



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ**

Д-р Гергана Младенова Чаушева

**Лабораторна оценка на сърдечно-съдов риск при
лица с дългогодишен захарен диабет тип 1 –
адипокини, остеопротегерин,
асиметричен диметил-аргинин**

ДИСЕРТАЦИЯ

За присъждане на научна и образователна степен

„ДОКТОР“

Научен ръководител:

Доц. д-р Яна Димитрова Бочева, д.м.

Варна, 2023 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	8
1. T1Д и ССЗ.....	8
1.1. Епидемиологични данни.....	8
1.2. Оценка на ССР при T1Д.....	9
1.3. Кандидат-биомаркери за оценка на ССР при T1Д	11
2. ADMA	12
2.1. ADMA – структура и синтез.....	13
2.2. ADMA – елиминиране.....	14
2.3. ADMA – биологична роля	15
2.4. ADMA – патогенетични механизми за развитие на ССЗ.....	16
2.5. ADMA – аналитични методи за количествено определяне.....	17
2.6. ADMA – клинично приложение.....	21
3. OPG.....	22
3.1. OPG – структура и синтез	23
3.2. OPG – лиганди и биологична роля.....	24
3.3. OPG – патогенетични механизми за развитие на ССЗ.....	26
3.4. OPG – аналитични методи за количествено определяне	28
3.5. OPG – клинично приложение	30
4. ADNC	32
4.1. ADNC – структура и синтез.....	32
4.2. ADNC – елиминиране	33
4.3. ADNC-рецептори и биологична роля	34
4.4. ADNC – патогенетични механизми за развитие на ССЗ.....	35
4.5. ADNC – аналитични методи за количествено определяне.....	37
4.6. ADNC – клинично приложение.....	38
5. Lep	40
5.1. Lep – структура и синтез.....	40
5.2. Lep – рецептори и биологична роля.....	40
5.3. Lep – патогенетични механизми за развитие на ССЗ.....	42
5.4. Lep – аналитични методи за количествено определяне.....	44
5.5. Lep – клинично приложение.....	46
6. Заключение	48
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	50

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	51
V. РЕЗУЛТАТИ	57
1. Клинико-лабораторна характеристика на изследваните лица.....	57
2. Прогностична стойност на ADMA за оценка на ССР при лица с дългогодишен Т1Д ..	61
2.1. ADMA – влияние на пол, възраст и давност на диабета.....	61
2.2. ADMA – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.	62
2.3. ADMA – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3	64
2.4. ROC анализи за извеждане на прагови стойности на ADMA при Т1Д.....	68
3. Прогностична стойност на OPG за оценка на ССР при лица с дългогодишен Т1Д.....	70
3.1. OPG – влияние на пол, възраст и давност на диабета.....	70
3.2. OPG – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.	72
3.3. OPG – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3.....	74
3.4. ROC анализи за извеждане на прагови стойности на OPG при Т1Д.....	77
4. Прогностична стойност на ADNC за оценка на ССР при Т1Д.....	80
4.1. ADNC – влияние на пол, възраст и давност на диабета	80
4.2. ADNC – връзки със ST1RE, ESC от 2019 г. и Riskfactor3	82
4.3. ADNC – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3	84
4.4. ROC анализи за извеждане на прагови стойности на ADNC спрямо категорията на ССР при лица с дългогодишен Т1Д.....	88
5. Прогностична стойност на Lер за оценка на ССР при лица с дългогодишен Т1Д	89
5.1. Lер – влияние на пол, възраст, давност на диабета и ИТМ.....	89
5.2. Lер – връзки със ST1RE, ESC от 2019 г. RiskFactor3	91
5.3. Lер – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3	93
5.4. Lер – логистични регресионни модели и ROC анализи за извеждане на прагови стойности.....	98
6. Хематоморфологични показатели.....	103
6.1. Сравнение между пациенти с Т1Д и здрави лица	103
6.2. Връзки с OPG и ADMA.....	108
6.3. Връзки със ST1RE, ESC от 2019 г. и Riskfactor3	111
6.4. Анемия и ССР при лица с дългогодишен Т1Д	113
6.5. Левкоцитоза и ССР при пациенти с дългогодишен Т1Д.....	117
6.6. Връзки с ADNC и Lер	118
6.6.1. ADNC – асоциация с анемия и левкоцитоза	122
6.6.2. Lер – асоциация с анемия, левкоцитоза и тромбоцитоза.....	124
VI. ДИСКУСИЯ.....	127
1. Оценка на ССР според насоките на ESC от 2019 г. и ST1RE при лица с дългогодишен Т1Д	127

2.	Прогностична стойност на ADMA за оценка на ССР при Т1Д.....	128
2.1.	ADMA – възрастово и полово обусловени разлики.....	128
2.2.	ADMA – връзки със специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР.....	129
2.3.	ADMA – връзки с HbA1C, CRP, AlbU и RiskFactor3	129
2.4.	ADMA – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3.....	131
3.	Прогностична стойност на OPG за оценка на ССР при Т1Д.....	132
3.1.	OPG – възрастово и полово обусловени разлики	132
3.2.	OPG – връзки с ADMA.....	133
3.3.	OPG – връзки със специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР.....	134
3.4.	OPG – връзки с HbA1C, CRP, AlbU и с RiskFactor3.....	136
3.5.	OPG – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3.....	137
4.	Прогностична стойност на ADNC за оценка на ССР при Т1Д.....	138
4.1.	ADNC – възрастово и полово обусловени разлики.....	138
4.2.	ADNC – връзки с ADMA	139
4.3.	ADNC – връзки със специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР	140
4.4.	ADNC – връзки с HbA1C, CRP, AlbU и с RiskFactor3	141
4.5.	ADNC – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3	144
5.	Прогностична стойност на Lер за оценка на ССР при Т1Д.....	144
5.1.	Lер – възрастово и полово обусловени разлики.....	144
5.2.	Lер – връзки с OPG.....	146
5.3.	Lер – връзки със специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР.....	146
5.4.	Lер – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с Riskfactor3	147
5.5.	Lер – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3.....	148
6.	Хематоморфологични промени и ССР при Т1Д.....	149
6.1.	Тенденция за анемия при лица с дългогодишен Т1Д	149
6.2.	Тенденция за левкоцитоза при лица с дългогодишен Т1Д.....	151
6.3.	Променни в тромбоцитен брой и тромбоцитни индекси при лица с Т1Д	152
6.4.	Зависимости между ADMA, OPG и хематоморфологичните показатели.....	154
6.5.	Зависимости между ADNC, Lер и хематоморфологичните показатели	155
VII.	ИЗВОДИ.....	158
VIII.	ПРИНОСИ	160
IX.	БИБЛИОГРАФИЯ.....	161

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ДБЗ	диабетното бъбречно заболяване
ЕД	ендотелна дисфункция
ЗД	захарен диабет
ИБС	исхемична болест на сърцето
ИТМ	индекс на телесна маса
КАБ	коронарна артериална болест
МИ	мозъчен инсулт
МС	метаболичен синдром
ОМИ	остър миокарден инфаркт
ССЗ	сърдечно-съдови заболявания
ССР	сърдечно-съдов риск
ССС	сърдечно-съдови събития
ССУ	сърдечно-съдови усложнения
T1Д	захарен диабет тип 1
T2Д	захарен диабет тип 2
ХБЗ	хронично бъбречно заболяване
ADMA	асиметричен диметиларгинин
ADNC	адипонектин
AlbU	албуминурия
CRP	С-реактивен протеин
ELISA	ензимно-свързан имуносорбентен анализ
ESC	Европейско дружество по кардиология
HbA1C	гликиран хемоглобин
Lep	лептин
NOS	азотен оксид синтетаза
OPG	остеопротегерин
ROS	реактивни кислородни форми
ST1RE	Steno Type 1 Risk Score

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет (ЗД) е хронично, социалнозначимо заболяване с прогресивно нарастваща честота както в световен мащаб, така и в България. С увеличаване на продължителността на живот сърдечно-съдовите заболявания (ССЗ) се превръщат в основна причина за смъртност при ЗД тип 1 (Т1Д). Сърдечно-съдовият риск (ССР) остава висок дори при пациенти с добър метаболитен контрол, което респективно означава, че лечебно-диагностичните подходи в тази посока са инсуфициентни. Към днешна дата стратификацията на риска и скрининговите стратегии за оценка на ССР при Т1Д са предимно екстраполирани от проучвания при пациенти със ЗД тип 2 (Т2Д) или общата популация. Този подход е незадоволителен поради съществени различия в патофизиологичните механизми за развитие на ССЗ между Т1Д и Т2Д.

Лабораторната оценка на ССР посредством въвеждането на иновативни биомаркери би позволила оптимизиране на диагностично-прогностичната акуратност и терапевтичните подходи. Това ще доведе до по-ниска честота на годишните хоспитализации по повод сърдечно-съдови усложнения (ССУ) и респективно по-ниски финансови разходи. Ще се повиши капацитетът на звената от базовата организация и тяхната национална/европейска конвертируемост.

Основно предизвикателство при валидиране на лабораторни биомаркери е разработването на персонализиран подход, както и активно сътрудничество между лабораторни специалисти и клиницисти. Биомаркерите могат да изпълняват критична роля за определяне категорията на ССР при пациенти с Т1Д. Приложението им в клиничната практика ще подобри квалификацията на специалистите и ще се постигне приемственост в грижата за диабет.

Научното изследване ще даде възможност да се установи дали количественото определяне на серумни биомаркери – асиметричен диметиларгинин (ADMA), остеопротегерин (OPG), адипонектин (ADNC) и лептин (Lep), е с висока информативна стойност за клиничната практика по отношение на стратификацията на ССР с цел постигане на по-добро качество на живот и преживяемост за пациентите с Т1Д. В настоящото проучване се анализираха и взаимодействията между хематоморфологични показатели и предложените биомаркери в контекста на висок ССР при лица с дългогодишен Т1Д. Визираните факти определят темата на дисертационния труд като актуална и полезна за клиничната практика. Очакваните резултати са от значение за развитието на науката и практическото поведение за превенция на ССЗ при лица с дългогодишен Т1Д с определени фундаментални аспекти.

Актуалността и значимостта на проблема, както и ограниченият брой разработки и публикувани материали в специализираната литература, предизвикват изследователския ни интерес и са определящи при избора на тема за дисертацията.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Т1Д и ССЗ

1.1. Епидемиологични данни

В световен мащаб ЗД се счита за едно от най-значимите хронични заболявания на 21-ви век, като честотата му прогресивно нараства. [214] Според доклад на СЗО броят на регистрираните заболели се е утроил от 1980 г. до 422 млн. през 2016 г., като се очаква през 2030 г. да достигне до 643 млн., а през 2045 г. – 784 млн. души на възраст 20–79 години. Броят на болните от ЗД се очаква да се увеличи с 46% през този период. [115] Налице е епидемия от ЗД, която засяга както високоразвитите, така и развиващите се страни. По данни от регистъра на болните от ЗД в Република България през 2019 г. има 503 753 заболели, от които 4,82% са диагностицирани с Т1Д. [5] През 2019 г. глобалното разпространение на хроничното заболяване се оцени на 9,3% (463 милиона души), а Т1Д съставлява 5–10% от всички пациенти със ЗД. [268] Установено е, че 1 106 600 души на възраст 0–19 години са диагностицирани с Т1Д, като всяка следваща година се новодиагностицират около 132 600 пациенти. [115] Т1Д може да дебютира във всяка възраст, но най-висока честота се отчита при деца между 10–14 години, равномерно разпределена между половете. [268] Установена е значима вариация по отношение на географското разпределение в световен мащаб. [268] Т1Д се среща по-често сред европейци и по-рядко сред азиатци: рискът от заболяване на дете от Финландия е около 40 пъти по-висок от този в Япония и почти 100 пъти по-висок от този в Китай. [115] Честота на заболяемостта от Т1Д всяка година се увеличава с 3%, като причините за това не са напълно изяснени. [21] Т1Д води до значимо намаляване на очакваната продължителност на живот като приблизително една трета от риска за обща смъртност се асоциира с развитие на ССЗ. [293,206]

