis M, Quan A, Braga MF, Verma S. The effects of rosiglitazone on inflammatory biomarkers and adipokines in diabetic, hypertensive patients. *Exp Clin Cardiol.* 2012 Winter;17(4):191-196.
218. Gustafson B, Smith U. Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2006 Apr 7;281(14):9507-9516.
219. Hacker, H., Vabulas, R.M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., Wagner, H. (2000) Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J. Exp. Med.* 192, 595–600.
220. Hagopian WA, Michelsen B, Karlens AE, Larsen F, Moody A, Grubin CE, Rowe R, Petersen J, McEvoy R, Lernmark A. Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M(r) rather than the 67,000-M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 1993;42(4):631–636.
221. Haffner S, Temprosa M, Crandall J, Fowler S, Goldberg R, Horton E, Marcovina S, Mather K, Orchard T, Ratner R, Barrett-Connor E; Diabetes Prevention Program Research Group. Intensive lifestyle intervention or metformin on inflammation and coagulation in participants with impaired glucose tolerance. *Diabetes.* 2005;54(5):1566-1572.
222. Haller K, Kisand K, Pisarev H, Salur L, Laisk T, Nemvalts V, Uibo R. Insulin gene VNTR, CTLA-4 +49A/G and HLA-DQB1 alleles distinguish latent autoimmune diabetes in adults from type 1 diabetes and from type 2 diabetes group. *Tissue Antigens.* 2007;69(2):121-127.
223. Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, Nabi M, Ghazanfar K, Ganai BA. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World Journal of Diabetes.* 2015;6(4):598-612.

224. Handberg A, Højlund K, Gastaldelli A, Flyvbjerg A, Dekker JM, Petrie J, Piatti P, Beck-Nielsen H, RISC Investigators. Plasma sCD36 is associated with markers of atherosclerosis, insulin resistance and fatty liver in a nondiabetic healthy population. *J Intern Med* 2012; 271: 294–304.
225. Handberg A, Levin K, Højlund K, Beck-Nielsen H. Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: a novel marker of insulin resistance. *Circulation*. 2006;114:1169-1176.
226. Haneklaus M, O'Neill LA. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol Rev*. 2015;265(1):53-62.
227. Harms RZ, Yarde DN, Guinn Z, Lorenzo-Arteaga KM, Corley KP, Cabrera MS, Sarvetnick NE. Increased expression of IL-18 in the serum and islets of type 1 diabetics. *Molecular immunology*. 2015; 64: 306-312.
228. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guet C, Brière F, Vlach J, Lebecque S, Trinchieri G, Bates EE. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*. 2005;174:2942–2950.
229. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The toll gene of *Drosophila* required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988;52:269–279
230. Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β -cell dysfunction in diabetes. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(2):R33-54.
231. Hatfield EC, Hawkes CJ, Payton MA, Christie MR. Cross reactivity between IA-2 and phogrin/IA-2beta in binding of autoantibodies in IDDM. *Diabetologia*. 1997 Nov;40(11):1327-1333.
232. Hawa MI, Kolb H, Schloot N, Beyan H, Paschou SA, Buzzetti R, Mauricio D, De Leiva A, Yderstraede K, Beck-Nielsen H, Tuomilehto J, Sarti C, Thivolet C, Hadden D, Hunter S, Scherthaner G, Scherbaum WA, Williams R, Brophy S, Pozzilli P, Leslie RD; Action LADA consortium. Adult-onset autoimmune diabetes in Europe is prevalent with a broad clinical phenotype: Action LADA 7. *Diabetes Care*. 2013 Apr;36(4):908-13.
233. Hawa MI, Thivolet C, Mauricio D, Alemanno I, Cipponeri E, Collier D, Hunter S, Buzzetti R, de Leiva A, Pozzilli P, Leslie RD; Action LADA Group. Metabolic syndrome and autoimmune diabetes: action LADA 3. *Diabetes Care*. 2009;32(1):160-164.
234. Hawkes CJ, Wasmeier C, Christie MR, Hutton JC. Identification of the 37-kDa antigen in IDDM as a tyrosine phosphatase-like protein (phogrin) related to IA-2. *Diabetes*. 1996;45(9):1187-1192.
235. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. *Nature*. 2001;410:1099–1103.
236. Haziot A, Ferrero E, Köntgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity*. 1996;4(4):407-414.
237. He L, Wong CK, Cheung KK, Yau HC, Fu A, Zhao HL, Leung KM, Kong AP, Wong GW, Chan PK, Xu G, Chan JC. Anti-inflammatory effects of exendin-4, a glucagon-like peptide-1 analog, on human peripheral lymphocytes in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*. 2013;4(4):382-392.
238. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303:1526–1529.
239. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408:740–745.
240. Hennessy E, O'Neill L.
http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=12189&utm_campaign=CFA-Immunology&utm_source=Abcam.CFA&utm_medium=Email&utm_term=030210-TLRarticle&cl=249&intGoUser=15#3
241. Hensen J, Howard CP, Walter V, Thuren T. Impact of interleukin-1b antibody (canakinumab) on glycaemic indicators in patients with type 2 diabetes mellitus: results of secondary endpoints from a randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes Metab* 2013;39:524–531.
242. Herder C, Baumert J, Thorand B, Koenig W, de Jager W, Meisinger C, Illig T, Martin S, Kolb H. Chemokines as risk factors for type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg study, 1984-2002. *Diabetologia*. 2006;49(5):921-929.
243. Herder C, Rathmann W, Strassburger K, Finner H, Grallert H, Huth C, Meisinger C, Gieger C, Martin S, Giani G, Scherbaum WA, Wichmann HE, Illig T. Variants of the PPARG, IGF2BP2, CDKAL1, HHEX, and

- TCF7L2 genes confer risk of type 2 diabetes independently of BMI in the German KORA studies. *Horm Metab Res.* 2008;40(10):722-726.
244. Higashimori M., Tatro J.B., Moore K.J., Mendelsohn M.E., Galper J.B., Beasley D. Role of toll-like receptor 4 in intimal foam cell accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31:50–57.
 245. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002; 420, 333–336.
 246. Hivert MF, Sun Q, Shrader P, Mantzoros CS, Meigs JB, Hu FB. Circulating IL-18 and the risk of type 2 diabetes in women. *Diabetologia.* 2009;52:2101–2108.
 247. Hodgkinson CP, Ye S. Toll-like receptors, their ligands, and atherosclerosis. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:437-53.
 248. Hold GL, Berry S, Saunders KA, Drew J, Mayer C, Brookes H, Gay NJ, El-Omar EM, Bryant CE. The TLR4 D299G and T399I SNPs are constitutively active to up-regulate expression of Trif-dependent genes. *PLoS One.* 2014;9(11):e111460.
 249. Holloway JW, Yang IA, Ye S. Variation in the toll-like receptor 4 gene and susceptibility to myocardial infarction. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15(1):15-21.
 250. Holst B, Szakmany T, Raby AC, Hamlyn V, Durno K, Hall JE, Labéta MO. Soluble Toll-like receptor 2 is a biomarker for sepsis in critically ill patients with multi-organ failure within 12 h of ICU admission. *Intensive Care Med Exp.* 2017;5:2.
 251. Hommels MJ, Kroon AA, Netea MG, de Leeuw PW, Bruggeman CA, Leiner T, Koster DA, Stalenhoef AF, van der Ven AJ. The Asp299Gly Toll-like receptor 4 polymorphism in advanced aortic atherosclerosis. *Neth J Med.* 2007;65(6):203-207.
 252. Horton V, Stratton I, Bottazzo GF, Shattock M, Mackay I, Zimmet P, Manley S, Holman R, Turner R: Genetic heterogeneity of autoimmune diabetes: age of presentation in adults is influenced by HLA DRB1 and DQB1 genotypes (UKPDS 43). *Diabetologia.* 1999; 42 : 608 –616.
 253. Hosszúfalusi N, Vataj A, Rajczy K, Prohászka Z, Pozsonyi E, Horváth L, Grosz A, Gerő L, Madácsy L, Romics L, Karádi I, Füst G, Pánczél P. Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression. *Diabetes Care.* 2003;26(2):452-457.
 254. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995;95(5):2409-2415.
 255. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest.* 1994;94(4):1543-1549.
 256. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259:87–91.
 257. Hotamisligil GS. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell.* 2010;140(6):900-917.
 258. Housen ME, El-Mahdy RH, Shahin DA. (2016). Serum soluble toll-like receptor 2: a novel biomarker for systemic lupus erythematosus disease activity and lupus-related cardiovascular dysfunction. *Int J Rheum Dis.* 19: 685-692.
 259. Howard CF., Jr Longitudinal studies on the development of diabetes in individual *Macaca nigra*. *Diabetologia.* 1986;29:301–306.
 260. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics.* 2015;33(7):673-689.
 261. Hu FB, Meigs JB, Li TY, Rifai N, Manson JE. Inflammatory markers and risk of developing type 2 diabetes in women. *Diabetes.* 2004;53(3):693-700.
 262. Hu W, Wu S, Zhang Y, Sigdel KR, Lin Y, Zhong H. Association between Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms and Systemic Lupus Erythematosus Susceptibility: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:7842587.
 263. Huang G, Wang X, Li Z, Li H, Li X, Zhou Z. Insulin autoantibody could help to screen latent autoimmune diabetes in adults in phenotypic type 2 diabetes mellitus in Chinese. *Acta Diabetol.* 2012;49(5):327-331.
 264. Huang G, Xiang Y, Pan L, Li X, Luo S, Zhou Z. Zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) could help differentiate latent autoimmune diabetes in adults (LADA) from phenotypic type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013;29(5):363-368.

265. Hulett M, Hogarth P (1998). "The second and third extracellular domains of FcγRI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a". *Mol Immunol.* 35 (14-15): 989–996.
266. Hung J, McQuillan BM, Chapman CM, Thompson PL, Beilby JP. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1268–1273.
267. Hung JH, Su IJ, Lei HY, Wang HC, Lin WC, Chang WT, Huang W, Chang WC, Chang YS, Chen CC. Endoplasmic reticulum stress stimulates the expression of cyclooxygenase-2 through activation of NF-κB and pp38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2004;279:46384–46392.
268. Hyakushima N, Mitsuzawa H, Nishitani C, Sano H, Kuronuma K, Konishi M, Himi T, Miyake K, Kuroki Y. Interaction of soluble form of recombinant extracellular TLR4 domain with MD-2 enables lipopolysaccharide binding and attenuates TLR4-mediated signaling. *J Immunol.* 2004;173:6949-6954.
269. Iikuni N, Lam QLK, Lu L, Matarese G, La Cava A. Leptin and Inflammation. *Current immunology reviews.* 2008;4(2):70-79.
270. Illig T, Bongardt F, Schöpfer A, Müller-Scholze S, Rathmann W, Koenig W, Thorand B, Vollmert C, Holle R, Kolb H, Herder C; Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg/Cooperative Research in the Region of Augsburg. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphism C-174G and A-598G with type 2 diabetes. *J Clin Endocrin Metab.* 2004; 89:5053–5058.
271. Illig T, Bongardt F, Schöpfer A, Holle R, Müller S, Rathmann W, Koenig W, Meisinger C, Wichmann HE, Kolb H; KORA Study Group. The endotoxin receptor TLR4 polymorphism is not associated with diabetes or components of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2003;52(11):2861-4.
272. Inoue H, Ogawa W, Asakawa A, Okamoto Y, Nishizawa A, Matsumoto M, Teshigawara K, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Notohara K, Katayose K, Okamura H, Kahn CR, Noda T, Takeda K, Akira S, Inui A, Kasuga M. Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 2006;3(4):267-75.
273. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 7th edition, 2015.*
274. International Diabetes Federation. *The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. 2005.*
275. Ip WK, Takahashi K, Moore KJ, Stuart LM, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin enhances toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *J. Exp. Med.* 2008; 205: 169–18110.
276. Irvine WJ, Gray RS, McCallum CJ. Pancreatic islet-cell antibody as a marker for asymptomatic and latent diabetes and prediabetes. *Lancet.* 1976;2(7995):1097-1102.
277. Ishida BY, Blanche PJ, Nichols AV, Yashar M, Paigen B. Effects of atherogenic diet consumption on lipoproteins in mouse strains C57BL/6 and C3H. *J Lipid Res.* 1991;32:559–568.
278. Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikacharoen T, Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol.* 2000;165:6682-6686.
279. Ix JH, Wassel-Fyr C, Kanaya A, Vittinghoff E, Johnson KC, Koster A, Cauley JA, Harris TB, Cummings SR, Shlipak MG. Fetuin-A and Incident Diabetes Mellitus in Older Persons: The Health Aging and Body Composition (Health ABC) Study. *JAMA: the journal of the American Medical Association.* 2008; 300(2):182-188.
280. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1β-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology.* 2007; 148: 241–251.
281. Jaipersad AS, Shantsila A, Lip GY, Shantsila E. Expression of monocyte subsets and angiogenic markers in relation to carotid plaque neovascularization in patients with pre-existing coronary artery disease and carotid stenosis. *Ann Med.* 2014;46(7):530-8.
282. Jansson PA., Pellme F, Hammarstedt A, Sandqvist M, Brekke H, Caidahl K, Forsberg M, Volkman R, Carvalho E, Funahashi T, Matsuzawa Y, Wiklund O, Yang X, Taskinen MR, Smith U. A novel cellular marker of insulin resistance and early atherosclerosis in humans is related to impaired fat cell differentiation and low adiponectin. *FASEB J.* 2003; 17, 1434-1440.
283. Jialal I, Huet BA, Kaur H, Chien A, Devaraj S. Increased Toll-Like Receptor Activity in Patients With Metabolic Syndrome. *Diabetes Care.* 2012;35(4):900-904.
284. Jialal I, Kaur H. The Role of Toll-Like Receptors in Diabetes-Induced Inflammation: Implications for Vascular Complications. *Curr Diab Rep.* 2012, 12, (2),172–179.

285. Jiang SY, Wei CC, Shang TT, Lian Q, Wu CX, Deng JY. High glucose induces inflammatory cytokine through protein kinase C-induced toll-like receptor 2 pathway in gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427(3):666-670.
286. Jiang ZS, Wang SX, Jia HX, Wang J, Liu YT. Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Inflammation.* 2013;36(1):251-7.
287. Jimenez-Dalmaroni MJ, Xiao N, Corper AL, Verdino P, Ainge GD, Larsen DS, Painter GF, Rudd PM, Dwek RA, Hoebe K, Beutler B, Wilson IA. Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2. *PLoS ONE.* 2009; 4: e7411.
288. Juge-Aubry CE, Somm E, Chicheportiche R, Burger D, Pernin A, Cuenod-Pittet B, Quinodoz P, Giusti V, Dayer JM, Meier CA. Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2652-2658.
289. Juhl CB, Bradley U, Holst JJ, Leslie RD, Yderstraede KB, Hunter S; Action LADA Consortium. Similar weight-adjusted insulin secretion and insulin sensitivity in short-duration late autoimmune diabetes of adulthood (LADA) and type 2 diabetes: Action LADA 9 [corrected]. *Diabet Med.* 2014;31(8):941-5.
290. Juneja R, Hirsch IB, Naik RG, Brooks-Worrell BM, Greenbaum CJ, Palmer JP. Islet cell antibodies and glutamic acid decarboxylase antibodies, but not the clinical phenotype, help to identify type 1(1/2) diabetes in patients presenting with type 2 diabetes. *Metabolism.* 2001;50(9):1008-13.
291. Juneja R, Palmer JP: Type 1 1/2 diabetes: myth or reality? *Autoimmunity.* 1999; 29:65- 83,.
292. Jung SH, Park HS, Kim KS, Choi WH, Ahn CW, Kim BT, Kim SM, Lee SY, Ahn SM, Kim YK, Kim HJ, Kim DJ, Lee KW. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J Nutr Biochem.* 2008;19(6):371-375.
293. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2003;46(1):3-19.
294. Kaito M, Araya S, Gondo Y, Fujita M, Minato N, Nakanishi M, Matsui M. Relevance of distinct monocyte subsets to clinical course of ischemic stroke patients. *PLoS one.* 2013;8:e69409.
295. Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, Sasaki R, Mori K, Iwanaga T, Nagao M. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 2002;277(21):19049-19055.
296. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kawatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem.* 2006;281(36):26602-26614.
297. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006 Jun;116(6):1494-14505.
298. Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Kawamori D, Matsuhisa M, Yamasaki Y. Oxidative stress and the JNK pathway in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2005;1(1):65-72.
299. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG, Lee JO. Recognition of lipopeptide patterns by toll-like receptor 2-toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity.* 2009; 31, 873-884.
300. Karaderi T, Drong AW, Lindgren CM. Insights into the Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes from Genome-Wide Association Studies of Obesity-Related Traits. *Current Diabetes Reports.* 2015;15:83.
301. Katakami N, Kaneto H, Matsuhisa M, Yoshiuchi K, Kato K, Yamamoto K, Umayahara Y, Kosugi K, Hori M, Yamasaki Y. Serum interleukin-18 levels are increased and closely associated with various soluble adhesion molecule levels in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007; 30: 159-161.
302. Kaur H, Chien A, Jialal I. Hyperglycemia induces Toll like receptor 4 expression and activity in mouse mesangial cells: relevance to diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(8):F1145-50.
303. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-122.
304. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI Jr, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:181643.
305. Kellogg AP, Wiggin TD, Larkin DD, Hayes JM, Stevens MJ, Pop-Busui R. Protective effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation against peripheral nerve dysfunction and intraepidermal nerve fiber loss in experimental diabetes. *Diabetes.* 2007;56(12):2997-3005.

306. Kennedy DJ, Kuchibhotla S, Westfall KM, Silverstein RL, Morton RE, Febbraio M. A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovascular Research*. 2011;89:604-13.
307. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2111-9.
308. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002; 347(3):185-92.
309. Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S. Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009; 384:311–315.
310. Kilpeläinen TO, Lakka TA, Laaksonen DE, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Lindi V, Tuomilehto J, Uusitupa M, Laakso M. SNPs in PPAR γ associate with type 2 diabetes and interact with physical activity. *Med Sci Sports Exerc*. 2008 Jan;40(1):25-33.
311. Kim CS, Park HS, Kawada T, Kim JH, Lim D, Hubbard NE, Kwon BS, Erickson KL, Yu R. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(9):1347-55.
312. Kim JJ, Lee CJ, Jin MS, Lee CH, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem*. 2005 ;280(12):11347-51.
313. Kirchner M, Sonnenschein A, Schoofs S, Schmidtke P, Umlauf VN, Mannhardt-Laakmann W. Surface expression and genotypes of Toll-like receptors 2 and 4 in patients with juvenile idiopathic arthritis and systemic lupus erythematosus. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2013;11(1):9.
314. Kitade H, Sawamoto K, Nagashimada M, Inoue H, Yamamoto Y, Sai Y, Takamura T, Yamamoto H, Miyamoto K, Ginsberg HN, Mukaida N, Kaneko S, Ota T. CCR5 Plays a Critical Role in Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance by Regulating Both Macrophage Recruitment and M1/M2 Status. *Diabetes*. 2012; 61(7):1680-1690.
315. Knip M, Karjalainen J, Akerblom HK. Islet cell antibodies are less predictive of IDDM among unaffected children in the general population than in sibs of children with diabetes. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes Care*. 1998; 21(10):1670-1673.
316. Kobayashi T, Mikanishi K, Murase T, Kosaka K (1996) Small doses of subcutaneous insulin as a strategy for preventing slowly progressive β -cell failure in islet cell antibody-positive patients with clinical features of NIDDM. *Diabetes* 45:622–626.
317. Kobayashi T, Tamemoto K, Nakanishi K, Kato N, Okubo M, Kajio H, Sugimoto T, Murase T, Kosaka K. Immunogenetic and clinical characterization of slowly progressive IDDM. *Diabetes Care*. 1993;16(5):780-788.
318. Koch W, Hoppmann P, Pfeufer A, Schömig A, Kastrati A. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2524-2529.
319. Koenen TB, Stienstra R, van Tits LJ, Joosten LA, van Velzen JF, Hijmans A, Pol JA, van der Vliet JA, Netea MG, Tack CJ, Stalenhoef AF, de Graaf J. The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. *Endocrinology*. 2011; 152, 3769–3778.
320. Kolek MJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Whiting BM, Horne BD, Bair TL, Anderson JL. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J*. 2004;148(6):1034-1040.
321. Kondelkova K, Krejsek J, Borska L, Fiala Z, Hamakova K, Ettler K, Andrys C. (2014). Membrane and soluble Toll-like receptor 2 in patients with psoriasis treated by Goeckerman therapy. *Int J Dermatol*, 53:e512-e517
322. Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H, Vance DE, Dyck JR. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007;56:2863-2871.
323. Kosteli A, Sugaru E, Haemmerle G, Martin JF, Lei J, Zechner R, Ferrante AW Jr. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest*. 2010;120(10):3466-3679.
324. Koster A, Leitzmann MF, Schatzkin A, Mouw T, Adams KF, van Eijk JT, Hollenbeck AR, Harris TB. Waist circumference and mortality. *Am J Epidemiol*. 2008;167(12):1465-1475.