ССЗ са водеща причина за смъртност при Т1Д. [43,65,145,238] По данни на Световната диабетна федерация, честотата на ССЗ през 2016 г. се оценява на 2,6% до 16,2% при индивиди с Т1Д на възраст между 28 и 40 години. [115] Метаанализ от 2015 г. съобщава за стандартизиран коефициент на смъртност от ССЗ при Т1Д (standartised mortality ratio, SMR) спрямо недиабетни контроли – 5,68 за мъже и 11,30 за жени. [113]

През 2021 г. са публикувани резултати от друг метаанализ, който за първи път оценява връзката между Т1Д и различни ССЗ. [293] Установеният относителен риск (RR) от ССЗ е 5,09 (95% CI, 3,72–6,96), от исхемична болест на сърцето (ИБС) RR е 9,38% (95% CI, 5,56–15,82), от остър миокарден инфаркт (ОМИ) е 6,37% (95% CI, 3,81–10,66), от сърдечна недостатъчност (СН) е 4,29% (95% CI, 3,54–5,19), от предсърдно мъждене е 1,36 (95% CI, 1,17–1,59), от

мозъчен инсулт (МИ) е 4,08% (95% CI, 3,42–4,86). В допълнение, изследователите отчитат по-висок RR от ИБС, ОМИ и МИ при жените спрямо мъжете с Т1Д. [293]

ССЗ са по-чести и настъпват по-рано при пациенти с Т1Д, отколкото в общата популация. [43] Честотата на ССЗ при Т1Д варира значимо в зависимост от продължителността на диабета, възрастта и пола. [58]

Епидемиологични проучвания обобщават някои особени аспекти на атеросклеротичния процес при Т1Д, асоциирани с възраст на диагностициране, прогресия на болестта и асимптомно протичане на ИБС. На първо място, атеросклеротичният процес вероятно започва развитието си още в млада възраст, скоро след поставяне на диагнозата. При деца с Т1Д без ССЗ е докладвана увеличена дебелина на аортна интима-медиа и каротидна интима-медиа (чувствителен маркер за ранна субклинична атеросклероза). [232] На второ място, клиничното разпознаване на коронарна артериална болест (КАБ) при Т1Д е затруднено, поради превалиращо асимптомно протичане сред младите пациенти с Т1Д. Диагностицирането на ССЗ в тази възраст обикновено се асоциира с хиперхолестеролемия и затлъстяване. [44]

1.2. Оценка на ССР при Т1Д

През 2013 г. Европейското кардиологично дружество (ESC) изрично препоръча скалите за оценка на ССР, разработени за общата популация, да не се прилагат при пациенти със ЗД. [214] Повечето препоръки за превенция на ССЗ относно Т1Д са извлечени от проучвания на Т2Д. Описаните рискови фактори действат по различен начин при Т1Д, а установеният нисък абсолютен риск при млади хора, който може да крие много по-висок относителен риск, подчертава нуждата от категорична своевременна намеса. [113] Моделите за калкулиране на риска за общата популация и за пациентите с Т2Д като Framingham и UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) не отчитат рискови фактори като възраст, хипергликемия или наличие на микроваскуларни усложнения и респективно подценяват ССР при пациенти с Т1Д. [302]

Steno Type 1 Risk Score (ST1RE) е най-обещаващият модел за прогнозиране на първо фатално или нефатално ССС сред популацията на Т1Д. ST1RE включва 10 рискови фактора (възраст, пол, продължителност на диабета, HbA1C, систолично кръвно налягане, LDL-холестерол, скорост на гломерулна филтрация, албуминурия, тютюнопушене и физическа активност) и демонстрира силно представяне при прогнозиране на 10-годишен риск от ССЗ в кохорта от 4306 възрастни с Т1Д, регистрирани в Центъра за диабет Steno, Дания, и без анамнеза за предходни ССС. [278]

Шведската диабетна асоциация (SNDR) разработва друга подобна скала – Swedish T1D risk score като изследва 3661 пациенти на възраст между 30 и 65 години. [45] Използвани са

осем променливи за определяне на 5-годишен риск от ССЗ: давност на диабета, възраст на диагностициране, логаритмично отношение между общ холестерол и HDL, log HbA1C, log систолно налягане, тютюнопушене, албинурия и предшестващо ССЗ. Доказано е, че ST1RE е по-добър модел в прогнозирането на петгодишен риск от фатално/нефатално атеросклеротично ССЗ (ASCVD) в сравнение със шведския модел. [277]

Предиктивна скала за оценка на ССР е разработена и с помощта на Шотландския национален регистър. [238] За периода между 2004 г. и 2014 г. са включени 26 680 възрастни пациенти с Т1Д, а рисков фактори (РФ) са: възраст, HDL-холестерол, давност на диабета, тютюнопушене и антихипертензивна терапия. [238] Към момента този модел не е категорично валидиран за оценка на индивидуален риск от ССЗ. Във Великобритания най-широко прилаганата скала за оценка на 10-годишен риск от ССЗ е QRISK, която ежегодно се актуализира. [104] Националният институт за клинични постижения (NICE) препоръчва използването на QRISK2 за пациенти с Т2Д и други рискови групи на възраст между 40–84 години. [181] След последното обновяване на QRISK – QRISK3, включва и Т1Д като независима променлива за оценка на 10-годишен риск от ССЗ. [104] Моделът е базиран върху проучване, което обхваща над 7,8 млн. души и се определя като представително за общата популация. Скорошен доклад на NICE насочва вниманието, че при следваща ревизия на гайдлайни за управление на ССЗ вероятно ще бъде наложено приоритетното използване на QRISK3. NICE препоръчва персонализирана оценка на ССР при пациенти с Т1Д. [181]

Американската диабетна асоциация (ADA) не препоръчва скрининг на асимптоматични пациенти, тъй като крайният баланс между ползи, разходи и рискове остава спорен, особено в съвременната среда на агресивен контрол на рисковите фактори за ASCVD. [28]

Съгласно насоките на ESC от 2019 г. пациентите с Т1Д се класифицират в много висок риск от ССЗ ($\geq 10\%$ 10-годишен риск от фатални ССЗ), висок риск (5–9% 10-годишен риск от фатално ССЗ) и умерен риск (3–4% 10-годишен риск от фатални ССЗ събития). Стратификацията на ССР според критериите на ESC от 2019 г. се базира на наблюдационни проучвания и не е валидирана при клинично „измерени“ ССЗ събития, което допуска известна субективност на модела. Според насоките на ESC от 2019 г. повечето индивиди с Т1Д са изложени на висок или много висок риск, а това предполага амбициозни терапевтични цели спрямо стойността на LDL-холестерол, по-строг контрол на кръвното налягане и употребата на антиагреганти. [158]

В заключение високият ССР при хора с Т1Д е установен от редица изследователи. Според повечето изследователи ССР е еквивалентен за мъже и жени с Т1Д, а скорошни проучвания съобщават за превес на жените спрямо мъжете. При Т1Д, RR от ССЗ, коригиран

спрямо възрастта, е 4 до 10 пъти по-висок в сравнение с този за общата популация. Сърдечно-съдовите събития (ССС) при болните настъпват с 10 до 15 години по-рано, отколкото при лицата без диабет. Развитието на ССЗ зависи предимно от възрастта на пациентите, давността на диабета, гликемичния контрол. Управляващите подходи за минимизиране честотата на ССЗ при Т1Д са екстраполирани предимно от опита с Т2Д, а патофизиологичните механизми не са добре разбрани. При проследяване прогресията на Т1Д е установено, че първите случаи на клинично манифестирано ССЗ се проявяват в края на третото и начало на четвъртото десетилетие от живота на пациентите. [145] Към момента няма ясно установен гликемичен праг за ССР при Т1Д, което респективно налага необходимостта от допълнителни проучвания в тази посока. [43,65,145,232,238] Стратификацията на риска и употребата на статини и антихипертензивни препарати за тази популация, особено при млади пациенти, не е унифицирана към днешна дата. Необходими са допълнителни изследвания, за да се прецизират факторите, които участват в преждевременната сърдечно-съдова заболяемост при пациенти с Т1Д. Все повече научни разработки удостоверяват възможностите на нови класове лабораторни биомаркери, които характеризират сърдечно-съдовите промени при пациенти с Т1Д.

1.3. Кандидат-биомаркери за оценка на ССР при Т1Д

Все повече клинични проучвания удостоверяват възможностите на нови класове лабораторни биомаркери, които характеризират сърдечно-съдовите промени при ЗД. Редица изследователи описват значима тежест на ССЗ при пациенти с Т1Д и ограничена доказателствена база за управление на ССР.

През 2001 г. работна група на Американския здравен институт стандартизира определението за биомаркер като „параметър, който може да бъде обективно измерен и е индикатор за нормален биологичен процес, патологичен процес или отговор към терапевтична интервенция“. [4,145] Биомаркерът може да бъде измерен в биологична проба, може да бъде регистрирана стойност от апаратно изследване (ЕКГ, измерено артериално налягане и др.) или образно изследване (ехокардиограма, компютърна томограма и др.). Изследователският интерес към биомаркерите се е увеличил през последните години. По данни на MedLine през 1990 г. са регистрирани само 21 клинични проучвания за кардиоваскуларни биомаркери, докато през 2010 г. броят им нараства до 2032, което демонстрира сигнификантно увеличение през последното десетилетие. [93] През 2014 г., в сравнение с 2013 г., са проведени с 37% повече изследвания на лабораторни биомаркери. [4]

Лабораторните биомаркери следва да имат висока аналитична и диагностична надеждност. Аналитичният метод за количествено определяне трябва да бъде бърз и с ниска цена, а биологичните проби – лесно достъпни чрез инвазивен метод (кръв и/или урина). Биомаркерите следва да бъдат използвани за различни цели като ранно откриване на заболяване, оценка на остро и хронично клинично състояние, стратификация на риска, диференциална диагноза, избор на подходящо терапевтично лечение и наблюдение реакцията на пациента към лечението. Идентифицирането на ранни лабораторни биомаркери за неинфекциозни хронични заболявания като Т1Д е от изключителна важност за последващата терапевтична стратегия.

В настоящия дисертационен труд разгледахме детайлно следните биомаркери: асиметричен диметиларгинин (ADMA), остеопротегерин (OPG), лептин (Lep) и адипонектин (ADNC). Научната база данни дава информация предимно за изследвания в областта на етиологията, развитието и лечението на ССЗ при Т1Д. Не бяха открити цялостни изследвания, свързани с анализа и възможностите на изброените биомаркери спрямо специфични скали за оценка на ССР при Т1Д. Актуалността и значимостта на проблема, както и ограниченият брой разработки и публикувани материали в специализираната литературата предизвикват изследователския ни интерес и са определящи при избора на тема за дисертацията.

Научното изследване ще даде възможност да се оцени прогностичната стойност на избраните иновативни маркери по отношение на ССР при пациенти с дългогодишен Т1Д.

2. ADMA

2-Амино-5-[(амино-диметиламинометил)амино] пентанова киселина или NG, NG-диметиларгинин, познат като ADMA, е специфичен ендегенен и конкурентен инхибитор на синтеза на NO. [290] NO се синтезира от аминокиселината L-аргинин под действието на NO-синтетазата (NOS) и е основен регулатор на съдовата хомеостаза. Диметиларгинините са изолирани от човешка плазма и урина преди повече от 50 години. [123] Докладваните концентрации се считат като относително постоянни и не се влияят значимо от диетата, а произходът им се описва като резултат от посттранслационна модификация с добавяне на метилови групи към аргининови остатъци на протеини и последващо ензимно разграждане на метилирания протеин. Според ранните изследователи, концентрацията на метиларгинините в урината отразява скоростта на метилиране на телесните протеини и тяхната обмяна. [123] През 1992 г. Vallance P. и сътр. за първи път съобщават, че ADMA действа като естествен инхибитор на NOS. [272] Установява се, че плазмените нивата на диметиларгинините са значително повишени при хора с хронично бъбречно заболяване (ХБЗ), а натрупването на ADMA в кръвта

и едновременното инхибиране на NOS може да допринесе за развитие на хипертония, имунна дисфункция и ССЗ. [273] Механизмите, които включват ADMA в етиопатогенезата на ССЗ при ЗД, са обект на научен интерес през последните години.