325. Kowal K, Silver R, Sławińska E, Bielecki M, Chyczewski L, Kowal-Bielecka O: CD163 and its role in inflammation. *Folia Histochem Cytobiol* 2011; 49:365-374.
326. Kozłowski P, Miller DT, Zee RY, Danik JS, Chasman DI, Lazarus R, Cook NR, Ridker PM, Kwiatkowski DJ. Lack of association between genetic variation in 9 innate immunity genes and baseline CRP levels. *Ann Hum Genet.* 2006;70(Pt 5):574-586.
327. Kračmerová J, Rossmeislová L, Kováčová Z, Klimčáková E, Polák J, Tencerová M, Mališová L, Štich V, Langin D, Šiklová M. Soluble CD163 is associated with CD163 mRNA expression in adipose tissue and with insulin sensitivity in steady-state condition but not in response to calorie restriction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(3):E528-535.
328. Kretowski A, Kowalska I, Peczyńska J, Urban M, Kinalska I. IA-2 and anti-GAD antibodies in patients with newly diagnosed type 1 diabetes and their first degree relatives. *Przegl Lek.* 2000;57(3):143-146.
329. Krinninger P, Ensenauer R, Ehlers K, Rauh K, Stoll J, Krauss-Etschmann S, Hauner H, Laumen H. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):2500-2509.
330. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK: Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409:198-201.
331. Kuglin B, Gries FA, Kolb H. Evidence of IgG autoantibodies against human proinsulin in patients with IDDM before insulin treatment. *Diabetes* 1988;37(1):130-2.
332. Kuwahata S, Fujita S, Orihara K, Hamasaki S, Oba R, Hirai H, Nagata K, Ishida S, Kataoka T, Oketani N, Ichiki H, Iriki Y, Saihara K, Okui H, Ninomiya Y, Tei C. High expression level of Toll-like receptor 2 on monocytes is an important risk factor for arteriosclerotic disease. *Atherosclerosis.* 2010;209(1):248-254.
333. Kuzmicki M, Telejko B, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Lipinska D, Pliszka J, Wilk J, Zielinska, A, Skibicka, J, Szamatowicz, J. and Kretowski, A. The expression of genes involved in NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with gestational diabetes. *Eur J Endocrin.* 2013;168:419-427.
334. Labrum R, Bevan S, Sitzler M, Lorenz M, Markus HS. Toll receptor polymorphisms and carotid artery intima-media thickness. *Stroke.* 2007;38(4):1179-1184.
335. Lampasona V, Petrone A, Tiberti C, Capizzi M, Spoletini M, di Pietro S, Songini M, Bonicchio S, Giorgino F, Bonifacio E, Bosi E, Buzzetti R; Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study Group. Zinc Transporter 8 Antibodies Complement GAD and IA-2 Antibodies in the Identification and Characterization of Adult-Onset Autoimmune Diabetes. *Diabetes Care.* 2010;33:104-108.
336. Lampasona V, Schlosser M, Mueller PW, Williams AJ, Wenzlau JM, Hutton JC, Achenbach P. Diabetes antibody standardization program: first proficiency evaluation of assays for autoantibodies to zinc transporter 8. *Clin Chem.* 2011;57(12):1693-702.
337. Landman RE, Puder JJ, Xiao E, Freda PU, Ferin M, Wardlaw SL. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(3):1285-91.
338. Langjahr, P., Díaz-Jiménez, D., De la Fuente, M., Rubio, E., Golenbock, D., Bronfman, F. C. Hermoso, M. A. Metalloproteinase-Dependent TLR2 Ectodomain Shedding is involved in Soluble Toll-Like Receptor 2 (sTLR2) Production. *PLoS ONE.* 2014;9: e104624.
339. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Ehlers JA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1663-1668.
340. Laugesen E, Østergaard JA, Leslie RDG. Latent autoimmune diabetes of the adult: current knowledge and uncertainty. *Diabetic Medicine.* 2015;32(7):843-852.
341. Lauterbach MAR, Wunderlich FT. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflugers Archiv.* 2017;469(3):385-396.
342. Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res.* 2005;36(3):197-209.
343. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, Griffin GE, Ferrara P, Schiffrin EJ, Morgan BP, Labéta MO. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol.* 2003;171:6680-6689.
344. Lebrun, P, Van Obberghen E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol. (Oxf.)* 2008; 192, 29-36.
345. Lee JY, Plakidas A, Lee WH, Heikkinen A, Chanmugam P, Bray G, Hwang DH. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res.* 2003;44: 479-486.
346. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001;276: 16683-16689.

347. Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, Lee WH, Fitzgerald KA, Hwang DH. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem.* 2004;279: 16971–16979.
348. Lee SA, Lee WJ, Kim EH, Yu JH, Jung CH, Koh EH, Kim MS, Park JY, Lee KU. Progression to insulin deficiency in Korean patients with Type 2 diabetes mellitus positive for anti-GAD antibody. *Diabet Med.* 2011;28(3):319-24.
349. Lee YS, Jun HS. Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:3094642.
350. Lendrum R, Walker G, Cudworth AG, Theophanides C, Pyke DA, Bloom A, Gamble DR. Islet cell antibodies in diabetes mellitus. *Lancet.* 1976; 2:1273–1276.
351. Lendrum R, Walker G, Cudworth AG, Theophanides C, Pyke DA, Bloom A, Gamble DR. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus. *Lancet.* 1976;2:1273-1276.
352. Lenin R, Sankaramoorthy A, Mohan V, Balasubramanyam M. Altered immunometabolism at the interface of increased endoplasmic reticulum (ER) stress in patients with type 2 diabetes. *J Leukoc Biol.* 2015;98(4):615-22.
353. Leslie RD, Kolb H, Schloot NC, Buzzetti R, Mauricio D, De Leiva A, Yderstraede K, Sarti C, Thivolet C, Hadden D, Hunter S, Scherthaner G, Scherbaum W, Williams R, Pozzilli P. Diabetes classification: grey zones, sound and smoke: Action LADA 1. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24(7):511-9.
354. Levy AP, Purushothaman KR, Levy NS, Purushothaman M, Strauss M, Asleh R, Marsh S, Cohen O, Moestrup SK, Moller HJ, Zias EA, Benhayon D, Fuster V, Moreno PR. Downregulation of the hemoglobin scavenger receptor in individuals with diabetes and the Hp 2-2 genotype: implications for the response to intraplaque hemorrhage and plaque vulnerability. *Circulation Research.* 2007;101:106-110.
355. Lévy-Marchal C, Dubois F, Noël M, Tichet J, Czernichow P. Immunogenetic determinants and prediction of IDDM in French schoolchildren. *Diabetes.* 1995;44(9):1029-32.
356. Li H, Sun B. Toll-like receptor 4 in atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2007;11(1):88-95.
357. Li S, Xie X, Song Y, Jiang H, Wu X, Su X, Yang L, Li M. Association of TLR4 (896A/G and 1196C/T) Gene Polymorphisms with Asthma Risk: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit.* 2015; 21:3591-9.
358. Li X, Huang G, Yan X, Yang L, Zhou ZG. Relation between insulin resistance and glutamic acid decarboxylase antibody titers in latent autoimmune diabetes in adults. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010;30(6):1247-9.
359. Li X, Zhu J, Liu N, Liu J, Zhang Z. TNF-Alpha in Peripheral Neuropathy Patients with Impaired Glucose Regulation. *J Diabetes Res.* 2017;2017:7024024.
360. Li Y, Lee PY, Sobel ES, Narain S, Satoh M, Segal MS, Reeves WH, Richards HB. Increased expression of FcγRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(1):R6.
361. Li ZZ, Liu JB, Li L, Jiao L, Chen L. Intensive therapy for diabetes through influence on innate immune system. *Med Hypotheses.* 2009;72(6):675-6.
362. Liang S, Wang M, Tapping RI, Stepensky V, Nawar HF, Triantafilou M, Triantafilou K, Connell TD, Hajishengallis G. Ganglioside GD1a is an essential coreceptor for toll-like receptor 2 signaling in response to the B subunit of type IIb enterotoxin. *J. Biol. Chem.* 2007; 282, 7532–7542.
363. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868–74.
364. Lieb DC, Parson HK, Mamikunian G, Vinik AI. Cardiac autonomic imbalance in newly diagnosed and established diabetes is associated with markers of adipose tissue inflammation. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:878760.
365. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:446–458.
366. Lin L, Park S, Lakatta EG. RAGE signaling in inflammation and arterial aging. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2009;14:1403-1413.
367. Lin M, Yiu WH, Wu HJ, Chan LYY, Leung JCK, Au WS, Chan KW, Lai KN, Tang SCW. Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23:86–102.
368. Littorin B, Sundkvist G, Hagopian W, Landin-Olsson M, Lernmark A, Ostman J, Arnqvist HJ, Blohmé G, Bolinder J, Eriksson JW, Lithner F, Scherstén B, Wibell L. Islet cell and glutamic acid decarboxylase antibodies present at diagnosis of diabetes predict the need for insulin treatment. A cohort study in young

- adults whose disease was initially labeled as type 2 or unclassifiable diabetes. *Diabetes Care*. 1999;22(3):409-12.
369. Liu F, Lu W, Qian Q, Qi W, Hu J, Feng B. Frequency of TLR 2, 4, and 9 gene polymorphisms in Chinese population and their susceptibility to type 2 diabetes and coronary artery disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:373945.
 370. Liu LF, Craig CM, Tolentino LL, Choi O, Morton J, Rivas H, Cushman SW, Engleman EG, McLaughlin T. Adipose tissue macrophages impair preadipocyte differentiation in humans. *PLoS One*. 2017; 12(2): e0170728.
 371. Liu L, Li X, Xiang Y, Huang G, Lin J, Yang L, Zhao Y, Yang Z, Hou C, Li Y, Liu J, Zhu D, Leslie RD, Wang X, Zhou Z; LADA China Study Group. Latent autoimmune diabetes in adults with low-titer GAD antibodies: similar disease progression with type 2 diabetes: a nationwide, multicenter prospective study (LADA China Study 3). *Diabetes Care*. 2015;38(1):16-21.
 372. Lohmann T, Kellner K, Verlohren HJ, Krug J, Steindorf J, Scherbaum WA, Seissler J. Titre and combination of ICA and autoantibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate two clinically distinct types of latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Diabetologia*. 2001;44(8):1005-10.
 373. Long H, O'Connor BP, Zemans RL, Zhou X, Yang IV, Schwartz DA. The Toll-Like Receptor 4 Polymorphism Asp299Gly but Not Thr399Ile Influences TLR4 Signaling and Function. *Heimesaat MM, ed. PLoS ONE*. 2014;9(4):e93550.
 374. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998; 394:897-901.
 375. Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, Maclaren NK, Notkins AL, Lan MS. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 19;93(6):2307-11.
 376. Lu J, Marjon KD, Mold C, Clos TWD, Sun PD. Pentraxins and Fc receptors. *Immunological reviews*. 2012;250(1):230-238.
 377. Ludovico O, Pellegrini F, Di Paola R, Minenna A, Mastroianno S, Cardellini M, Marini MA, Andreozzi F, Vaccaro O, Sesti G, Trischitta V. Heterogeneous effect of peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 Ala12 variant on type 2 diabetes risk. *Obesity*. 2007;15(5):1076-1081.
 378. Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2005;8:161-171.
 379. Lukacs K, Hosszufalusi N, Dinya E, Bakacs M, Madacsy L, Panczel P. The type 2 diabetes-associated variant in TCF7L2 is associated with latent autoimmune diabetes in adult Europeans and the gene effect is modified by obesity: a meta-analysis and an individual study. *Diabetologia*. 2012;55(3):689-693.
 380. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(1):175-184.
 381. Ma J, Li Y, Zhou F, Xu X, Guo G, Qu Y. Meta-analysis of association between the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene and diabetic retinopathy in Caucasians and Asians. *Molecular Vision*. 2012;18:2352-2360.
 382. Ma J, Wu H, Zhao CY, Panchapakesan U, Pollock C, Chadban SJ. Requirement for TLR2 in the development of albuminuria, inflammation and fibrosis in experimental diabetic nephropathy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2014;7(2):481-495.
 383. Maclaren N, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, Clare-Salzer M, She JX, Malone J, Crockett S, Schwartz S, Quattrin T, DeSilva M, Vander Vegt P, Notkins A, Krischer J. Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives. *J Autoimmun*. 1999;12(4):279-287.
 384. Macleod CM, Avery OT. The Occurrence during Acute Infections of a Protein Not Normally Present in the Blood: Ii. Isolation and Properties of the Reactive Protein. *J Exp Med*. 1941;73:183-190.
 385. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;110(6):851-860.
 386. Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas-receptor in human islets. *Diabetes*. 2001; 50: 1683-1690.