2.1. ADMA – структура и синтез

След завършване на транслацията и освобождаването на протеина от рибозомата аминокиселините в полипептидните вериги са изложени на разнообразни химични изменения, известни като посттранслационни модификации. [40] Метилирането на протеини е основен вид посттранслационна модификация с добавяне на метилови групи към протеините. Идентифицирани са повече от 200 протеини, при които е възможно аргининово метилиране. [40] Аргининови остатъци на белтъци могат да бъдат метилирани веднъж (монометиларгинин) или два пъти (диметиларгинин). Метилирането се катализира от три различни класа протеинови аргинин-метилтрансферази (PRMT). PRMT от тип I (PRMT-1, PRMT-2, PRMT-3, PRMT-4, PRMT-5 и PRMT-8) свързват две метилови групи към един краен азотен атом, а в резултат на това се образува асиметричен NG, NG-диметиларгинин (ADMA). PRMT от тип I се откриват предимно в сърце, ендотелни и гладкомускулни клетки. Тип II PRMT (PRMT-5 и PRMT-9) катализират образуването на симетричен диметиларгинин с една метилова група върху всеки краен азотен атом (симетричен NG, NG-диметиларгинин (SDMA)). PRMT от тип I и тип II генерират NG-монометиларгинин междинни продукти (NMMA). PRMT тип III (PRMT-7) катализира само синтеза на NMMA. Описан е и тип IV PRMT, който катализира монометилиране на вътрешен азотен атом при гъби. [40] PRMT-1 се счита за доминиращ ензим от групата на тип I PRMT и се открива в клетъчните ядро и цитоплазма като показва висока мобилност между двете структури. [40] PRMTs използват S-аденозилметионин (SAM) като донор на метилови групи. Метилтрансферазата катализира реакция на прехвърляне на метилова група от SAM към L-аргининовия остатък на протеина, а S-аденозилхооцистеин (SAH) и метиларгинини са реакционни продукти. Следователно съществува метаболитна зависимост между биосинтеза на метиларгинините и хомоцистеин-метиониновия цикъл. Многобройни експериментални проучвания описват връзката на ADMA със хомоцистеин (Hcy), считан на свой ред като независим РФ за развитие на ССЗ. [262] Инкубирането на човешки ендотелни клетки с Hcy води до значително повишени нива на ADMA в супернатанта на културелна среда. [262] Метилираните аргининови остатъци остават интегрална част на белтъците до тяхната протеинолиза, след което в цитоплазмата на клетките се освобождават ADMA, SDMA и NMMA. Последните показват структурна хомология с L-аргинин и са региоизомери. За разлика от SDMA, свободните форми на ADMA и NMMA са ендогенни инхибитори на всички NOS – изоформи и модулатори на NO-синтеза предимно в

сърдечно-съдовата система (ССС). [40] ADMA се генерира в цитозола и митохондриите на клетките след усвояване на диметилираните протеини. Свободната форма на ADMA може да бъде ензимно метаболизирана или изнесена в кръвния ток и да повлияе на метаболизма на други органи. ADMA преминава в екстрацелуларното пространство. При *in vitro* експерименти с човешки ембрионални бъбречни клетки Strobel и сътрудници установяват, че катионни аминокиселинни транспортери 2A (CAT2A), 2B (CAT2B) и транспортер на органични катиони 2 (OCT2) допринасят за клетъчното поглъщане на ADMA и респективно намаляват клетъчното усвояване на L-аргинина. [252] Y⁺ транспортната система е представител на CAT за ADMA и SDMA. NOS е локализирана в кавеолите на ендотелните клетки – специализирани плазмени сигнал-предаващи домени, а в съседство се разполага Y⁺ системата. [252] По този начин се осигурява директен достъп на ADMA до NOS. Предполага се, че ADMA и SDMA се конкурират с L-аргинин за транспортиране посредством Y⁺ системата. [252]

2.2. ADMA – елиминиране

ADMA се метаболизира чрез ензима диметиларгинин – диметиламинохидролаза (DDAH) до цитрулин и диметиламин (~80%), а в малка степен се елиминира чрез бъбречна екскреция (~20%). [40,256] По този начин се предотвратява натрупването на ADMA при физиологични условия. Промените в екскреторната функция на бъбреците и в активността на DDAH се асоциират и с промени в плазмените нива на ADMA. SDMA не е субстрат за DDAH и изцяло се екскретира в урината. [256] Описани са две изоформи на човешкия ензим DDAH. Те се кодират от гени, локализирани в хромозома 1 (DDAH1) и хромозома 6 (DDAH2) и се характеризират със специфично органно разпределение. DDAH 1 се открива в бъбреци, черен дроб, панкреас, аорта, перитонеални неутрофили и макрофаги, а DDAH 2 преобладава в съдов ендотел, сърце, плацента и бъбреци. [82,196] ADMA се метаболизира основно от DDAH 1. Установено е, че общото генерирано количество на ADMA при хората е приблизително 300 μmol /ден, а пълното инхибиране на активността на DDAH води до увеличаване на ADMA с 5 μmol /ден. [256] Ензимната активност на DDAH зависи от сулфхидрилна група в активния център на ензима – участък, който е чувствителен към оксидативен стрес. Редица експериментални изследвания в култури от ендотелни клетки показват, че оксидативният стрес е в основата на понижена каталитична активност на DDAH. [40] От друга страна, регулацията на ензима е зависима от HCY. Последният участва в редокс-индуцирано потискане на активността на DDAH с последващо нарастване на метилирането на L-аргинин-протеинови остатъци и повишено освобождаване на ADMA. [82] Образоването на окислени липопротеини с ниска плътност уврежда активността на DDAH. [82,196] Следователно посредством механизмите, с които се контролира активността на DDAH, се регулира и

концентрацията на ADMA в кръвта. [91] Ето затова през последните години DDAH се разглежда като потенциален терапевтичен таргет, особено в случаи на патологично повишени плазмени нива на ADMA. [82,91]

2.3. ADMA – биологична роля

ADMA е основен ендегенен инхибитор на NOS. Счита се, че ADMA и сродните му съединения могат да бъдат регулатори на каскадата L-аргинин-NO при физиологични и патофизиологични условия. Експериментални проучвания демонстрират, че ADMA инхибира NO-продукцията в степен, която е пропорционално зависима от плазмената концентрация на метиларгинина. Този ефект не се наблюдава при промени в концентрациите на другите два хомолога – SDMA и NMMA. [290] NO се синтезира от аминокиселината L-аргинин под действието на NOS. Биопродукт на реакцията е L-цитрулин, а кофактори са NADPH, флавин мононуклеотид, флавин аденин динуклеотид, тетрахидробиоптерин (BH₄) и калмодулин. След като бъде генериран, NO се разпространява в мембраната на ендотелните клетки и навлиза в гладкомускулните клетки, където активира гуанилат циклазата. Повишава се концентрацията на цикличния гуанозин-3',5-монофосфат (cGMP) и така се медираат биологичните ефекти на NO: контрол на съдовия тонус и тромбоцитна функция. [273] Различават се три изоформи на NOS, като обозначението им съответства на тъканта, в която са идентифицирани – ендотелна eNOS, невронална nNOS и индуцирана iNOS. И трите изоформи на NOS са Ca²⁺ / калмодулин зависими. В ендотелните клетки eNOS е локализирана в кавеолите – богати на холестерол и гликофинголипидни микродомени в плазмената мембрана, функциониращи като мобилни сигнални платформи. [11] eNOS се открива и в апарата на Голджи, където се съхранява незряла или свързана с интернализирани кавеоли. iNOS е идентифицирана за първи път в макрофагите и участник в цитотоксични и цитостатични механизми на тези клетки. iNOS се регулира предимно транскрипционно и в повечето клетки нормално не се открива. Активността на iNOS персистира с часове, ако е експресирана в отговор на имунологични стимули. Повишената експресия на iNOS, придружена от понижена експресия на информационна РНК (mRNA), отговорна за eNOS, се регистрират при исхемия, хиперхолестеролемия и наличие на реактивни кислородни форми (ROS). [11] В сърцето eNOS се експресира в ендотелните клетки и кардиомиоцитите, а nNOS – в митохондриите и саркоплазмения ретикулум на кардиомиоцитите. Потискането на NOS скъсява времето на кървене и ускорява тромбоцитната агрегация при здрави доброволци *in vivo*. [11] NO, образуван от ендотелните клетки, осигурява значителна вазодилатация в ССС. NO модулира левкоцитната експресия в микроциркулацията, посредством потискане на експресията на адхезионни молекули и неутрализиране на ROS. [40] Скоростта и обемът на

производство на NO зависят от активността на NOS. Инхибирането на NOS води до дисфункция на ендотела. Съдовият ендотел контролира балансираното освобождаване на различни вазоконстриктивни и вазодилатационни субстанции, регулира системите за коагулация и фибринолиза, като отделя и различни про- и противовъзпалителни медиатори. Нарушената ендотел-зависима вазодилатация се нарича ендотелна дисфункция (ЕД). Проявите на ЕД включват: повишен синтез и секреция на ендотел-продуцирани вазоконстриктори, агреганти, прокоагуланти и антифибринолитици; понижен синтез и секреция на вазодилататори, антиагреганти, антикоагуланти и фибринолитици; експресия на клетъчни адхезионни молекули за тромбоцити и левкоцити; синтез на цитокини и растежни фактори; повишена експресия на рецептори за липопротеини с ниска плътност; повишена продукция на реактивни кислородни форми и повишен пермеабилитет. [11]

2.4. ADMA – патогенетични механизми за развитие на ССЗ

Ключов механизъм за развитие на Т1Д е генетична предиспозиция и автоимунен отговор. Експресивното активиране на имунни клетки в съчетание с хронична хипергликемия води до освобождаване на голямо количество проинфламаторни фактори и вътреклетъчен оксидативен стрес. Дългосрочната гликемична експозиция при Т1Д се асоциира с повишена смъртност и висок риск от макро- и микроваскуларни усложнения. [290] Хипергликемията активира четири пътя, които имат водеща роля в развитието на ЕД. Това са полиолов път, хексозаминов път, активиране на протеин киназа С, формиране на крайни продукти на напреднало гликиране (AGE). ЕД предхожда атеросклерозата и е предпоставка за развитие на съдова болест при диабет. [146] Структурни и функционални промени в ендотела се откриват в малки и големи кръвоносни съдове още в началото на развитието на диабета, много преди регистрирането на микро- или макроваскуларни усложнения. [146] ЕД при Т1Д е мултифакторно обусловена: глюкотоксичност, липотоксичност, оксидативен стрес, митохондриална дисфункция и възпаление.

Концентрацията на ADMA в кръвта е под влияние на многофакторно обусловена регулация. Механизмите, които дефинират ролята на ADMA в етиопатогенезата на ССЗ при Т1Д, са обект на научен интерес. ADMA действа като медиатор на оксидативния стрес чрез инхибиране на NOS. Ниското ниво на NO предизвиква вазоконстрикция и повишаване на артериалното налягане. При експериментални изследвания е регистрирано незабавно повишаване на артериалното налягане след фармакологично блокиране на eNOS. [11] От друга страна, възпалението активира PRMT, инхибира DDAN и води до повишени нива на диметиларгинините. Установено е, че ADMA се абсорбира активно от ендотелните клетки, което води от 5 до 10 пъти по-ниски нива в екстрацелуларното пространство. [40]

Незначителни промени в плазмените нива на ADMA се асоциират с големи вътреклетъчни промени и модифициране на NO-продукцията. [290] Системната инфузия на ADMA при здрави доброволци води до незабавно повишаване на кръвното налягане и намален сърдечен ритъм. [27] Връзката между ADMA, NO, PRMT, DDAH и типа на диабета е комплицирана и подлежи на специфична генетична регулация. [82] Fogarty и сътрудници установяват различия между DDAH – генетични полиморфизми и серумни нива на ADMA при T1Д и T2Д (0,64 $\mu\text{mol/l}$ за T1Д, 0,70 $\mu\text{mol/l}$ за T2Д). [82] Активността на DDAH се инхибира от фактори като хипергликемия, оксидативен стрес, окислен LDL-холестерол и TNF- α . [82] Хиперхомоцистеинемия също инхибира експресията на DDAH2 чрез аберантно генно метилиране. HCY образува дисулфидни връзки с DDAH, като по този начин блокира свързването на ADMA и забавя разграждането му. SAM е хомоцистеинов прекурсор и донор на метиловата група в цикъла на аргининово метилиране. ADMA има две метилови групи и при неговия синтез се генерират две молекули HCY. Установено е, че плазмените нива на ADMA корелират положително с HCY при пациенти с хиперхомоцистеинемия. [11] Проучвания доказват, че инкубирането на ендотелни клетки с окислен LDL-холестерол води до повишени нива на ADMA в културелна среда поради намалена активност на DDAH. ADMA и окисленият LDL са част от порочен кръг, при който оксидативният стрес, предизвикан от повишени нива на окислен LDL, води до DDAH-инхибиране и повишени нива на ADMA. [27]

В заключение повишени нива на ADMA предполагат нисък NO и последващо васкуларно възпаление, окисление на липопротеини с ниска плътност, пролиферация на гладкомускулни клетки, ендотелна клетъчна апоптоза, генериране на ROS и адхезия на тромбоцитите. По този начин се насърчава развитието на атеросклероза.

2.5. ADMA – аналитични методи за количествено определяне

Разработени са голям брой аналитични методи, които позволяват количествено и качествено определяне на метиларгинини в плазма, серум, урина и тъкани: високоефективна течна хроматография (HPLC), ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), капилярна електрофореза, газова хроматография-мас-спектрометрия (GC-MS), течна хроматография-мас-спектрометрия (LC-MS), течна хроматография – тандемна мас-спектрометрия (LC-MS/MS). [271] HPLC – технологията позволява използването на разнообразни методи за разделяне (обратнофазова, йоннообменна, йонна хроматография), използване на различни елуиращи буфери и техники на детекция. HPLC и LC-MS/MS са широко прилагани аналитични методи за измерване на ADMA и свързани метаболити в плазма и урина. MS повишава специфичността на анализа, като позволява определянето на анализите според отношението маса-заряд (m/z) и характерните модели на фрагментация. [271]

В хроматографските методи се използва предколонната дериватизация с: о-фталалдеhid (OPA), нафтален-2,3-дикарбоксалдеhid (NDA), о-фенилендиамин, AccQ-Fluor™ (6-аминохинолил-N-хидроксисукцинимидил-карбамат), 4-флуоро-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол (NBD-F), нинхидрин, фенилизотиоцианат. [271] Дериватизацията се извършва в етапите на предварителна обработка поради незадоволителното задържане на полярните съединения в колоните с обратна фаза и липсата на присъщи хромофори за тези анализи. Използването на OPA в комбинация с различни тиолни съединения е най-широко използваният дериват. Причина за това е, че при относително меки условия (стайна температура) OPA в присъствие на тиоли реагира с първични аминогрупи и формира интензивно флуоресциращи деривати. Използват се 2-меркаптоетанол и 3-меркаптопропионова киселина с цел повишаване стабилността на производните на метиларгинин-OPA-деривати. [236,271] Доказано е, че пиковата площ на производните на OPA-деривати намалява с 5–10% за 20–25 часа и с 35% за 72 часа, което респективно повлиява прецизността на метода. [271] Деривати, образувани с NDA, са по-стабилни от тези с OPA. Стабилността им намалява с 6% за 24 часа и с 13% за 72 часа. При дериватизация с NDA, ADMA и SDMA могат да бъдат разделени без риск от припокриване. При MS използвани деривати са: OPA, NDA, бутанол и данизил хлорид. Schwedhelm и сътрудници публикуват първия базиран на LC-MS метод за разделяне на бутилови метаболити на метилирания аргинин чрез специфичен модел на фрагментация вместо хроматографско разделяне. [236]

LC-MS/MS се счита за златен стандарт при анализ на метиларгинини. [236] LC-MS/MS се характеризира с по-висока аналитична чувствителност и специфичност в сравнение с HPLC методите. При LC-MS/MS методи дериватизацията с бутанол дава възможност да се анализират голям брой метаболити като ADMA, SDMA, L-NMMA, аргинин, орнитин, цитрулин със средно време на работа от 5 минути след инкубация от 20 минути. [236] В етапите на предварителна обработка при HPLC и LC-MS/MS методите се прилагат процеси като твърдофазова екстракция (SPE), утаяване на протеини, изпаряване и ултрафилтрация за предотвратяване на интерфериращия ефект на други компоненти в матрицата на пробата. Утаяването обикновено се постига с 5-сулфосалицилова киселина, метанол, етанол, ацетонитрил. [271] Посочените аналитични методи са достъпни за малък брой клинични лаборатории и изискват наличие на високоспециализирана апаратура, с което се възпрепятства приложението им в рутинната практика. През 2021 година са публикувани резултати от проучване, което представя лабораторни данни за HPLC и LC-MS/MS аналитични методи при количествено определяне на ADMA и хомоложни метаболити. [271] В таблица 1 са включени някои от докладваните резултати през последните 10 години. (табл. 1)

Таблица 1. HPLC и LC-MS/MS методи за определяне на ADMA в плазма, серум и урина

Метод	Аналит	Дерва- тизация	CV%	LOD/LOQ	Линейност	Биологичен материал	Време	Лит. източник
HPLC-FD	ADMA, SDMA, ARG	OPA/ME	<5%	NA/0.01 µmol/l	12 nM-0.5 µmol/L	Плазма	20 мин	Schou- Pedersen et al.,2018
HPLC-FD	ADMA, SDMA, NMMA, ARG	OPA/MPA	<5%	≤0.007 µmol/L/L/NA	0.007-150 µmol/l	Плазма	20 мин	Alkaitis et al., 2014
HPLC-FD	ADMA, CIT, ARG	OPA/ME	<7%	0.05 mM/NA	0.007-150 µmol/l	Плазма	66 мин	Rao et al., 2017
HPLC- PDA	ARG,HARG, ADMA, SDMA, HCY	PITC	1.37- 9.67%	17.6/53.3 pmol	0.3- 3.75 mM	Плазма Серум	30 мин	Ravula et al., 2018
ESI-LC- MS/MS	ADMA, SDMA, HARG	APDS	2.53- 8.05%	NA/0.25 µmol/l	0.05-2 µmol/l	Плазма	19 мин	Arashida et al, 2017
ESI-LC- MS/MS	ARG,MMA, HARG, ADMA, SDMA,CIT	DEPC	3.11- 3.88	0.01-0.03 µmol/l	0.31-5 µmol/l	Плазма	10 мин	Sotgia et al., 2019
LC-QTOF- MS	ADMA, SDMA, methionine, ARG,HCY, SAM,SAH, betaine,creat ine,creatinin e,cysteine, glutathione	NA	1- 12.4%	NA	159 n/mL- 1.4 µg/mL	Плазма	19 мин	Benito et al., 2015
ESI-LC- QTOF-MS	ARG,CIT, ADMA, CAN, SDMA	PFBC	2.23- 12.4%	0.03-0.01 µmol/l	0.05-2.5 µmol/l	Серум	14.5 мин	Wisniewsk i et al., 2017
ESI-LC- MS/MS	ARG, MMA, ADMA, SDMA	NA	2.5- 3.6%	0.019-0.064 µmol/l	0-150 µmol/l в урина; 0- 3 µmol/l в плазма	Плазма Урина	9.5 мин	Andradei et al., 2015
ESI- UPLC- MS/MS	ADMA, SDMA	HCL и n-бутанол	2- 7.79%	7.9-23.7 nM	0.1-4.94 µmol/l	Серум	10 мин	Boelaert et al., 2016
ESI-LC- MS/MS	ADMA	NA	3.81- 8.81%	NA - 20 ng/ml в плазма NA - 50 ng/mL в урина	20- 1000 ng/ml в плазма 50- 2000 ng/ml в урина	Плазма Урина	7 мин	Jing et al., 2015
LC-ESI- QTOF-MS	ADMA, SDMA, ARG,CIT	Бензоил хлорид	3.07- 14.9%	0.03-0.08 µmol/l	0.05-2.5 µmol/l	Серум	10 мин	Fleszar et al., 2018
ESI-LC- MS/MS	DMG,ARG, ADMA, SDMA, HARG, methionin e, choline, creatinine	NA	5.2- 7.8 %	0.08-0.16 µmol/l	0.08-5 µmol/l	Плазма	4.2 мин	Midttun et al., 2013

Легенда: ARG, аргинин; HARG, хомоаргинин; CIT, цитрулин; ME, меркаптоетанол; MPA, 3-меркаптопропионова киселина; PITC, фениллизотиоцинат; APDS, 3-аминопиридил, N-сукцинимидил карбамат; DEPC, диетилпирокарбонат; PFBC, пентафлуоробензоил. Източник: <https://doi.org/10.1515/tjb-2020-0150>

Създаден е и специфичен имунологичен анализ – ELISA, който е широкодостъпен за големи клинични проучвания. Методът се отличава с лекота на изпълнение, сравнително ниска цена и възможности за автоматизация на всеки етап от анализа. При ELISA неизвестно количество антиген е имобилизирано към твърдофазова повърхност, след което се прилага специфично антитяло, така че да може да се свърже с антигена. Към антитялото е свързан ензим, а в крайния етап се добавя субстрат, специфичен за ензима и като резултат се променя цветът, което се детектира колориметрично. Schulze и сътрудници за първи въвеждат ELISA за количествено определяне на ADMA като оценяват аналитичната надеждност на метода и неговата сравнимост с LC-MS/MS и GS-MS. [234] Определена е граница на количествено определяне (LOD) – 0,05 $\mu\text{mol/l}$, и кръстосана реактивност: 1,2% с SDMA и <0,02% с L-аргинин. Изследователите установяват значима корелация между серумни нива на ADMA, определени с ELISA и LC-MS/MS ($r = 0,984$ $p < 0,0001$), и респективно с GS-MS ($r = 0,991$ $p < 0,0001$). [234] Според други изследователи ELISA-определените концентрации на ADMA в плазма и серум са по-високи спрямо тези с HPLC метод, като установената разлика в измерените плазмени нива се увеличава пропорционално на концентрацията на ADMA. [107] Проведен е и сравнителен анализ между измерени стойности на ADMA в серум, хепаринова и EDTA-плазма, определени чрез HPLC и ELISA-аналитични методи. Не са установени сигнификантни различия между серумни нива на ADMA и тези в хепаринова плазма ($0,57 \pm 0,10 \mu\text{M}$ спрямо $0,56 \pm 0,10 \mu\text{M}$ за HPLC и $0,73 \pm 0,17 \mu\text{M}$ спрямо $0,72 \pm 0,16 \mu\text{M}$ за ELISA), а определените в EDTA-плазма са докладвани сигнификантно по-ниски от тези в хепаринова плазма ($0,52 \pm 0,10 \mu\text{M}$ $p < 0,005$ за HPLC и $0,65 \pm 0,17 \mu\text{M}$ за ELISA). [107] Не са докладвани аналогични различия по отношение на SDMA. През 2017 г. са публикувани резултати от метаанализ за сравнение на референтни граници за ADMA в плазма чрез HPLC и ELISA аналитични методи. (табл. 2) [183] У нас през 2011 г. Денева Т. и сътр. за първи път извеждат референтни граници на ADMA при здрави възрастни лица. Използван аналитичен метод е ELISA. [67]

Таблица 2. Референтни стойности на ADMA в плазма, определени чрез HPLC и ELISA

	HPLC-флуоресценция	HPLC- LS/MSn	ELISA (DLN)	ELISA (Immun diagnostic)
Референтен интервал	0.32 (0.28-0.37) – 1.14 (0.85-1.43) $\mu\text{mol/L}$	0.41 (0.28-0.53) – 0.87 (0.56-1.18) $\mu\text{mol/L}$	0.29 (0.20-0.39) – 1.03 (0.86-1.19) $\mu\text{mol/L}$	0.21 (0.12-0.65) – 0.82 (0.54-1.10) $\mu\text{mol/L}$
Средна стойност (при 95% доверителен интервал)	0.73 (0.56-0.89) $\mu\text{mol/L}$	0.64 (0.42-0.87) $\mu\text{mol/L}$	0.65 (0.55-0.74) $\mu\text{mol/L}$	0.50 (0.34-0.65) $\mu\text{mol/L}$