387. Maioli M, Pes GM, Delitala G, Puddu L, Falorni A, Tolu F, Lampis R, Orrù V, Secchi G, Cicalò AM, Floris R, Madau GF, Pilosu RM, Whalen M, Cucca F. Number of autoantibodies and HLA genotype, more than high titers of glutamic acid decarboxylase autoantibodies, predict insulin dependence in latent autoimmune diabetes of adults. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(4):541-9.
388. Makdissi A, Ghanim H, Vora M, Green K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, Dhindsa S, Dandona P. Sitagliptin exerts an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):3333-41.
389. Maldonado-Bernal C, Trejo-de la O A, Sánchez-Contreras ME, Wachter-Rodarte N, Torres J, Cruz M. Low frequency of Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in Mexican patients and their association with type 2 diabetes. *Int J Immunogenet*. 2011;38(6):519-23.
390. Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Tiaka EK, Sidiropoulos A, Gerovassili A, Satra M, Vamvakopoulou D, Tsiopoulos F, Papanas N, Skoularigis I, Potamianos SP, Vamvakopoulos N. TLR4 gene polymorphisms: evidence for protection against type 2 diabetes but not for diabetes-associated ischaemic heart disease. *Eur J Endocrinol*. 2011;165(2):261-7.
391. Manolopoulos KN, Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *International journal of Obesity*. 2010; 34:949-959.
392. Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1592:265–280.
393. Marshall MO, Hoyer PE, Petersen JS, Hejnaes KR, Genovese S, Dyrberg T, Bottazzo GF: Contribution of glutamate decarboxylase antibodies to the reactivity of islet cell cytoplasmic antibodies. *J Autoimmun*. 1994; 7:497–508.
394. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, Becker C, Franchi L, Yoshihara E, Chen Z, Mullooly N, Mielke LA, Harris J, Coll RC, Mills KH, Mok KH, Newsholme P, Nuñez G, Yodoi J, Kahn SE, Lavelle EC, O'Neill LA. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat Immunol*. 2010;11(10):897-904.
395. Masud S, Ye S. Effect of the peroxisome proliferator activated receptor- γ gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. *J Med Genet*. 2003; 40(10):773–780.
396. Mattevi VS, Zembrzski VM, Hutz MH. Effects of a PPAR γ gene variant on obesity characteristics in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2007, 40(7):927-932.
397. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM.; Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 10:4:52.
398. McCarthy CG, Goulopoulou S, Wenceslau CF, Spitler K, Matsumoto T, Webb RC. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2014;306(2):H184-H196
399. McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, Oliver E, Claessens M, Mills KH, Roche HM. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes*. 2011;60:1688–1698.
400. McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, Lamendola C, Reaven GM, Cushman SW. Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia*. 2007;50(8):1707-1715.
401. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
402. Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE, Manson JE, De Vivo I, Willett WC, Hunter DJ. Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor γ gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Human Molecular Genetics*. 2003;12(22):2923–2929.
403. Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation*. 2005;111(20):2654-61.
404. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2006; 58(4):726-741.

405. Milewicz A, Tworowska-Bardzińska U, Dunajska K, Jędrzejuk D, Lwow F. Relationship of PPARgamma2 polymorphism with obesity and metabolic syndrome in postmenopausal Polish women. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009;117(10):628-32.
406. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1998; 16: 1215.
407. Min D, Brooks B, Wong J, Aamidor S, Seehoo R, Sutanto S, Harrisberg B, Yue DK, Twigg SM, McLennan SV: Monocyte CD163 is altered in association with diabetic complications: possible protective role. *J Leukoc Biol* 2016;100:1375-1383.
408. Mirzaei H, Akrami SM, Golmohammadi T, Doosti M, Heshmat R, Nakhjavani M, Amiri P. Polymorphism of Pro12Ala in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene in Iranian diabetic and obese subjects. *Metab Syndr Relat Disord*. 2009;7(5):453-8.
409. Mishra R, Chesi A, Cousminer DL, Hawa MI, Bradfield JP, Hodge KM, Guy VC, Hakonarson H; Bone Mineral Density in Childhood Study, Mauricio D, Schloot N, Yderstræde KB, Voight BF, Schwartz S, Boehm BO, Leslie RD, Grant SFA. Relative contribution of type 1 and type 2 diabetes loci to the genetic etiology of adult-onset, non-insulin-requiring autoimmune diabetes. *BMC Medicine*. 2017;15:88.
410. Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, Stegemann MS, Eckert J, Oh NR, Otchwemah RN, Dietz E, Ehrhardt S, Schröder NW, Bienzle U, Schumann RR. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(1):177-182.
411. Moestrup SK, Møller HJ: CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med* 2004; 36:347-354.
412. Mogensen TH. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin. Microbiol. Rev* 2009;22(2):240-273.
413. Moller HJ, Frikke-Schmidt R, Moestrup SK, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A: Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clin Chem*. 2011; 57:291-297.
414. Mollo A, Hernandez M, Marsal JR, Esquerda A, Rius F, Blanco-Vaca F, Verdaguer J, Pozzilli P, de Leiva A, Mauricio D; Action LADA 8. Latent autoimmune diabetes in adults is perched between type 1 and type 2: evidence from adults in one region of Spain. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013;29(6):446-451.
415. Monaco C, Gregan SM, Navin TJ, Foxwell BM, Davies AH, Feldmann M. Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation*. 2009;120(24):2462-2469.
416. Montane J, Cadavez L, Novials A. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2014;7:25-34.
417. Morinaga H, Mayoral R, Heinrichsdorff J, Osborn O, Franck N, Hah N, Walenta E, Bandyopadhyay G, Pessentheiner AR, Chi TJ, Chung H, Bogner-Strauss JG, Evans RM, Olefsky JM, Oh DY. Characterization of Distinct Subpopulations of Hepatic Macrophages in HFD/Obese Mice. *Diabetes*. 2015;64(4):1120-1130.
418. Morini E, Tassi V, Capponi D, Ludovico O, Dallapiccola B, Trischitta V, Prudente S. Interaction between PPARgamma2 variants and gender on the modulation of body weight. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(6):1467-1470.
419. Moschen AR, Molnar C, Enrich B, Geiger S, Ebenbichler CF, Tilg H. Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. *Mol Med*. 2011;17(7-8):840-845.
420. Mu ZP, Wang YG, Li CQ, Lv WS, Wang B, Jing ZH, Song XJ, Lun Y, Qiu MY, Ma XL. Association Between Tumor Necrosis Factor- α and Diabetic Peripheral Neuropathy in Patients with Type 2 Diabetes: a Meta-Analysis. *Mol Neurobiol*. 2017;54(2):983-996.
421. Mullick AE, Soldau K, Kiosses WB, Bell TA 3rd, Tobias PS, Curtiss LK. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med*. 2008;205(2):373-383.
422. Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J. Clin. Invest*. 2005;115:3149-3156.
423. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204(12):3037-3047.
424. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S233-242.

425. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(1):53-72.
426. Narendran P, Estella E, Furlanos S. Immunology of type 1 diabetes. *QJM.* 2005;98(8):547-556.
427. Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, Zinman B, ADA. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care.* 2007; 30(3):753-759.
428. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes.* 1979;28(12):1039-1057.
429. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4986790.
430. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4986791
431. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801282
432. Netea MG, Hijmans A, van Wissen S, Smilde TJ, Trip MD, Kullberg BJ, de Boo T, Van der Meer JW, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest.* 2004;34(2):94-99.
433. Nikolova M, Kiperova B, Djerassi R, Andreev E, Bogov B, Tzekova D, Baleva M, Hristov V, Manolov D, Kamenov Z, Todorov T, Vlahov I. Immunological Phenomena in Patients with Diabetic Nephropathy. *BANTAO Journal.* 2004; 2 (1):22-24
434. Nilsen NJ, Vladimer GI, Stenvik J, Orning MP, Zeid-Kilani MV, Bugge M, Bergstroem B, Conlon J, Husebye H, Hise AG, Fitzgerald KA, Espevik T, Lien E. A Role for the Adaptor Proteins TRAM and TRIF in Toll-like Receptor 2 Signaling. *The Journal of Biological Chemistry.* 2015; 290(6):3209-3222.
435. Noreen M, Shah MA, Mall SM, Choudhary S, Hussain T, Ahmed I, Jalil SF, Raza MI. TLR4 polymorphisms and disease susceptibility. *Inflamm Res.* 2012; 61: 177-188.
436. Notkins AL, Lernmark Åke. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *Journal of Clinical Investigation.* 2001;108(9):1247-1252.
437. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity.* 1999;10:127-136.
438. Obstfeld AE, Sogari E, Thearle M, Francisco AM, Gayet C, Ginsberg HN, Ables EV, Ferrante AW Jr. C-C Chemokine Receptor 2 (CCR2) Regulates the Hepatic Recruitment of Myeloid Cells That Promote Obesity-Induced Hepatic Steatosis. *Diabetes.* 2010;59(4):916-925.
439. Ochoa MC, Marti A, Azcona C, Chueca M, Oyarzábal M, Pelach R, Patiño A, Moreno-Aliaga MJ, Martínez-González MA, Martínez JA. Gene-gene interaction between PPAR γ 2 and ADR β 3 increases obesity risk in children and adolescents. *International Journal of Obesity.* 2004;28(supplement 3):S37-S41.
440. Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R. Effects of an engineered human anti-TNF- α antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 1996;45:881-885.
441. Ogihara T, Mirmira RG. An islet in distress: β cell failure in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes Investigation.* 2010;1(4):123-133.
442. Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, Bae EJ, Olefsky JM. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes.* 2012 Feb;61(2):346-54.
443. Oh K-J, Lee DS, Kim WK, Han BS, Lee SC, Bae K-H. Metabolic Adaptation in Obesity and Type II Diabetes: Myokines, Adipokines and Hepatokines. Cai L, ed. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017;18(1):8.
444. Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T. Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *J Biol Chem.* 2012 Nov 23;287(48):40611-7.
445. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology.* 2012;3:79.
446. Orban T, Sosenko JM, Cuthbertson D, Krischer JP, Skyler JS, Jackson R, Yu L, Palmer JP, Schatz D, Eisenbarth G; Diabetes Prevention Trial-Type 1 Study Group. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care.* 2009;32(12):2269-2274.
447. Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, Di Biase S, Labella D, Russo T, Savastano S, Zullo F, Colao A, Vettor R, Lombardi G. Lack of an association between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene Pro12Ala polymorphism and adiponectin levels in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(10):5110-5115.

448. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85-97.
449. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004;306(5695):457-461.
450. Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, Ray S, Majumdar SS, Bhattacharya S. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med.* 2012;18(8):1279-1285.
451. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science (Wash DC)* 1983;222:1337-1339.
452. Palmer JP, Hirsch IB. What's in a Name: Latent autoimmune diabetes of adults, type 1.5, adult-onset, and type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26(2): 536-538.
453. Pánczél P, Hosszúfalusi N, Bornemisza B, Horváth L, Jánoskúti L, Füst G, Rajczy K, Vataj A, Prohászka Z, Madácsy L, Luczay A, Blatniczky L, Halmos T, Körner A, Szilvási I, Romics L. Latent autoimmune diabetes in adults(LADA): part of the clinical spectrum of type-1 diabetes mellitus of autoimmune origin. *Orv Hetil.* 2001;142(46):2571-2578.
454. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine.* 2013;45(12):e66.
455. Park YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Experimental & Molecular Medicine.* 2014;46:e99.
456. Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* 2009;119:136-45.
457. Parkner T, Sørensen LP, Nielsen AR, Fischer CP, Bibby BM, Nielsen S, Pedersen BK, Møller HJ. Soluble CD163: a biomarker linking macrophages and insulin resistance. *Diabetologia* 2012; 55:1856-1862.
458. Passini N, Larigan JD, Genovese S, Appella E, Sinigaglia F, Rogge L. The 37/40-kilodalton autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus is the putative tyrosine phosphatase IA-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(20):9412-6.
459. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989; 74:2527-2534.
460. Patel JV, Banerjee A, Montoro-Garcia S, Shantsila E, Alam M, Flinders P, Houlton KA, Hughes EA, Lip GY, Gill PS. CD36 expression and lipid metabolism following an oral glucose challenge in South Asians. *World J Diabetes* 2015;6: 983-989.
461. Pedersen BK. IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov;35(Pt 5):1295-1297.
462. Pedersen BK. Muscles and their myokines. *J Exp Biol.* 2011 Jan 15;214(Pt 2):337-346.
463. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1379-1406.
464. Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L, NEDCOM, the Netherlands Epidemiology and Demography Compression of Morbidity Research Group. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med.* 2003;138(1):24-32.
465. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *Journal of Clinical Investigation.* 2003;111(12):1805-1812.
466. Pfützner A, Marx N, Lübber G, Langenfeld M, Walcher D, Konrad T, Forst T. Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from glycemic control: results from the pioneer study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(12):1925-1931.
467. Pham MN, Hawa MI, Pflieger C, Roden M, Scherthaner G, Pozzilli P, Buzzetti R, Scherbaum WA, Seissler J, Kolb H, Hunter S, Leslie RD, Schloot NC; Action LADA Study Group. Pro- and anti-inflammatory cytokines in latent autoimmune diabetes in adults, type 1 and type 2 diabetes patients: Action LADA 4. *Diabetologia.* 2011;54(7):1630-1638.
468. Pham MN, Hawa MI, Roden M, Scherthaner G, Pozzilli P, Buzzetti R, Scherbaum WA, Seissler J, Hunter S, Leslie RD, Kolb H, Schloot NC; Action LADA Study Group. Increased serum concentrations of adhesion molecules but not of chemokines in patients with Type 2 diabetes compared with patients with Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adult age: action LADA 5. *Diabet Med.* 2012;29(4):470-478.
469. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, Landis RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-

- macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res* 2004; 94:119-126.
470. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*.1997;40:1286-1292.
 471. Pisabarro RE, Sanguinetti C, Stoll M, Prendez D. High incidence of type 2 diabetes in peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 Pro12Ala carriers exposed to a high chronic intake of trans fatty acids and saturated fatty acids. *Diabetes Care*. 2004;27(9):2251–2252.
 472. Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M, Schulze MB, Overvad K, van der Schouw YT, Spencer E, Moons KG, Tjønneland A, Halkjaer J, Jensen MK, Stegger J, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Chajes V, Linseisen J, Kaaks R, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Bamia C, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, May AM, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Hallmans G, Weinehall L, Manjer J, Hedblad B, Lund E, Agudo A, Arriola L, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quirós JR, Key T, Bingham S, Khaw KT, Boffetta P, Jenab M, Ferrari P, Riboli E. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med*. 2008;359(20):2105-2120.
 473. Piya MK, McTernan PG, Kumar S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J Endocrinol*. 2013;216(1):T1-T15.
 474. Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, Knauf C, Peiretti F, Verdier M, Juhan-Vague I, Tanti JF, Burcelin R, Alessi MC. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia*. 2007;50(6):1267-1276.
 475. Poitou C, Dalmás E, Renovato M, Benhamo V, Hajduch F, Abdennour M, Kahn JF, Veyrie N, Rizkalla S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Clement K, Cremer I. CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺ CD16⁺ monocytes in obesity and during weight loss: relationships with fat mass and subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2322–2330.
 476. Poulain-Godefroy O, Froguel P. Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356(3):662-7.
 477. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286:327–334.
 478. Poltorak, A., He, X., Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in Tlr4 gene. *Science*. 1998; 282: 2085–2088.
 479. Pontiroli AE, Calderara A, Maffi P, Bonisoli L, Carenini A, Piatti PM, Monti LD, Gallus G, Pozza G, Illeni MT. Secondary failure to oral hypoglycaemic agents in non-obese patients with non-insulin-dependent diabetes is related to reduced insulin release. *Diabete Metab*. 1989;15(2):79-84.
 480. Prieur X, Mok CY, Velagapudi VR, Núñez V, Fuentes L, Montaner D, Ishikawa K, Camacho A, Barbarroja N, O'Rahilly S, Sethi JK, Dopazo J, Orešič M, Ricote M, Vidal-Puig A. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes*. 2011;60(3):797-809.
 481. Prohinar P, Rallabhandi P, Weiss JP, Gioannini TL. Expression of Functional D299G.T399I Polymorphic Variant of TLR4 Depends More on Coexpression of MD-2 Than Does Wild-Type TLR4. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(8):4362-4367.
 482. Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A. Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther*, 2005; 7:R817-824.
 483. Purves T, Middlemas A, Agthong S, Jude EB, Boulton AJ, Fernyhough P, Tomlinson DR. A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J*. 2001 Nov;15(13):2508-14.
 484. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*. 2007 ;21(12):1443-1455.
 485. Qureshi, ST, Larivière L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med*. 1999; 189, 615–625.
 486. Rabin DU, Pleasic SM, Palmer-Crocker R, Shapiro JA. Cloning and expression of IDDM-specific human autoantigens. *Diabetes* 1992;41(2):183–186.

487. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PM. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases *J Immunol.* 1994;152(6):3183-3188.
488. Raby AC, Le Bouder E, Colmont C, Davies J, Richards P, Coles B, George CH, Jones SA, Brennan P, Topley N, Labéta MO. Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering. *J Immunol.* 2009;183:506-517.
489. Radha V, Vimalaswaran KS, Babu S, Deepa R, Anjana M, Ghosh S, Majumder PP, Rao MR, Mohan V. Lack of association between serum adiponectin levels and the Pro12Ala polymorphism in Asian Indians. *Diabet Med.* 2007;24(4):398-402.
490. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.
491. Rajamani U, Jialal I. Hyperglycemia Induces Toll-Like Receptor-2 and -4 Expression and Activity in Human Microvascular Retinal Endothelial Cells: Implications for Diabetic Retinopathy. *Journal of Diabetes Research.* 2014;2014:790902.
492. Rallabhandi P, Bell J, Boukhvalova MS, Medvedev A, Lorenz E, Arditi M, Hemming VG, Blanco JC, Segal DM, Vogel SN. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol.* 2006;177:322-332.
493. Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A.(1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789.
494. Ratner RE; Diabetes Prevention Program Research. An update on the Diabetes Prevention Program. *Endocr Pract.* 2006;12 Suppl 1:20-24.
495. Redondo MJ. LADA: Time for a New Definition. *Diabetes.* 2013;62: 339-340.
496. Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, Meka CS, Eagan P, Jenkinson CP, Cersosimo E, Defronzo RA, Coletta DK, Sriwijitkamol A, Musi N. Elevated Toll-Like Receptor 4 Expression and Signaling in Muscle From Insulin-Resistant Subjects. *Diabetes.* 2008;57(10):2595-2602.
497. Reynolds CM, McGillicuddy FC, Harford KA, Finucane OM, Mills KH, Roche HM. Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(8):1212-22.
498. Rich SS, French LR, Sprafka JM, Clements JP, Goetz FC. HLA-associated susceptibility to type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the Wadena City Health Study. *Diabetologia.* 1993; 36:234-238.
499. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 1998; 391(6662):79-82.
500. Ridker PM. C-reactive protein: eighty years from discovery to emergence as a major risk marker for cardiovascular disease. *Clin Chem.* 2009;55:209-15.
501. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N. Engl. J. Med.* 2000;342:836-843.
502. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, Spillar RP, Silverstein JH, Schatz DA, Schwartz S, Malone J, Shah S, Vadheim C, et al. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med.* 1990;323(17):1167-72.
503. Rivero A, Mora C, Muros M, Garcia J, Herrera H, Navarro-Gonzalez JF. Pathogenic perspective for the role of inflammation in diabetic nephropathy. *Clin Sci.* 2009; 116: 479-492.
504. Robinson MW, Harmon C, O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol.* 2016;13:267-276.
505. Rodriguez A, Durán A, Selloum M, Champy MF, Diez-Guerra FJ, Flores JM, Serrano M, Auwerx J, Diaz-Meco MT, Moscat J. Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab.* 2006;3(3):211-22.
506. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, Große-Dunker G, Heisel I, Hornof F, Jeken J, Rebling NM, Ulrich C, Scheller B, Böhm M, Fliser D, Heine GH. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60(16):1512-20.
507. Rogacev KS, Ulrich C, Blomer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, Cremers B, Grenner Y, Geisel J, Schlitt A, Kohler H, Fliser D, Girndt M, Heine GH. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2010;31:369-376.
508. Rogacev KS, Zawada AM, Emrich I, Seiler S, Bohm M, Fliser D, Woollard KJ, Heine GH. Lower Apo a-I and lower HDL-C levels Are associated with higher intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte counts that predict cardiovascular events in chronic kidney disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:2120-2127.

509. Rolandsson O, Hampe CS, Wennberg P, Radtke J, Langenberg C, Wareham N. Prevalence and Regional Distribution of Autoantibodies Against GAD65Ab in a European Population Without Diabetes: The EPIC-InterAct Study. *Diabetes Care*. 2015;38(8):e114-e115.
510. Rolandsson O, Palmer JP. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) is dead: long live autoimmune diabetes! *Diabetologia*. 2010;53(7):1250-3.
511. Rosário PW, Reis JS, Fagundes TA, Calsolari MR, Amim R, Silva SC, Purisch S. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA): usefulness of anti-GAD antibody titers and benefit of early insulinization. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007; 51(1):52-8.
512. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular Cell*. 1999;4(4):611–61.
513. Rothe G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stohr J, Kindermann W, Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1437–1447.
514. Rothe G, Herr AS, Stohr J, Abletshauer C, Weidinger G, Schmitz G. A more mature phenotype of blood mononuclear phagocytes is induced by fluvastatin treatment in hypercholesterolemic patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 1999;144:251–261.
515. Rudofsky G Jr, Reismann P, Witte S, Humpert PM, Isermann B, Chavakis T, Tafel J, Nosikov VV, Hamann A, Nawroth P, Bierhaus A. Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(1):179-83.
516. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):42394-8.
517. Ruige JB, Batstra MR, Aanstoot HJ, Bouter LM, Bruining GJ, De Neeling JN, Heine RJ. Low prevalence of antibodies to GAD65 in a 50- to 74-year-old general Dutch population. The Hoorn Study. *Diabetes Care*. 1997;20(7):1108-10.
518. Sage AT, Holtby-Ottenhof S, Shi Y, Damjanovic S, Sharma AM, Werstuck GH. Metabolic syndrome and acute hyperglycemia are associated with endoplasmic reticulum stress in human mononuclear cells. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20(4):748-55.
519. Saisho Y. Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;15(3):196-205.
520. Sampson MJ, Davies IR, Braschi S, Ivory K, Hughes DA. Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2003;167:129-34.
521. Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell. Immunol*. 1999; 194:6–11.
522. Sauter NS, Schulthess FT, Galasso R, Castellani LW, Maedler K. The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology*. 2008;149(5):2208-18.
523. Scazzocchio B, Vari R, D'Archivio M, Santangelo C, Filesi C, Giovannini C, Marsella R. Oxidized LDL impair adipocyte response to insulin by activating serine/threonine kinases. *Journal of Lipid Research*. 2009;50:832-45.
524. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. 2013;121(8):1276-1284.
525. Schatz D, Krischer J, Horne G, Riley W, Spillar R, Silverstein J, Winter W, Muir A, Derovanesian D, Shah S, et al. Islet cell antibodies predict insulin-dependent diabetes in United States school age children as powerfully as in unaffected relatives. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2403-7.
526. Schloot NC, Pham MN, Hawa MI, Pozzilli P, Scherbaum WA, Schott M, Kolb H, Hunter S, Scherthaner G, Thivolet C, Seissler J, Leslie RD; Action LADA Group. Inverse Relationship Between Organ-Specific Autoantibodies and Systemic Immune Mediators in Type 1 Diabetes and Type 2 Diabetes: Action LADA 11. *Diabetes Care*. 2016;39(11):1932-1939.
527. Schlosser M, Mueller PW, Törn C, Bonifacio E, Bingley PJ; Participating Laboratories. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for insulin autoantibodies. *Diabetologia*. 2010;53(12):2611-20.

528. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet*. 1999;353(9165):1649-52.
529. Schnare, M., Holt, A.C., Takeda, K., Akira, S., Medzhitov, R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr. Biol*. 2000; 10, 1139-1142.
530. Schneider J, Kreuzer J, Hamann A, Nawroth PP, Dugi KA. The proline 12 alanine substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with lower lipoprotein lipase activity in vivo. *Diabetes*. 2002;51(3):867-70.
531. Schoneveld AH, Hoefler I, Sluijter JP, Laman JD, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis*. 2008;197(1):95-104.
532. Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*. 2005;569(1-2):29-63.
533. Schumann RR. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res Immunol*. 1992;143(1):11-5.
534. Seissler J, de Sonnaville JJ, Morgenthaler NG, Steinbrenner H, Glawe D, Khoo-Morgenthaler UY, Lan MS, Notkins AL, Heine RJ, Scherbaum WA. Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. *Diabetologia*. 1998;41(8):891-7.
535. Sephiri Z, Kiani Z, Nasiri AA, Kohan F. Toll-like receptor 2 and type 2 diabetes. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2016;21:2.
536. Shakeri-Manesch S, Zeyda M, Huber J, Ludvik B, Prager G, Stulnig TM: Diminished upregulation of visceral adipose heme oxygenase-1 correlates with waist-to-hip ratio and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2009; 33:1257-1264.
537. Shaw MH, Reimer T, Kim Y-G, Nuñez G. NOD-like Receptors (NLRs): Bona Fide Intracellular Microbial Sensors. *Current opinion in immunology*. 2008;20(4):377-382.
538. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3015-25.
539. Shi W, Haberland ME, Jien ML, Shih DM, Luscis AJ. Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2000;102:75-81.
540. Shimazu R., Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *J. Exp. Med*. 1999; 189: 1777-1782.
541. Shulman, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest*. 2000; 106:171-176.
542. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett*. 2010; 4584(15):3242-9.
543. Simón I, Vendrell J, Gutiérrez C, Fernández-Real JM, Vendrell I, Gallart L, Fontova R, Richart C. Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is associated with increased leptin levels in women with type-2 diabetes mellitus. *Horm Res*. 2002;58(3):143-9.
544. Singh U, Dasu MR, Yancey PG, Afify A, Devaraj S, Jialal I. Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats. *J Lipid Res*. 2008;49:1015-1023.
545. Singh K, Kant S, Singh VK, Agrawal NK, Gupta SK, Singh K. Toll-like receptor 4 polymorphisms and their haplotypes modulate the risk of developing diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Molecular Vision*. 2014;20:704-713.
546. Siraj ES, Gupta MK, Yifter H, Ahmed A, Kebede T, Reja A, Abdulkadir J. Islet cell-associated autoantibodies in Ethiopians with diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2016;30(6):1039-42.
547. Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol*. 2008;67(2):152-9.
548. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):1023-33.
549. Skurk T, Kolb H, Muller-Scholze S, Rohrig K, Hauner H, Herder C. The proatherogenic cytokine interleukin-18 is secreted by human adipocytes. *Eur J Endocrinol*. 2005;152:863-868.
550. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshzhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445(7130):881-5.

551. Sloan-Lancaster J, Abu-Raddad E, Polzer J, Miller JW, Scherer JC, De Gaetano A, Berg JK, Landschulz WH. Double-blind, randomized study evaluating the glycemic and anti-inflammatory effects of subcutaneous LY2189102, a neutralizing IL-1b antibody, in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36:2239 – 2246.
552. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2001;167(5):2887-94.
553. Smirnova I, Hamblin MT, McBride C, Beutler B, Di RA. Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics*. 2001; 158:1657-64.
554. Solimena M, Folli F, Denis-Donini S, Comi GC, Pozza G, De Camilli P, Vicari AM. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1988;318(16):1012-20.
555. Sonnet E, Maugeudre D, Maréchaud R, Rohmer V, Sai P, Charbonnel B. Clinical and metabolic characteristics of patients with latent autoimmune diabetes in adults (LADA): absence of rapid beta-cell loss in patients with tight metabolic control. *Diabetes Metab*. 2010;36(1):64-70.
556. Sørensen LP, Parkner T, Søndergaard E, Bibby BM, Møller HJ, Nielsen S. Visceral obesity is associated with increased soluble CD163 concentration in men with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Connections*. 2015;4(1):27-36.
557. Sørgerd EP, Thorsby PM, Torjesen PA, Skorpen F, Kvaløy K, Grill V. Presence of anti-GAD in a non-diabetic population of adults; time dynamics and clinical influence: results from the HUNT study. *BMJ Open Diabetes Research & Care*. 2015;3(1):e000076.
558. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 1998;47:507–514.
559. Sporrer D, Weber M, Wanninger J, Weigert J, Neumeier M, Stögbauer F, Lieberer E, Bala M, Kopp A, Schäffler A, Buechler C. Adiponectin downregulates CD163 whose cellular and soluble forms are elevated in obesity. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(8):671-9.
560. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52 :812 – 817, 2003.
561. Srinivas PR, Wagner AS, Reddy LV, Deutsch DD, Leon MA, Goustin AS, Grunberger G. Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol Endocrinol*. 1993;7(11):1445-55.
562. Stack J, Doyle SL, Connolly DJ, Reinert LS, O'Keeffe KM, McLoughlin RM, Paludan SR, Bowie AG. TRAM is required for TLR2 endosomal signaling to type I IFN induction. *J Immunol*. 2014;193(12):6090-6102.
563. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*. 2005; 54(8):2460-2470.
564. Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clinical and Translational Medicine*. 2015;4:5.
565. Stanley TL, Zanni MV, Johnsen S, Rasheed S, Makimura H, Lee H, Khor VK, Ahima RS, Grinspoon SK. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E146 – E150.
566. Stefan N, Häring HU. The role of hepatokines in metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 Mar;9(3):144-52.
567. Stefanovic-Racic M, Yang X, Turner MS, Mantell BS, Stolz DB, Sumpter TL, Sipula IJ, Dedousis N, Scott DK, Morel PA, Thomson AW, O'Doherty RM. Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. *Diabetes*. 2012;61(9):2330-9.
568. Stefanski A, Majkowska L, Ciechanowicz A, Frankow M, Safranow K, Parczewski M, Pilarska K. Lack of association between the Pro12Ala polymorphism in PPAR-γ2 gene and body weight changes, insulin resistance and chronic diabetic complications in obese patients with type 2 diabetes. *Archives of Medical Research*. 2006;37(6):736–743.
569. Stenström G, Gottsäter A, Bakhtadze E, Berger B, Sundkvist G. Latent autoimmune diabetes in adults: definition, prevalence, beta-cell function, and treatment. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S68-72.

570. Steppel JH, Horton ES (2004) Beta-cell failure in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rep* 4:169–175.
571. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, Khoury JE, Golenbock DT, Moore KJ. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature immunology*. 2010;11(2):155-161.
572. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2010;12:593–605.
573. Stith R, Luo J. Endocrine and carbohydrate responses to interleukin-6 in vivo. *Circ. Shock*.1994;44:210-215.
574. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* 2007;82(2):244-252.
575. Streimish I, Bizzarro M, Northrup V, Wang C, Renna S, Koval N, Li FY, Ehrenkranz R, Rinder HM, Bhandari V. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker in neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31:777–781.
576. Stumvoll M, Stefan N, Fritsche A, Madaus A, Tschritter O, Koch M, Machicao F, Häring H. Interaction effect between common polymorphisms in PPAR γ 2 (Pro12Ala) and insulin receptor substrate 1 (Gly972Arg) on insulin sensitivity. *Journal of Molecular Medicine*. 2002;80(1):33–38.
577. Stumvoll M, Wahl HG, Löblein K, Becker R, Machicao F, Jacob S, Häring H. Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with increased antilipolytic insulin sensitivity. *Diabetes*. 2001;50(4):876-81.
578. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(6):2094-2101.
579. Sun Y, Scavini M, Orlando RA, Murata GH, Servilla KS, Tzamaloukas AH, Schrader R, Bedrick EJ, Burge MR, Abumrad NA, Zager PG. Increased CD36 expression signals monocyte activation among patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2010;33:2065-7.
580. Szepletowska B, Głębocka A, Puch U, Górska M, Szelachowska M. Latent autoimmune diabetes in adults in a population-based cohort of Polish patients with newly diagnosed diabetes mellitus. *Arch Med Sci*. 2012;8(3):491-495.
581. Szepletowska B, Moczulski D, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Grzeszczak W, Gorska M, Szelachowska M. Transcription factor 7-like 2-gene polymorphism is related to fasting C peptide in latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Acta Diabetol*. 2010;47(1):83-6.
582. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: A high-risk state for developing diabetes. *Lancet*. 2012; 379(9833): 2279–2290.
583. Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, Hayashizaki Y, Takasu T, Imamura M, Li Q, Tomiyama H, Kobayashi Y, Noda A, Sasamata M, Shibasaki M. Effects of SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation, and obesity in type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol*. 2013;715(1-3):246-55.
584. Tajik N, Keshavarz SA, Masoudkabar F, Djalali M, Sadrzadeh-Yeganeh HH, Eshraghian MR, Chamary M, Ahmadvand Z, Yazdani T, Javanbakht MH. Effect of diet-induced weight loss on inflammatory cytokines in obese women. *J Endocrinol Invest*. 2013;36(4):211-5.
585. Takeda H, Kawasaki E, Shimizu I, Konoue E, Fujiyama M, Murao S, Tanaka K, Mori K, Tarumi Y, Seto I, Fujii Y, Kato K, Kondo S, Takada Y, Kitsuki N, Kaino Y, Kida K, Hashimoto N, Yamane Y, Yamawaki T, Onuma H, Nishimiya T, Osawa H, Saito Y, Makino H; Ehime Study. Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of adult-onset diabetic patients with GAD autoantibodies in Japan (Ehime Study). *Diabetes Care*. 2002;25(6):995-1001.
586. Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells*. 2001;6(9):733-42.
587. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 2005;17(1): 1–14.
588. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999;11:443–51.
589. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S. Cutting Edge: Preferentially the R-stereoisomer of the Mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2