Източник: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177493.t001>

2.6. ADMA – клинично приложение

Повишени плазмени концентрации на ADMA са установени при редица заболявания като: хронична бъбречна недостатъчност (ХБН), хипертонична болест, хипертония при деца, прееклампсия, КАБ, болест на периферните артерии, СН, ОМИ, хипертиреоидизъм, хиперхолестеролемия, Т1Д и Т2Д, еректилна дисфункция и др. [1,12,40,7,135] Изследванията сочат, че при различните заболявания плазмените концентрации на ADMA се покачват най-много до 2 пъти над горна референтна стойност с изключение на ХБН, където стойностите са повишени до 5-7 пъти. [27,40,290] Следователно възниква въпросът как тези сравнително малки различия в измерените концентрации на ADMA са причина за големи промени в синтеза на NO и последващи значими хемодинамични последици. Установено е, че концентрациите на ADMA в кръвта са увеличени при жени със затлъстяване и доказана инсулинова резистентност, като нивата ѝ спадат след редукция на телесното тегло. [7] ADMA е медиатор на ЕД, а механизмите, които свързват биомаркера с развитието на ССЗ, са обект на голям научен интерес през последните години. Въпреки това не е напълно уточнено дали ЕД води до повишаване на ADMA или обратно. Ето затова ADMA се разглежда едновременно като обещаващ биомаркер и РФ за развитие на ССЗ. [135] Според някои автори ADMA има по-добра прогностична стойност спрямо установени биомаркери за ССЗ, а според други – допълваща роля в стратификацията на риска. [27,40,135]

Повишените плазмени нива на ADMA имат висока положителна предсказваща стойност за ССЗ, но все още няма унифицирана отрязваща стойност (cut-off value). [40] Според някои автори ADMA корелира значимо с „всички причини за смъртност“ и КАБ при лица със ЗД, докато при контроли без диабет тази зависимост не се установява. [307] При Т2Д високи плазмени нива на ADMA се асоциират предимно с тютюнопушене, ретинопатия и нефропатия, а при Т1Д – с понижена гломерулна филтрация и хипертония. [135] Установени са различия в бъбречната функция при Т1Д и Т2Д, а бъбречният клирънс определя около 20% от общия клирънс на ADMA при нормални условия. [288] Албуминурията се асоциира с възпалителни прояви, ЕД и оксидативен стрес при Т1Д. Според „хипотезата на Стено“ степента на албуминурията отразява степента на съдовото увреждане. [220] Докладвана е сигнификантна корелация между плазмени нива на ADMA и степен на албуминурия при при ЗД. [69,120,137,192,251] Връзката между ХБЗ и ССЗ при Т1Д е генетично обусловена. Установено е, че наличието на хаптоглобин 2-2 генотип предполага развитие на КАБ и ХБЗ едновременно при Т1Д. [192] Според препоръките на ADA рисковите фактори за развитие на ССЗ като хипертония, дислипидемия, тютюнопушене, ХБЗ и наличие на албуминурия следва да бъдат оценявани системно, най-малко веднъж в годината. [28]

Не на последно място, ADMA се определя и като потенциален терапевтичен таргет. [135] Експериментално е доказано, че статините модулират генната експресия на eNOS и при пациенти с повишени плазмени нива на ADMA подобряват ендотел-зависимата вазодилатация. [290] Друга група медикаменти, които са проучени и се свързват с намаление на плазмените нива на ADMA, са ACE-инхибитори, блокери на ангиотензинови рецептори, някои понижаващи кръвната глюкоза медикаменти, прием на естрогени, антиоксиданти и др. [40,43,135] Все още не е докладвана субстанция, която да интерферира предимно метаболизма на ADMA.

В обобщение, интересът към ADMA и ключовата ѝ роля в патогенезата на ССЗ прогресивно се увеличава. Повишените плазмени нива на ADMA имат висока положителна предсказваща стойност за ССЗ, но все още няма унифицирана cut-off стойност. Към момента не е установен и стандартизиран лабораторен метод за определяне на ADMA в плазма, серум и урина. Предвид докладваната висока честота на ССЗ и смъртност при Т1Д, въвеждането на ADMA като рутинен биомаркер е препоръчително с цел по-добро стратифициране на ССР и ефективност на терапията.

3. OPG

Остеопротегеринът (OPG или TNFRS11B според международната номенклатура) е член на тумор-некротизиращ фактор (TNF) – рецепторната фамилия и първоначално е описан като ключов регулатор в костния метаболизъм, а впоследствие е установен и в съдовата система. [199] TNF-рецепторната фамилия включва над 40 протеина и регулира биологични процеси като клетъчна диференциация, преживяемост и смърт. През 1997 г. Simonet и сътрудници изолират „новия цитокин“ и го наименоват „osteoprotegerin“ (лат.ез. „os“ – кост; „protegere“ – пазя) въз основа установен протективен ефект върху костите. [242] По същото време Tsuda и сътрудници откриват в експериментални условия на среда от човешки ембрионални фибробласти на бял дроб непознат свързващ протеин, който наричат инхибиращ фактор на остеокластогенезата (OCIF). [267] През 1998 г. Yasuda и съавтори правят заключение, че независимите една от друга изследователски групи всъщност анализират една и съща молекула – OPG/OCIF – представител на TNF-рецепторната фамилия, наричан впоследствие TNFRS11B и тропин редуктаза. [298] През 2000 г. Американското дружество за костни и минерални изследвания (ASBMR) унифицира наименованието на протеина като остеопротегерин. [29]

3.1. OPG – структура и синтез

OPG е секреторен гликопротеин с мономерна структура от 401 аминокиселинни остатъка (aa) и молекулна маса от 60кД. Различава се и хомодимерна форма (120 кД), образувана при дисулфидно свързване на цистенови остатъци (Cys400) от хепарин-свързващия домен на мономера. В състава на OPG-мономера има седем структурни домена: от 1 до 4 домени са богати на цистеин участъци, локализирани в N-терминалната част и сходни с екстрацелуларните домени на други рецептори от TNF-групата и с ключова роля в инхибирането на остеокластогенезата; 5 и 6 домени са разположени в карбоксиоилния край и съдържат хомоложни участъци с медиатори на апоптоза като рецептори на апоптоза-индуцираща лиганда (TNF – related apoptosis inducing ligand receptor, TRAIL-R), TNFR1, DR3 и др.; домен 7-хепарин-свързващ регион, локализиран в C-терминала и отговорен за взаимодействието на протеина с протеоглигани. [258] За разлика от останалите членове на TNF-рецепторната фамилия, OPG не притежава класическия хидрофобен трансмембранен домен. [2,223] След разцепване на сигнален пептид 21aa от N-терминала на мономера/димера, се образува 380aa функционално зрял OPG. Следователно циркулиращият плазмен OPG съществува под формата на свободен мономер от 60кД, дисулфидно-свързана хомодимерна форма от 120 кД или като OPG, асоцииран към неговите лиганди (TRAIL и RANKL). [223] Хомодимерната форма на OPG се отличава с по-голяма биологична активност спрямо мономерната. [33]

OPG е високо експресиран в различни тъкани като кости, сърце, бели дробове, бъбреци, черен дроб, костен мозък и имунна система (дендритни клетки). OPG се експресира *in vivo* от ендотелни клетки, съдови гладкомускулни клетки и остеобласти. При имунохистохимични изследвания OPG е установен в аортни и коронарни атеросклеротични плаки. [173] Минимално наличие на OPG е регистрирано в плацента, мозък и скелетни мускули, а според последни литературни данни, адипоцитите също експресират OPG. [173] Експериментални проучвания съобщават за експресия на OPG от неутрофилни гранулоцити. Докладвани са сигнификантно по-високи плазмени нива на OPG при септични пациенти спрямо контроли. [230]

OPG се кодира от гена TNFRSF11B с едно копие, разположен на хромозома 8, позиция 8q24 и съдържа 5 екзона. През последните години нараства броят на проучванията, фокусирани върху пряката връзка между генетичните полиморфизми на OPG-овия ген и развитието на различни патологични процеси. Всеки полиморфизъм е оценен при специфични заболявания (остеопороза, ревматоиден артрит, ракови заболявания, атеросклероза и ССЗ, метаболитни заболявания и др.). Например при пациенти с диабетни микро- и

макровакулари съдови усложнения е изследвана честотата на единичния нуклеотид A163G. [223] Генетичните механизми, лежащи в основата на регулирането на OPG-експресията и метаболитните заболявания, към момента не са напълно изяснени. Счита се, че плазмените нива на OPG са половозависими (в полза на жените) и се повишават с напредване на възрастта. [171] Наскоро беше доказано, че носителите на кръвни групи А и АВ имат по-високи плазмени нива на OPG спрямо носителите на кръвна група О. [178]

3.2. OPG – лиганди и биологична роля

OPG функционира като разтворим рецептор-примамка за лигандата на RANK (RANKL) и апоптоза индуцираща лиганда, близка с TNF (TRAIL). Свързването на лиганда променя формата и поведението на рецепторния протеин. Процесът на асоцииране–дисоцииране се осъществява чрез междумолекулни сили и е обратим. TRAIL и RANKL се отнасят към семейството на TNF-рецепторната фамилия. TRAIL и RANKL имат сравним афинитет за свързване с OPG. Последният се конкурира с RANK за свързване с неговата лиганда (RANKL), като по този начин неутрализира действието му върху клетките и инхибира активирането на остеокласти. [199] RANKL е трансмембранен гликопротеин, експресиран предимно върху повърхността на инфилтриращи Т-клетки, активирани ендотелни клетки и в по-малка степен в моноцитни прекурсори на остеокласти и дендритни клетки. [34,223] Освен мембрано-свързана форма (mRANKL), в кръвта циркулира и разтворима форма на протеина (sRANKL). RANK и RANKL не се откриват в нормално функциониращи кръвоносни съдове. [171] RANKL взаимодейства с три дисулфидно-свързани мономерни форми на RANK (хомотример) и така предизвиква активиране на ядрен фактор κВ (NF-κB) в целеви клетки. Следващ етап от сигналната трансдукция е свързването на TNFR/TRAF-протеини (протеини, свързани с рецептор на TNF) към специфични места в цитоплазмения домен на RANK. [223] OPG функционира като разтворим примамка-рецептор (decoy receptor) за RANKL. OPG свързва RANKL чрез своите богати на цистеин четири домена (CRD) в N-терминалния край и така инхибира RANK/RANKL системата. OPG потиска остеоκластогенезата и увеличава костната минерална плътност. RANK/RANKL системата повлиява биологични процеси и на имунната система. В тази връзка, някои изследователи предполагат ключова роля на OPG в регулацията на имунния отговор и модулиране на клетъчната преживяемост. [33] RANK генерира и множество вътреклетъчни сигнали чрез свързване с TRAIL. Последният е трансмембранен протеин тип II. След протеолитично разграждане на екстрацелуларния домен, TRAIL действа като разтворим цитокин (sTRAIL) и се открива в кръвта при физиологични условия. TRAIL и свързаните с него междинни рецептори показват широко разпространение в тъканите. Откриват се в съдови гладкомускулни и ендотелни клетки. TRAIL се кодира от ген,

разположен в хромозома 3 на позиция 3q26. [34] Основна функция на системата TRAIL/TRAIL-R е регулиране на апоптозата. TRAIL се свързва с неговите рецептори чрез хомотримерна си форма. TRAIL може да свърже до пет различни рецептора (R), за да активира сложни сигнални пътища в целеви клетки: DR (death receptor) 4 и DR 5, които индуцират клетъчна апоптоза и DcR1, DcE2 и OPG – рецептор-примамка (decoy receptor). OPG/TRAIL комплексът инхибира TRAIL-индуцираната клетъчна апоптоза на туморни клетки, вирусно инфектирани и свръхактивирани имунни клетки. OPG блокира апоптозата на костни туморни клетки чрез свързване с TRAIL, а от друга страна ограничава развитието на туморните клетки чрез свързване с RANKL. Относителната концентрация на TRAIL и RANKL определя баланса между двата процеса. За разлика от други проапоптотични лиганди, TRAIL индуцира апоптоза в трансформирани клетки, а действието му в непатологичните клетки е ограничено. Конкурентните взаимодействия в триадата RANKL/TRAIL/OPG взимат участие и в многобройни патофизиологични процеси на съдовата система. [34]