- activates immune cells through a Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* 2000; 164, 554–557.
590. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol.* 2002;169:10–4.
591. Tang J., Kern T. S. Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2011;30(5):343–358.
592. Tankova T, Dakovska L, Kirilov G, Koev D. Insulin secretion and anti-GAD65 antibodies in subjects with impaired glucose tolerance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109(7):355-60.
593. Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013 8;3:181.
594. Tanti, JF, Jager, J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009; 9: 753–762.
595. Tapp LD, Shantsila E, Wrigley BJ, Pamukcu B, Lip GY. The CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 2012;10(7):1231-1241.
596. Tarantino G, Savastano S, Colao A. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World J Gastroenterol.* 2010;16(38):4773-4783.
597. Tariq K, Malik SB, Ali SHB, Maqsood SE, Azam A, Muslim I, Khan MS, Azam M, Waheed NK, Qamar R. Association of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator activated receptor gamma with proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2013;19:710-717.
598. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995;83: 1263–1271.
599. Tarr J. M., Kaul K., Chopra M., Kohner E. M., Chibber R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmology.* 2013;2013:13.
600. Tehrani M, Varasteh A-R, Khakzad MR, Mirsadraee M, Sankian M. Decreased levels of soluble Toll-like Receptor 2 in patients with asthma. *Rep Biochem Mol Biol.* 2012; 1:30-36.
601. Temelkova-Kurktschiev T, Henkel E, Koelher C, Subclinical inflammation in newly detected type II diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetologia.* 2002; 45:151.
602. Ten Oever J, Kox, M, van de Veerdonk, FL, Mothapo, KM, Slavcovici A, Jansen TL, Lieke T, Giamarellos-Bourboulis EJ, Schneeberger PM, Wever PC, Stoffels M, Simo A, Van Der Meer JWM, Johnson MD, Kullberg BJ, Pickkers P, Pachot A, Joosten LAB, Netea MG. The discriminative capacity of soluble Toll-like receptor (sTLR)2 and sTLR4 in inflammatory diseases. *BMC Immunology.* 2014;15:55.
603. Tiberti C, Giordano C, Locatelli M, Bosi E, Bottazzo GF, Buzzetti R, Cucinotta D, Galluzzo A, Falorni A, Dotta F Identification of tyrosine phosphatase 2(256-760) construct as a new, sensitive marker for the detection of islet autoimmunity in type 2 diabetic patients: the non-insulin requiring autoimmune diabetes (NIRAD) study 2. *Diabetes.* 2008; 57:1276-1283.
604. Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.* 1930;52(4):561-71.
605. Timmerman KL, Flynn MG, Coen PM, Markofski MM, Pence BD. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14⁺CD16⁺) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol* 2008; 84:1271-1278.
606. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.* 1999; 7 (2): 169–177.
607. Thorand B, Kolb H, Baumert J, Koenig W, Chambless L, Meisinger C. Elevated levels of interleukin-18 predict the development of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Study, 1984–2002. *Diabetes.* 2005;54:2932–2938.
608. Thorand B, Lowel H, Schneider A, Kolb H, Meisinger C, Frohlich M, Koenig W: C-reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitus among middle-aged men: results from the MONICA Augsburg cohort study, 1984–1998. *Arch Intern Med.* 2003; 163:93–99.
609. Thunander M, Thorgeirsson H, Törn C, Petersson C, Landin-Olsson M. β -cell function and metabolic control in latent autoimmune diabetes in adults with early insulin versus conventional treatment: a 3-year follow-up. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(2):239-245.

610. Tong Y, Lin Y, Zhang Y, Yang J, Zhang Y, Liu H, Zhang B. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2009; 10:15.
611. Torn C, Gupta M, Zake LN, Sanjeevi CB, Landin-Olsson M. Heterozygosity for MICA 5.0/MICA 5.1 and HLA-DR3-DQ2/DR4-DQ8 are independent risk factors for latent autoimmune diabetes in adults. *Human Immunology* 2003; 64: 902-909.
612. Törn C, Landin-Olsson M, Ostman J, Scherstén B, Arnqvist H, Blohmé G, Björk E, Bolinder J, Eriksson J, Littorin B, Nyström L, Sundkvist G, Lernmark A. Glutamic acid decarboxylase antibodies (GADA) is the most important factor for prediction of insulin therapy within 3 years in young adult diabetic patients not classified as Type 1 diabetes on clinical grounds. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000;16(6):442-447.
613. Törn C, Mueller PW, Schlosser M, Bonifacio E, Bingley PJ. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia.* 2008;51: 846-852.
614. Trøseid M, Seljeflot I, Hjerkin EM, Arnesen H. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular events in elderly men with the metabolic syndrome: synergistic effect of inflammation and hyperglycemia. *Diabetes Care.* 2009;32(3):486-492.
615. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):210-215.
616. Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS, Chrousos GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:4167-4170.
617. Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Tanimoto T, Kitabata H, Okochi K, Arita Y, Ishibashi K, Komukai K, Kataiwa H, Nakamura N, Hirata K, Tanaka A, Akasaka T. Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(2):130-138.
618. Tuomi T, Carlsson A, Li H, Isomaa B, Miettinen A, Nilsson A, Nissén M, Ehrnström BO, Forsén B, Snickars B, Lahti K, Forsblom C, Saloranta C, Taskinen MR, Groop LC. Clinical and genetic characteristics of type 2 diabetes with and without GAD antibodies. *Diabetes.* 1999; 48(1):150-57.
619. Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes.* 1993;42(2):359-362.
620. Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Hitman GA, Nissinen A, Stengård J, Pekkanen J, Kivinen P, Kaarsalo E, Karvonen MJ. Genetic susceptibility to non-insulin dependent diabetes mellitus and glucose intolerance are located in HLA region. *BMJ.* 1993; 307:155-159.
621. Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay IR, Shattock M, Bottazzo GF, Holman R.. UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet.* 1997;350:1288-1293.
622. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 Cause Insulin Resistance through Inhibition of Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate Proteins by Discrete Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology.* 2004;24(12):5434-5446.
623. Ueland T, Espevik T, Kjekshus J, Gullestad L, Omland T, Squire IB, Frøland SS, Mollnes TE, Dickstein K, Aukrust P. Mannose binding lectin and soluble Toll-like receptor 2 in heart failure following acute myocardial infarction. *J Card Fail.* 2006; 12:659-63.
624. Ulrich, C., Heine, G. H., Gerhart, M. K., Köhler, H. and Girndt, M: Proinflammatory CD14+CD16+ Monocytes Are Associated With Subclinical Atherosclerosis in Renal Transplant Patients. *Am J Transplant* 2008; 8:103-110.
625. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 2000;287:664-666.
626. Urra X, Villamor N, Amaro S, Gomez-Choco M, Obach V, Oleaga L, Planas AM, Chamorro A. Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29:994-1002.
627. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature.* 1997;389(6651):610-614.
628. Vallerie SN., Furuhashi M., Fucho R, Hotamisligil GS. A predominant role for parenchymal c-Jun amino terminal kinase (JNK) in the regulation of systemic insulin sensitivity. *PLoS ONE.* 2008; 3:e3151.

629. van Asseldonk EJ, Stienstra R, Koenen TB, Joosten LA, Netea MG, Tack CJ. Treatment with Anakinra improves disposition index but not insulin sensitivity in nondiabetic subjects with the metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2119–2126.
630. van Deutekom AW, Heine RJ, Simsek S. The islet autoantibody titres: their clinical relevance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and the classification of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2008;25(2):117-125.
631. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:2127–2131.
632. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* 2011; 17, 179–188.
633. Verchere CB, D'Alessio DA, Palmiter RD, Weir GS, Bonner-Weir S, Baskin DG, Kahn SE. Islet amyloid formation associated with hyperglycemia in transgenic mice with pancreatic beta cell expression of human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:3492–3496.
634. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Chase HP, Eisenbarth GS. Number of autoantibodies (against insulin, GAD or ICA512/IA2) rather than particular autoantibody specificities determines risk of type I diabetes. *J Autoimmun*. 1996;9(3):379-83.
635. Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, Colman PG, Pilcher C, Bingley PJ, Eisenbarth GS, participating laboratories: Combined use of autoantibodies (IA-2ab, GADab, IAA, ICA) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes*. 1998; 47:1857–1866.
636. Vink A, Schoneveld AH, Van Der Meer JJ, Van Middelaar BJ, Sluijter JP, Smeets MB, Quax PH, Lim SK, Borst C, Pasterkamp G, De Kleijn DP. In vivo evidence for a role of Toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation*. 2002;106:1985–1990.
637. Viriyakosol S, Tobias PS, Kirkland TN. Mutational analysis of membrane and soluble forms of human MD-2. *J Biol Chem*. 2006;281(17):11955-11964.
638. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*. 1999;282(22):2131-5.
639. Vogel SN, Awomoyi AA, Rallabhandi P, Medvedev AE. Mutations in TLR4 signaling that lead to increased susceptibility to infection in humans: an overview. *J Endotoxin Res*. 2005;11:333–339.
640. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res*. 2001;9(7):414-7.
641. Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA: High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002; 51:455–461.
642. Vozarova B., Fernández-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD, Ricart W, Vendrell J, Richart C, Tataranni PA, Wolford JK. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum. Genet*. 2003; 112:409–413.
643. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med*. 2002;8:75–79.
644. Wang L, Wang J, Fang J, Zhou H, Liu X, Su SB. High glucose induces and activates Toll-like receptor 4 in endothelial cells of diabetic retinopathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2015;7:89.
645. Wang X, Bao W, Liu J, OuYang YY, Wang D, Rong S, Xiao X, Shan ZL, Zhang Y, Yao P, Liu LG. Inflammatory Markers and Risk of Type 2 Diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2013;36(1):166-175.
646. Wang X, Liu J, Ouyang Y, Fang M, Gao H, Liu L. The Association between the Pro12Ala Variant in the PPAR γ 2 Gene and Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity in a Chinese Population. Li S, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e71985.
647. Wang Y, Schmeichel AM, Iida H, Schmelzer JD, Low PA. Enhanced inflammatory response via activation of NF-kappaB in acute experimental diabetic neuropathy subjected to ischemia-reperfusion injury. *J Neurol Sci*. 2006;247(1):47-52.
648. Wang Y, Zhong J, Zhang X, Liu Z, Yuan Yang Y, Gong Q, Boxu Ren B. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes Research*. 2016;2016:2543268.
649. Wasmeier C, Hutton JC. Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem*. 1996;271(30):18161-70.