OPG има и директни, независими от лиганд действия върху костите, съдовата и имунната система, медирано от взаимодействието на протеина с: глюкозаминогликани (GAGs), протеоглици (PGs), синдекан-, фактор на фон Вилебранд (vWF) и фактор VIII/vWF комплекс. През 2005 година Zannettino и сътрудници установяват наличие на OPG в ендотелни тела на Вайбел Палад, където цитокинът е свързан с vWF. [301] OPG се открива в комплекс с vWF в алфа-гранули на тромбоцити и мегакариоцити. [33] OPG- свързващия участък с vWF има общ домен с GPIIb-протеина, който улеснява инициалната тромбоцитна адхезия. Счита се, че афинитетът на vWF към OPG е сравним по сила с този на OPG към RANKL. [33] Така описаният vWF/OPG комплекс предполага ключова роля в регулацията на ендотелно-клетъчната преживяемост, остеокластна диференциация, съдово увреждане, възпалителни процеси и тромбофилията. [33] Фактор VIII/vWF комплексът също е описан, че се свързва с OPG като блокира взаимодействието му с TRAIL. В допълнение се ускорява и OPG-предизвиканото инхибиране на RANKL-индуцираната остеокластогенеза. Следователно е налице пряка зависимост между регулацията на костна и съдова система. Тази хипотеза е подкрепена от рандомизирани проучвания за приложение на рекомбинантен фактор VIII и превенция на ставни увреждания при подрастващи хемофилици, вероятно въз основа потискане на остеокластогенезата. [33]

OPG се свързва с голям брой GAGs посредством своя хепарин-свързващ домен. GAGs са линейни полимери на повтарящи се дизахаридни единици. С изключение на хепарин и хиалуронова киселина, GAGs присъстват в тялото под формата на протеоглици (PGs). С най-висок афинитет се откроява хепаринът. In vitro проучвания показват бърз ефект на

освобождение на OPG от гладкомускулни клетки след хепариново приложение. При интравенозни инфузии с хепарин на здрави лица е наблюдавано 2,2-кратно увеличение на циркулиращи нива на OPG спрямо изходните в рамките на 5 минути. [199] Така GAGs действат директно върху остеокластогенезата. Vaudhuin и сътрудници установяват, че хепаринът и други GAGs инхибират диференцирането на остеокластни прекурсори чрез потискане на клетъчната адхезия. В противовес на тази теза, според други автори, свързването на GAGs с OPG предотвратява OPG-медираната диференциация на остеокласти и следователно GAGs стимулират костната резорбция. В заключение GAGs също се считат за регулатори на OPG-експресията и противотуморната активност в микросреда на костен тумор. [34]

Съществува пряка връзка между остеогенезата и ангиогенезата, която може да бъде проследена до ранен ембрионален стадий на човешкото развитие. [223] Бързата пролиферация на хондроцитите предизвиква хипоксия и инхибиране на хидроксилирането на хипоксия-индуциращ фактор 1 α . По този начин се стимулира производството на съдов ендотелен растежен фактор и последваща пролиферация и миграция на ендотелните клетки. Образува се съдова мрежа, която доставя кислород и хранителни вещества за по-нататъшното развитие. [276] По време на ембриогенезата, хематопоеичните и съдовите клетки произлизат от общ прекурсор, наречен хемангиобласт. Остеобластите, ендотелните и стромалните клетки на костния мозък също произлизат от тази клетъчна линия. В последните проучвания се анализира предимно връзката между съдова физиология/патофизиология и регулаторни костни протеини. [223]

3.3. OPG – патогенетични механизми за развитие на ССЗ

Ролята на OPG при ССЗ подтикна изследователите да се опитат да разкрият преплетените пътища, чрез които се медира установеното проатерогенно действие на протеина при хора. Според първите проучвания, които оценяват ефектите на OPG върху васкулатурата, цитокинът има защитна роля спрямо артериална калцификация. Селективното инхибиране на OPG-експресията при мишки води до ранна проява на тежка остеопороза и значимо калцифициране на аорта и бъбречни артерии. [233] Въпреки това в друго проучване с LDL-дефицитни мишки, хранени с атерогенна диета и третирани с OPG, се установява намаление на калцификацията в плаките, но без повлияване прогресията и тежестта на атеросклерозата.

В проучвания при хора е описана значима връзка между циркулиращия OPG и съдовата калцификация. Доказано е, че OPG медира развитието на съдова калцификация. [223] Съдовата стена съдържа прекурсори на остеокластите под формата на моноцити и процесът на трансдиференциация дава на съдовите гладкомускулни клетки остеогенен фенотип.

Васкуларната калцификация е активен клетъчно-медиран процес и подобно на остеогенезата включва експресия на регулаторни костни протеини. [223] Редица изследователи впоследствие установяват експресия на OPG в атероматозни плаки. [233] Счита се, че отчетените OPG-нива корелират значимо с площта на калциране при атеросклеротичен процес. [31] Следователно OPG участва в патогенетичните механизми за развитие на атеросклероза, калцификация и ССЗ.

При *in vitro* проучвания OPG е описан като инхибиращ фактор на ендотелната апоптоза, а при *in vivo* – благоприятства неоваскуларизацията. [172] В допълнение, OPG ускорява пролиферацията на ендотелните клетки в микросъдовете; стимулира експресията на адхезионни молекули и моноцитно свързване с ендотелните клетки; в атероматозните плаки увеличава инфилтрацията на макрофаги, а в съдови гладкомускулни клетки увеличава пролиферацията, миграцията и намалява калцификацията. [172] Ето затова се предполага тезата за компенсаторно повишени концентрации на OPG в отговор на сърдечно-съдова патология. [172] Установено е, че TNF- α и IL-1 β индуцират синтеза на OPG и активирането на ендотелни клетки чрез провъзпалителни цитокини. По литературни данни човешките гладкомускулни клетки продуцират големи количества OPG – до 30 пъти повече от ендотелните клетки след стимулиране с TNF- α . [188]

Представени са резултати за пропорционално увеличение на експресията на адхезионни молекули като E-селектин, VCAM и SCAM при инкубиране на човешки ендотелни клетки от пъпна връв с нарастващи концентрации на OPG и TNF- α *in vitro*. [276] Концепцията, че OPG насърчава развитието на атеросклероза, се подкрепя от редица „*in vitro*“ проучвания, които демонстрират провъзпалителни и профибротични ефекти на цитокина върху васкулатурата. За да се съгласуват тези резултати с направените изводи от проучвания с животински модели, се предполага първоначална експресия на OPG с антиатерогенно действие и последващо стимулиране на възпаление и фиброза. Атеросклерозата се счита за възпалително заболяване на съдовете. В присъствие на възпалителни цитокини, травма или съдово увреждане, активираните клетки експресират OPG. Последният стимулира експресия на адхезионни молекули (ICAM-1 и VCAM-1) и E-селектин и левкоцитна адхезия към ендотелните клетки – ключова стъпка в патогенезата на атеросклерозата. Моноцитната и неутрофилната инфилтрация е контролирана главно от хемокини, а тяхното образуване от iNOS – генериран NO. OPG е предложен като маркер за ЕД. [223] Установена е независима положителна връзка между OPG и артериална скованост, оценена чрез скорост на пулсовата вълна, както и между ADMA и OPG като маркери за ЕД. [54,176,266,289]

OPG влияе и върху производството на молекули, отговорни за стабилността на атеросклеротичната плака – матриксни металпротеинази (ММР). Повишената активност на ММР води до разграждане на извънклетъчния матрикс, намалена дебелина на „фиброзната капачка“ и образуване на тромби. RANKL повишава активността на ММР в съдовите гладкомускулни клетки, а OPG се предполага, че неутрализира този ефект като инхибира свързването му с RANK. Това твърдение е вярно при високо съотношение OPG/RANKL, а при ниско – във възпалителни тъкани, OPG повишава активността на ММР. В ендотелните клетки е докладвана връзка между оксидативен стрес и RANKL. Инкубирането на ендотелни клетки с окислен LDL-холестерол и H₂O₂ повишава експресията на RANKL по дозозависим начин. [33]

RANKL, RANK и OPG участват в процеса на атеросклероза и чрез промяна в липидния метаболизъм. Синдекан-1 е PG, който се асоциира с увеличаване на локалната RANKL-концентрация и респективно развитие на остеолиза. PGs участват в OPG-индуцирания хемотаксис на моноцитите. OPG взаимодейства със синдекан-1 и стимулира клетъчната миграция. OPG се счита за моноцитен хемотаксичен фактор с участие в инфламаторни процеси. OPG може да насърчи развитието на атеросклероза и чрез стимулиране на системно възпаление и активиране на ренин-ангиотензин системата (RAAS). [33]

Ефектите на TRAIL в развитието на атеросклероза са медираны от способността му да индуцира апоптоза на инфилтриращите макрофаги в плаката и съдовите гладкомускулни клетки. Счита се, че TRAIL регулира производството и освобождаването на простаноиди, увеличава синтеза на NO, противодейства на левкоцитната адхезия и потиска системното и тъканното възпаление. [34] Следователно, противно на OPG, TRAIL има антиатерогенно действие.

3.4. OPG – аналитични методи за количествено определяне

Интересът към OPG и ключовата му роля в патофизиологията на редица ССЗ прогресивно се увеличава. За да се имплементира в клинично-лабораторната практика като потенциален биомаркер за оценка на ССР, е необходимо идентифициране и стандартизиране на преданалитичните и аналитични променливи. Настоящите ELISA методи за определяне на OPG в серум/плазма не разграничават мономерна, димерна и свързана форма, както и вида на молекулата спрямо източника на експресия. [200] Идентифицирането на тъканни изоформи потенциално ще увеличи прогностичната стойност на OPG като биомаркер. В лабораторната практика аналитични методи за определяне на OPG са предимно ELISA и имунофлуоресцентен метод (IFMA). Не открихме литературни данни за проведен сравнителен анализ между двата имунологични метода за определяне на OPG.

Clancy и сътрудници сравняват голям брой търговски ELISA китове за определяне на OPG въз основа аналитичните характеристики на анализите. [56] Отчетен е висок коефициент на корелация между успоредно изследвани проби с различните китове, но при значим коефициент на вариация. Според изследователите отчетените разлики в измерените концентрации на OPG са резултат от използването на различни вътрешни стандарти. Това води и до разлики в LOD (65 pg/mL за R&D DuoSet, 115 pg/mL за BioVendor и 1,4 pg/mL за Biomedica). Средният аналитичен добив (recovery%) е $57 \pm 7,5\%$ за DuoSet, $83 \pm 5,0\%$ за BioVendor и $58 \pm 9,0\%$ за Biomedica ELISA (n = 8). [56] В допълнение, Naylor и сътр. предполагат кръстосаната реактивност между различните молекулни форми на OPG: мономер, димер и свързана форма. [182] Към момента не е установена стандартна оперативна процедура за аналитично определяне на OPG.

Използван биологичен материал за аналитично определяне на OPG е серум или плазма. Perez C. и сътрудници представят сравнителен анализ между отчетени концентрации на OPG в серум и плазма (цитратна, EDTA и хепаринизирана) на здрави лица без анамнеза за придружаващи ССЗ или РФ (n = 45; 46,7% мъже на средна възраст 32 години). Отчетените резултати са в pg/ml и сигнификантно по-ниски в серумни спрямо плазмени проби (1015 \pm 357 pg/ml за серум спрямо 1314 \pm 448 pg/ml за EDTA-плазма; 1209 \pm 417 pg/ml за хепаринизирана плазма и 1260 \pm 498 pg/ml за цитратна плазма, p < 0,0001). Изследователите използват R&D DuoSet ELISA кит и извеждат референтни стойности за OPG в зависимост от вида на спесимена и адитива/антикоагуланта. [200]

Таблица 3. Референтни стойности на OPG (pg/ml) в серум и плазма (цитратна, EDTA и хепаринизирана)

	Серум	EDTA (плазма)	Хепарин (плазма)	Цитрат (плазма)
2,5 перцентил	361 pg/ml	648 pg/ml	426 pg/ml	372 pg/ml
97,5 перцентил	1717 pg/ml	2413 pg/ml	2188 pg/ml	2489 pg/ml

Източник: DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2014.05.006

Преданалитични фактори като транспорт, забавена обработка, центрофугиране или съхранение също следва да бъдат контролирани и стандартизирани. Увеличението на силите на центрофугиране не променя концентрацията на OPG. Отделянето на серума следва да се извърши възможно най-скоро – в рамките на 30 минути. Серумните проби са по-стабилни и е за предпочитане да се съхраняват при 4°C при максимален период от 24 часа. По-дълго съхранение се препоръчва при -20°C или при -70°C. Концентрацията на OPG се увеличава след няколко цикъла на замразяване–размразяване и затова се препоръчват максимум три, за да се минимизира този ефект. [200]

Bernardi S. и съавт. изследват влиянието на пола върху серумните концентрации на OPG при здрави лица (n = 104; мъже 35% при средна възраст 22 години). Направен е извод, че жените имат по-високи нива на OPG. Тази констатация е в съответствие с предходна теза, че жените в пременопауза имат по-високи нива на OPG в сравнение с мъже на възраст под 50 години. [34,56,129] Предложеното обяснение е въз основа на стимулиращия ефект, който естрогенът упражнява върху експресията на OPG в остеобластните клетки. [34]

3.5. OPG – клинично приложение

Независимо от водещото клинично значение на OPG по отношение участието му в костния метаболизъм, в настоящия дисертационен труд целим да поставим акцент върху атерогенния ефект на протеина при лица с дългогодишен Т1Д. Редица изследователи съобщават резултати за висока серумни нива на OPG и положителна корелация с тежестта на атеросклеротичната лезия, СН, нестабилна стенокардия и ОМИ. [264] Описани са множество връзки между циркулиращия OPG и сърдечно-съдови РФ: възраст, тютюнопушене, хипертония, инсулинова резистентност, затлъстяване, ЗД и бъбречно увреждане, както и възпалителни заболявания.