650. Watters TM, Kenny EF, O'Neill LA. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(6):411-419.
651. Weaver LK, Hintz-Goldstein KA, Pioli PA, Wardwell K, Qureshi N, Vogel SN, Guyre PM: Pivotal advance: Activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 26–35.
652. Weiner LM, Li W, Holmes M, Catalano RB, Dovnarsky M, Padavic K, Alpaugh RK. Phase I trial of recombinant macrophage colony-stimulating factor and recombinant gamma-interferon: toxicity, monocytosis, and clinical effects. *Cancer Res* 1994;54(15):4084-4090.
653. Weintrob N, Amitay I, Lilos P, Shalitin S, Lazar L, Josefsberg Z. Bedside neuropathy disability score compared to quantitative sensory testing for measurement of diabetic neuropathy in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2007; 21:13-19,.
654. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest.* 2006;116(1):115-124.
655. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796-1808.
656. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation.* 2003;112:1785-1788.
657. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1111-1119.
658. Welsh N, Cnop M, Kharroubi I, Bugliani M, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL. Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes.* 2005;54(11):3238-3244.
659. Wen H., Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, Brickey WJ, Ting JP. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* 2011; 12: 408–415.
660. Wen H, Ting JP, O'Neill LA. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol.* 2012;13:352–357.
661. Wendt T, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and vascular inflammation: insights into the pathogenesis of macrovascular complications in diabetes. *Curr Atheroscler Rep.* 2002;4:228–237.
662. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(43):17040-17045.
663. Westwell-Roper C, Nackiewicz D, Dan M, Ehses JA. Toll-like receptors and NLRP3 as central regulators of pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(4):314-323.
664. Weyrich P, Staiger H, Stančáková A, Machicao F, Machann J, Schick F, Stefan N, Kuusisto J, Laakso M, Schäfer S, Fritsche A, Häring HU. The D299G/T399I Toll-like receptor 4 variant associates with body and liver fat: results from the TULIP and METSIM Studies. *PLoS One.* 2010;5(11):e13980.
665. WHO Expert Committee. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. WHO Technical Report Series no. 854. Geneva: WHO, 1995.
666. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: second report. World Health Organ Tech Rep Ser. 1980;646:1-80.
667. Williams AJ, Bingley PJ, Chance RE, Gale EA. Insulin autoantibodies: more specific than proinsulin autoantibodies for prediction of type 1 diabetes. *J Autoimmun* 1999;13(3):357–363.
668. Wilson PW, Anderson KM, Kannel WB. Epidemiology of diabetes mellitus in the elderly. The Framingham Study. *Am J Med.* 1986; 80(5A):3-9.
669. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker D, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Normalization of Obesity-Associated Insulin Resistance through Immunotherapy: CD4+ T Cells Control Glucose Homeostasis. *Nature medicine.* 2009;15(8):921-929.
670. Winter & David Pittman, William. Islet cell antibodies [internet]. 2016 Apr 5; Diapedia 21042821222 rev. no. 9.; <https://doi.org/10.14496/dia.21042821222.9>; последна актуализация 05.04.2016г.
671. Winter WE, Harris N, Schatz D. Immunologic markers in the diagnosis, and prediction of autoimmune, type 1A diabetes. *Clinical Diabetes* 2002;20:183–91.
672. Winter WE, Schatz DA. Autoimmune markers in diabetes. *Clin Chem.* 2011;57(2):168-75.

673. Wolford JK, Gruber JD, Ossowski VM, Vozarova B, Antonio Tataranni P, Bogardus C, Hanson RL. A C-reactive protein promoter polymorphism is associated with type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Mol Genet Metab.* 2003; 78:136–144.
674. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, Kourilsky P, Wong SC. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 2011;118:e16–e31.
675. Wood IS, Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P. The pro-inflammatory cytokine IL-18 is expressed in human adipose tissue and strongly upregulated by TNFalpha in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337:422–429.
676. Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion.* 2011;83(1-2):124-133.
677. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science.* 2011;332(6026):243-247.
678. Wunderlich FT, Strohle P, Konner AC, Gruber S, Tovar S, Bronneke HS, Juntti-Berggren L, Li LS, van Rooijen N, Libert C, Berggren PO, Bruning JC. Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action. *Cell Metab.* 2010;12:237–249.
679. Xiang Y, Huang G, Shan Z, Pan L, Luo S, Yang L, Shi L, Li Q, Leslie RD, Zhou Z. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies are dominant but insufficient to identify most Chinese with adult-onset non-insulin requiring autoimmune diabetes: LADA China study 5. *Acta Diabetol.* 2015;52(6):1121-1127.
680. Xie X, Shi X, Liu M. The Roles of TLR Gene Polymorphisms in Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of 35,317 Subjects. *Scand J Immunol.* 2017;86(1):50-58.
681. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 1998;101(2):311-320.
682. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821–1830.
683. Xu WD, Liu SS, Pan HF, Ye DQ. Lack of association of TLR4 polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Joint Bone Spine.* 2012;79(6):566-569.
684. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation.* 2001;104:3103–3108.
685. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2002;169(12):6668-6672.
686. Yamamoto Y, Hirose H, Miyashita K, Nishikai K, Saito I, Taniyama M, Tomita M, Saruta T. PPAR(gamma)2 gene Pro12Ala polymorphism may influence serum level of an adipocyte-derived protein, adiponectin, in the Japanese population. *Metabolism.* 2002;51(11):1407-1409.
687. Yang H, Wang H, Levine YA, Gunasekaran MK, Wang Y, Addorisio M, Zhu S, Li W, Li J, de Kleijn DP, Olofsson PS, Warren HS, He M, Al-Abed Y, Roth J, Antoine DJ, Chavan SS, Andersson U, Tracey KJ: Identification of CD163 as an antiinflammatory receptor for HMGB1-haptoglobin complexes. *JCI Insight* 2016; 1:pii: e85375.
688. Yang HB, Xie KQ, Deng JM, Qin SM. Expression of soluble Toll-like receptors in pleural effusions. *Chin Med J (Engl).* 2010;123:2225-2230.
689. Yang IA, Holloway JW, Ye S; Southampton Atherosclerosis Study (SAS) Group. TLR4 Asp299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis.* 2003;170(1):187-190.
690. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research* 2014;2:1.
691. Yang L, Yuan J, Zhou Z. Emerging roles of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors: anti-inflammatory and immunomodulatory effect and its application in diabetes mellitus. *Can J Diabetes.* 2014;38(6):473-479.
692. Yang L, Zhou ZG, Huang G, Ouyang LL, Li X, Yan X. Six-year follow-up of pancreatic beta cell function in adults with latent autoimmune diabetes. *World J Gastroenterol.* 2005;11(19):2900-5.

693. Yang Y, Ju D, Zhang M, Yang G. Interleukin-6 stimulates lipolysis in porcine adipocytes. *Endocrine*. 2008;33(3):261-269.
694. Yang Z, Chen R, Zhang Y, Huang Y, Hong T, Sun F, Ji L, Zhan S. Scoring systems to screen for diabetic peripheral neuropathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014; 3: CD010974.
695. Ye J. Regulation of PPAR γ function by TNF- α *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(3):405–408.
696. Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33(1):54-66.
697. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of medicine*. 2013;7(1):14- 24.
698. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 241(2):270-274.
699. Yin J, Peng Y, Wu J, Wang Y, Yao L. Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and β -cell dysfunction. *J Leukoc Biol*. 2014;95(1):47-52.
700. Yin YW, Wang Q, Sun QQ, Hu AM, Liu HL. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 15,059 subjects. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015;107(3):338-47.
701. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J*. 2007;274(3):630-658.
702. Youm Y-H, Adijiang A, Vandanmagsar B, Burk D, Ravussin A, Dixit VD. Elimination of the NLRP3-ASC Inflammasome Protects against Chronic Obesity-Induced Pancreatic Damage. *Endocrinology*. 2011;152(11):4039-4045.
703. Yu L, Wang L, Chen S. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010;14(11):2592-2603.
704. Zähringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*. 2008; 213(3-4):205-224.
705. Zampetti S, Capizzi M, Spoletini M, Campagna G, Leto G, Cipolloni L, Tiberti C, Bosi E, Falorni A, Buzzetti R; NIRAD Study Group. GADA titer-related risk for organ-specific autoimmunity in LADA subjects subdivided according to gender (NIRAD study 6). *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(10):3759-3765.
706. Zampetti S, Spoletini M, Petrone A, Capizzi M, Arpi ML, Tiberti C, Di Pietro S, Bosi E, Pozzilli P, Giorgino F, Buzzetti R; Nirad Study Group. Association of TCF7L2 gene variants with low GAD autoantibody titre in LADA subjects (NIRAD Study 5). *Diabet Med*. 2010;27(6):701-704.
707. Zanni MV, Burdo TH, Makimura H, Williams KC, Grinspoon SK. Relationship between Monocyte/Macrophage Activation Marker Soluble CD163 and Insulin Resistance in Obese and Normal-Weight Subjects. *Clinical endocrinology*. 2012;77(3):385-390.
708. Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res*. 2002;56(1):126-34.
709. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(4):379-86.
710. Zhang B, Lan MS, Notkins AL. Autoantibodies to IA-2 in IDDM: location of major antigenic determinants. *Diabetes*. 1997;46(1):40-3.
711. Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes*. 2002;51(10):2929-35.
712. Zhang HM, Zhang XL, Zhou X, Li D, Gu JG, Wu JJ. Mechanism linking atherosclerosis and type 2 diabetes: increased expression of scavenger receptor CD36 in monocytes. *Chin Med J (Engl)*. 2005; 118(20):1717-1722.
713. Zhang K, Zhang L, Zhou B, Wang Y, Song Y, Rao L, Zhang L. Lack of association between TLR4 Asp299Gly polymorphism and atherosclerosis: evidence from meta-analysis. *Thromb Res*. 2012;130(4):e203-208.
714. Zhang N, Huang W, Dong F, Liu Y, Zhang B, Jing L, Wang M, Yang G, Jing C. Insulin gene VNTR polymorphisms -2221MspI and -23HphI are associated with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: a meta-analysis. *Acta Diabetol*. 2015;52(6):1143-1455.
715. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372:425–432.
716. Zhu T, Meng Q, Ji J, Lou X, Zhang L. Toll-like receptor 4 and tumor necrosis factor-alpha as diagnostic biomarkers for diabetic peripheral neuropathy. *Neurosci Lett*. 2015;585:28-32.

717. Zhu T, Meng Q, Ji J, Zhang L, Lou X. TLR4 and Caveolin-1 in Monocytes Are Associated With Inflammatory Conditions in Diabetic Neuropathy. *Clinical and Translational Science*. 2017;10(3):178-184.
718. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74-80.
719. Zimmet P. Antibodies to glutamic acid decarboxylase in the prediction of insulin dependency. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996;34 Suppl:S125-131.
720. Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, Lang DA. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med*. 1994;11(3):299-303.
721. Zimmet P, Turner R, McCarty D, Rowley M, Mackay I. Crucial points at diagnosis. Type 2 diabetes or slow type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 1999;22 Suppl 2:B59-64.
722. Zinman B, Kahn SE, Haffner SM, O'Neill MC, Heise MA, Freed MI; ADOPT Study Group. Phenotypic characteristics of GAD antibody-positive recently diagnosed patients with type 2 diabetes in North America and Europe. *Diabetes*. 2004;53(12):3193-3200.
723. Zunt SL, Burton LV, Goldblatt LI, Dobbins EE, Srinivasan M. Soluble forms of Toll-like receptor 4 are present in human saliva and modulate tumour necrosis factor-alpha secretion by macrophage-like cells. *Clin Exp Immunol*. 2009;156:285-293.
724. Zyriax BC, Salazar R, Hoepfner W, Vettorazzi E, Herder C, Windler E. The association of genetic markers for type 2 diabetes with prediabetic status - cross-sectional data of a diabetes prevention trial. *PLoS One*. 2013; 8(9):e75807.