OPG отразява кумулативната експозиция и тежестта на известни и нововъзникнали съдови РФ. Счита се, че OPG е надежден индикатор за цялостната активност на системата OPG/RANK/RANKL. [265] Много изследователи подкрепят хипотезата, че продължителната свръхекспресия на OPG провокира профиброзни, провъзпалителни (моноцитен хемотаксис), проапоптозни (на гладкомускулни клетки) и дестабилизиращи плаките (освобождане на MMP) свойства. [35,247,264,304] Докладвана е повишена OPG-експресия при пациенти с нестабилна стенокардия в сравнение със стабилна стенокардия. [35] Оказва се, че OPG има дихотомична роля: при здрави индивиди проатерогенния и антиатерогенните ефекти се поддържат в добър баланс, но в условия на постоянна индукция от различни РФ (пример ЗД), проатерогенният път доминира. [36]

Измерените OPG-концентрации са значимо по-високи при пациенти с ХБЗ спрямо съответстващи по пол и възраст контроли и нарастват пропорционално с влошаване на бъбречната функция. [230] Подобни изводи са направени и при пациенти на хронично хемодиализа: отчетена е и сигнификантна права зависимост между OPG и степента на аортна калцификация, оценена чрез компютърно томографско изследване. [230] Предполага се, че повишените нива при лица с ХБЗ са резултат от нарушен OPG клирънс. В подкрепа на това твърдение е отчетено понижаване в серумните нива на OPG след проведена бъбречна трансплантация. [223] Според други автори повишената експресия на OPG при ХБЗ е следствие на компенсаторен механизъм срещу множество проатерогенни и

прокалцификационни фактори или развитие на хронично нискостепенно възпаление и формиране на порочен кръг от възпаление–ЕД–атеросклероза–калцификация. [223] Повишеният OPG се асоциира с висок 5- и 10-годишен риск от намалена eGFR, хоспитализация поради развитие на ХБЗ и/или смърт на възрастни жени. [34]

ЗД е свързан с повишен риск от ССЗ, както и с повишен риск от загуба на костна маса и прогресия на остеопороза. [55] Връзките между костния метаболизъм и Т1Д са предмет на обстойно изследване в последните години. Измерените серумни концентрации на OPG корелират значимо с костната маса и плътност. [54,74] Хроничната хипергликемията при пациенти с Т1Д предполага ускоряване на остеоκластогенезата чрез активиране пътя на инсулиновия растежен фактор (IGF). [55] Редица изследователи установяват, че с увеличаване давността на Т1Д намалява костната минерална плътност и се увеличава рискът от фрактури. [237,259,278] Описана е и сигнификантна положителна зависимост между давността на Т1Д и отчетените OPG нива като механизмите за това не са напълно изяснени. [74]

В опит да се прецизира ролята на OPG при развитие на атеросклероза, се съобщава за връзката на протеина с маркери за ЕД при пациенти с Т1Д и Т2Д. [223] OPG се дефинира като надежден лабораторен маркер с предиктивна стойност за ССЗ при ЗД. Патологично повишени плазмени нива на OPG предсказват обща и сърдечно-съдова смъртност при пациенти с диабетни усложнения. [223] Roshette L. и съавт. установяват значима връзка между измерените концентрации на OPG и маркери за ЕД и нестабилност на атеросклеротичната плака. [223] У нас OPG е проучен детайлно при мъже с Т2Д в ранната, субклинична фаза от диабетната еволюция, при която липсват известни ССЗ. [41] По литературни данни са докладвани повишени стойности на OPG при пациенти с Т1Д. [96,219,243] Сигнификантна положителна корелация е рапортувана между стойности на OPG и HbA1C при пациенти със ЗД. [80] След направено проучване са регистрирани по-високи серумни нива на OPG при лица с Т1Д спрямо здрави контроли ($p < 0,0001$), като е установена права зависимост с глюкозните концентрации ≥ 7 mmol/l и степента на албуминурия ≥ 30 mg/24h. OPG е отчетен сигнификантно повишен при пациенти с ДБЗ. [31]

Повишени серумни нива на OPG при лица с Т1Д се асоциират с развитие на „тиха миокардна исхемия“, независимо от пола. [172] В съответствие с предходни изследвания на други автори, Elsamahy M. и сътрудници отчитат сигнификантно и пропорционално повишение на OPG при лица с Т1Д и наличие на ДБЗ. [74] Диабетната ангиопатия е дългосрочен процес. Плазмените нива на OPG са сигнификантно повишени при пациенти с диабетни микроваскуларни увреждания. Установени са значими корелации между OPG и степента на бъбречна функция, гликиран хемоглобин и систолно кръвно налягане. [54,223]

В заключение изследователският интерес към OPG като потенциален биомаркер за оценка на ССР при ЗД прогресивно нараства. Интерпретацията на резултатите е сложна поради липсата на стандартизация в преаналитичен и аналитичен етап. Необходими са допълнителни проучвания, за да се оцени прогностична и диагностична стойност на маркера. Не намерихме цялостни изследвания, свързани с анализа и възможностите на биомаркера спрямо оценката на ССР при Т1Д в България. Имплементирането на OPG в клинично-лабораторната практика се препоръчва с цел по-добро стратифициране на ССР и ефективност на терапията.

4. ADNC

Най-разпространеният адипокин, секретирани от адипоцитите, е ADNC. За първи път е идентифициран и описан през 1995 г. и 1996 г. от четири независими изследователски групи, които използват следните имена: желатин-свързващ протеин-28 (GBP-28), протеин, свързан с адипоцитния комплемент (ACRP30), AdipoQ и apM1. [128,240]. ADNC се кодира от AdipoQ-ген, разположен на хромозомен локус 3q27(129) – област, известна като влияеща върху генетичната чувствителност към ЗД, метаболитен синдром, затлъстяване и ССЗ. [240] Адипокинят има защитен ефект върху невроните и нервните стволони клетки. Ето затова ADNC е обект на непрекъснат научен интерес в различни направления.

4.1. ADNC – структура и синтез

Човешкият ADNC е белтък, изграден чрез поликондензирането на 244 аминокиселини с молекулно тегло от 28 кДа. [185] В мономерната структурата на ADNC се отдиференцират: сигнална част в NH₂-терминала, вариабилна домена, която е видоно специфична; колагенова домена и С-терминална глобуларна домена, хомоложна на имунния комплемент C1q. Три сферични домона, позиционирани в N- и С-края, се свързват с помощта на шарнира Pro104-Tyr109, който служи като връзка между два мономера. Посредством нековалентно свързване на колагеновите опашки се образуват димери и тримери, наричани нискомолекулни форми на ADNC (LMW). По-нататъшни дисулфидни мостове и посттранслационни модификации водят до изграждане и извънклетъчно освобождаване на форми със средно и високо молекулно тегло (MMW и HMW). [50] ADNC споделя структурна хомоложност с протеини от семейството на TNF. Хормонът циркулира в кръвообращението под формата на тримери (около 90 кДа), хексамери (около 180 кДа) и мултимери (HMW) (повече от 400 кДа). ADNC с пълна дължина на молекулата може да претърпи протеолитично разцепване, чийто протеолитичен фрагмент съответства на глобуларния ADNC. Надлъжната форма обикновено не се открива при

физиологични условия поради висока термодинамична нестабилност. HMW се счита за преобладаваща и биологично най-активна структура на протеина. [17]

ADNC се синтезира вътреклетъчно от адипоцитите. След подлагане на посттранслационни модификации като гликозилиране и хидроксилиране, хормонът попада в кръвния ток. ADNC упражнява плейотропни ефекти: участва в различни физиологични механизми като регулира въглехидратна и липидна обмяна, енергийни нужди, имуен отговор, възпалителни процеси и инсулинова чувствителност.

4.2. ADNC – елиминиране

ADNC се елиминира от кръвообращението главно чрез метаболизиране в черния дроб, частично с жлъчния път и вторично от бъбреците. [99] Адипонектиновите мономери и димери преминават свободно през гломерулната филтрационна бариера, в резултат на което ADNC може да бъде количествено определен в урината на здрави индивиди. [122] Адипокинът обикновено присъства в ендотелни и гладкомускулните клетки на интрареналните артерии/артериоли и в ендотела на гломерулните и перитубулните капиляри, но може да бъде открит и в проксималните и дисталните тубулни епителни клетки. [204] Счита се, че протеолитично разцепване на хормона, свързан с гломерулния ендотел, причинява разграждане на HMW и последваща нискостепенна екскреция на мономери и димери в урината на здрави индивиди. Проксималните тубулни клетки също секретират ADNC, който допринася в известна степен за общото му количество в урината. [204] Въпреки че мономерите и димерите са единствените изоформи на адипокина, открити в урината на здрави индивиди, при пациенти с патологична албуминурия тримерни форми също се екскретират в значителна степен. [240] Следователно при пациенти с микро/макроалбуминурия мономерите, димерите и тримерите са доминиращите изоформи на ADNC в урината. Съобщава се, че HMW се открива минимално в урината на пациенти с протеинурия, вероятно поради дисфункционална гломерулна филтрационна бариера. [240] Серумните нива на ADNC могат да бъдат намерени чрез използване на следното уравнение [53]:

$$\text{ADNC в плазма/серум} = \text{скорост на уринна ADNC екскреция (uAdnER)} / \text{ADNC клирънс.}$$

Този предложен път на бъбречно биоразграждане/екскреция на ADNC се основава предимно на индиректни експериментални данни. Необходими са допълнителни проучвания за изследване механизмите на бъбречно елиминиране.

4.3. ADNC-рецептори и биологична роля

ADNC се свързва със седем трансмембранни рецептора, класифицирани в три групи: AdipoR (с два подтипа: AdipoR1 и AdipoR2), T-кадхерин и калретикулин. [240] За разлика от класическите G-протеин-свързани рецептори, AdipoR рецепторите имат цитоплазмен NH₂-край и извънклетъчен COOH-терминален домейн. [295] AdipoR1 е експресиран най-обилно в скелетните мускули, докато AdipoR2 – предимно в черния дроб. Свързването на ADNC с AdipoR1 води до последователно активиране на аденозин монофосфат-активиран протеин киназен път (AMPK), на пероксизомен пролифератор, активиращ рецептор алфа (PPAR- α) път. Активирането на AMPK стимулира процеси, които имат за цел да увеличат АТФ. Те включват повишен транспорт на глюкоза, митохондриална биосинтеза и окисление на мастни киселини. [124] Следователно активирането на AMPK провокира преминаване от съхранение на енергия към производство на АТФ и разсейване на енергия (намаляване на бялата мастна тъкан и затлъстяване). ADNC косвено възстановява инсулиновата чувствителност чрез индуциране окисление на мастни киселини и намаляване нивата на свободни мастни киселини и ектопично отлагане на липиди. [285] Следователно индуцираното от ADNC активиране на AMPK помага да се ограничат последствията от прехранването, а по този начин и индиректно възстановяване на инсулиновата чувствителност. В черния дроб AdipoR1 активира AMPK пътя и потиска чернодробната глюконеогенеза, *de novo* липогенезата и насърчава окислението на мастни киселини. [224] От друга страна, свързването на ADNC с AdipoR2 индуцира активиране на PPAR- α , увеличава експресията на разединяващ протеин-2 (UCP-2) и така стимулира изгарянето на мастни киселини. [240] По така описания механизъм се регулират глюкозен и липиден метаболизъм, оксидативен стрес и възпалени процеси. [240] В допълнение, чрез своите рецептори AdipoR1 и AdipoR2, ADNC индуцира активиране на керамидаза и така подобрява инсулиновата чувствителност и забавя производството на глюкоза в черния дроб. [240] AdipoR1 и R2 се експресират и в човешки първични остеообласти, в макрофаги на костен мозък и стимулират диференциацията на остеоκластите. Съществува отрицателна връзка между концентрациите на ADNC в кръвта и костната минерална плътност. [180] Тримерните и хексамерните форми на ADNC са описани, че действат в централната нервна система, като регулират апетита, разхода на енергия и дори предизвикват антидепресантни ефекти. [150]

T-кадхеринът е идентифициран като рецептор за хексамерни и НМW форми на ADNC, но не и за тримерни и глобуларни форми. [240] T-кадхерин е високо експресиран в ендотелните клетки; в клетките на гладката мускулатура, в скелетната мускулатура и сърдечния мускул; в неврони и в мезенхимни стволови/стромални клетки (MCS). [132] Взаимодействието между ADNC и T-кадхерин води до понижаване на керамидите –

механизъм за защита срещу различни увреждания на органи и тъкани от метаболитни нарушения. Установено е например, че T-кадхеринът в сърцето медира защитните ефекти на ADNC срещу исхемично-реперфузионно увреждане. [240] Калретикулин е мултифункционален разтворим протеин, който свързва Ca^{2+} йони и е експресиран върху фагоцитната клетъчна повърхност. [240] Свързването на ADNC с калретикулин обуславя усвояване на ранните апоптозни клетки от макрофагите [240] и така предпазва организма от системно възпаление. В заключение AdipoR1, AdipoR2 и T-кадхеринът участват в медирането на метаболитните свойства на ADNC, докато калретикулинът контролира главно противовъзпалителните действия на хормона.

ADNC упражнява плейотропни действия: насърчава инсулиновата чувствителност, инхибира клетъчната смърт и потиска възпалението. Въпреки че рецепторите са идентифицирани, липсваше обединяващ механизъм за многостранните функции на хормона при различни условия. Wang Zh. и Scherer Ph., (2016) предполагат, че свързаната с AdipoR керамидазна активност е основният ключов механизъм, обясняващ много от свързаните с адипонектин фенотипове. [106,285] Керамидите са членове на разнообразен клас липиди, които участват в инсулинова резистентност, клетъчна смърт, възпаление и атеросклероза. [47] Керамидазата е ензим, превръщащ вредните керамиди в полезен клас липиди, сфинганините и сфингозините, включително подкласа сфингозин 1-фосфат (S1P). Съотношението на керамидите към S1P е ключово в множество биологични процеси. Прилагането на ADNC води до значимо намаляване в нивата на чернодробния керамид и до последваща инсулинова сенсибилизация. [285] Генетичното повишаване на активността на керамидазата в черния дроб или в мастната тъкан е достатъчно, за да предизвика подобрене в инсулиновото сигнализиране и енергийната хомеостаза на цялото тяло. Ето защо изследователите предлагат за универсален модел на действие на ADNC – активността на керамидазата като рецепторен проксимален компонент.

ADNC има кратък полуживот от 45 до 75 минути. Плазмените нива на хормона са отчетени по-високи при жените в сравнение с мъжете. Това се дължи на междуполови различия в телесното разпределение на мазнините. Описано е селективно инхибиране от тестостерона върху секрецията на HMW-форми. Жените имат по-висок дял и абсолютно количество на HMW- и хексамерни форми и значително по-нисък дял на тримери. [240]

4.4. ADNC – патогенетични механизми за развитие на ССЗ

Една от най-критичните функции на ADNC, заслужаващи по-широко обсъждане, е ролята му в развитието на ССЗ. Адипокинът е описан, че участва в регулирането на сърдечната функция при ЗД. Затлъстяването и ССЗ се считат за хронични нискостепенни възпалителни

състояния. [184] Това нискостепенно възпаление, наричано още „метаболично възпаление“ или метавъзпаление, е отговорно за намаляването на инсулиновата чувствителност чрез: активиране на NF-κB и възпалителни пътища, съпътстващо производство на провъзпалителни цитокини и инфилтрация на провъзпалителни макрофаги. [161, 240]

При ССЗ, хроничното възпаление на съдовата стена е резултат от трансендотелно преминаване на богати на холестерол атерогенни Apo-B липопротеини от плазмата в интимата, локална секреция на обилно количество ROS и производство на окислени липопротеини. Следва ендотелно-клетъчна апоптоза, която индуцира инфилтрация на макрофаги, мастоцити и Т-клетки. [161,240] Така описаният порочен кръг между оксидативен стрес и възпаление се осъществява не само в артериалната стена, но и в мастната тъкан. Предвид противовъзпалителните свойства на ADNC, от една страна, и отрицателната връзка със ИТМ, от друга, адипокинът се определя като „физиологичен мост“ между затлъстяването и възпалението. [240]

Защитните ефекти на ADNC са насочени срещу инсулиновата резистентност и възпаление. Адипокинът инхибира адхезията на моноцити, трансформацията на макрофаги в пенести клетки, натрупването на липиди в макрофагите на съдовата стена и намалява експресията на адхезионни молекули. [127,240] Хормонът инхибира пролиферацията на съдови гладкомускулни клетки и поддържа техния контрактилен фенотип. [240] В допълнение, ADNC инхибира индуцираната от колаген тромбоцитна агрегация. Адипозният хормон има защитна роля и по отношение развитието на ЕД. От една страна, ADNC повишава активността на eNOS и синтеза на NO чрез AdipoR1/R2-AMPK-ендотелна сигнализация, а от друга – стимулира експресия на циклооксигеназа-2 (COX-2) и производство на простагландин I₂(PGI₂) чрез калретикулин / CD91-зависимо клетъчно сигнализиране. [186,240] Следователно ADNC участва и в регулацията на кръвното налягане. При пациенти с есенциална хипертония са отчетени сигнификантно по-ниски плазмени нива на ADNC, отколкото при нормотензивни индивиди. [186]

През 2021 година Kalkman H. и сътр. предлагат абсолютно нова хипотеза и определят Т-кадхерина като ключов виновник за т.нар. „адипонектинов парадокс“. [124] Т-кадхеринът има гликозилфосфатидилинозитолова част, разположена в клетъчната мембрана и може да бъде специфично разцепен от фосфолипаза D (GPI-PLD). При патологични условия се наблюдава прекомерно повишаване на циркулиращите нива на GPI-PLD. Това води до повишена хидролиза на мембранно-свързания Т-кадхерин и респективно до намалено секвестриране на ADNC от реагиращите тъкани. Нарушава се ADNC-медираната клетъчна сигнализация и се увеличават циркулиращите нива на ADNC в кръвообращението. HMW/Т-кадхерин системата

е отговорна за отстраняването на клетъчните керамиди и дисфункцията на този процес причинява допълнително влошаване на инсулиновата резистентност. Следователно както ниските, така и високите нива на ADNC отразяват състояние на инсулинова резистентност.

4.5. ADNC – аналитични методи за количествено определяне

ADNC циркулира в кръвта под формата на различни олигомерни комплекси (димерни и мултимерни структури), които включват ADNC с ниско молекулно тегло (LMW, тримери + албумин-свързани тримери), ADNC със средно молекулно тегло (MMW, хексамери) и HMW (12-мери или 18-мери).

От направената литературна справка се установи, че най-широко прилагани аналитични методи за количествено определяне на ADNC в серум и плазма са радиоимуноанализ (RIA) и ELISA. RIA е дефиниран като референтен метод за определяне на ADNC в серум и плазма с много висока чувствителност. Недостатъци на тази аналитична техника са: употреба на радиоактивни вещества; продължителен аналитичен етап – 24 часа; специализирано оборудване и квалифициран персонал; невъзможност за автоматизация. Достъпните в търговската мрежа комплекти за RIA–ADNC обикновено изискват минимално количество на пробата от 100 µl, при LOD 1 ng/ml. [70]

ELISA анализите изискват по-малък размер на пробата от RIA (10 µl), при LOD от порядъка на 0,25 ng/ml. [70] ELISA анализът позволява независимо количествено определяне на общия и HMW–ADNC и индиректното измерване на MMW и LMW. За измерване на общия ADNC, пробите се третираат предварително с буфер (цитратен буфер + натриев додецил сулфат), който редуцира мултимерния ADNC до димери. За измерване на HMW пробите се третират с протеаза II, която селективно усвоява LMW и MMW. Остатъчна HMW фракция се инкубира с буфер, който редуцира мултимери до димери и спира протеазното разграждане. Следва количествено определяне на HMW. За измерване на комбиниран MMW и HMW пробите се обработват с протеаза I, която селективно усвоява само LMW. Концентрацията на MMW се изчислява чрез изваждане на концентрацията на HMW от комбинираната концентрация на MMW + HMW. Концентрацията на LMW (тримери + тримери, свързани с албумин) се изчислява чрез изваждане на комбинираната концентрация на MMW + HMW от общия ADNC. [70] За разлика от RIA, ELISA методите осигуряват потенциал за напълно автоматизиран анализ на ADNC.

ELLA (ProteinSimple, Bio-technie, Minneapolis, MN, USA) е платформа, базирана на микрофлуидна технология, която позволява извършването на автоматизирани ензимно свързани имуноанализи. Времето за изследване е 72 минути. Беше разработен и

ултрачувствителен ELISA метод за количествено определяне на ADNC в урина с LOD 0,81 pg/mL. [286] Тази чувствителност е много по-висока от наличните в търговската мрежа комплекти (Invitrogen BMS2032-2 и BioVendor High Sensitivity RD191023100).

Etsuro и сътрудници установяват, че концентрацията на ADNC в урината е $14,9 \pm 3,2$ ng/mg креатинин при хора със ЗД спрямо $3,1 \pm 0,3$ ng/mg креатинин при контроли. Изследователите определят отрязваща стойност 4,0 ng/mg креатинин. Освен това концентрацията на ADNC в урината се повишава с прогресията на ХБЗ. Трябва да се отбележи, че адипокинът в урината е под формата на мултимери със средно молекулно тегло (хексамер) при пациенти със ЗД, докато при нормални индивиди – образува само мултимери с ниско молекулно тегло (тример). [77]

Наскоро бяха представени резултати и от имунотурбидиметричен метод. [212] Последният позволява адаптация на различни химични анализатори. През 2017 г. Fellahi и сътр. представят сравнителен анализ между автоматизиран ELISA (ALPCO adiponectin ELISA kit, Laboratoires Eurobio, Les Ulis, France) и имунотурбидиметричен метод (Randox Laboratories, Ltd, London, UK; ARCHITECT ci8200 Integrated System analyzer). Отчетена е сигнификантна корелация, но при правопрпорционални разлики в успоредно измерените концентрации. [81]

През 2021 г. е предложен и високочувствителен биосензор за определяне на ADNC в серум. [114] Биосензорът е индиево-калаен оксид-базиран сензор за еднократна употреба с широк измервателен обхват (25 pg/ml до 2500 pg/ml) и LOD 20,19 pg/ml. [114] Два нови биомиметични сензора за откриване на ADNC и Lep чрез молекулярно отпечатани полимери върху златни електроди бяха произведени. Въз основа на електрохимичен импеданс, резултати от спектроскопия и характеристики на циклична волтаметрия, сензорите бяха електрохимично оптимизирани и използвани в интегрирана микрофлуидна платформа.

Разнообразието от използвани аналитични методи за количествено определяне на ADNC предполага липса на стандартизация, разлики в измерените концентрации и респективно методологично зависими референтни стойности.

4.6. ADNC – клинично приложение

Повишени серумни нива на ADNC се съобщават при хронични възпалителни и автоимунни заболявания като Т1Д, системен лупус еритематозус, ревматоиден артрит и остеоартрит, ХБЗ, възпалително заболяване на червата и хронична обструктивна белодробна болест. [240] У нас този хормон е добре проучен като рисков маркер при деца с обезитет в предучилищна [9] и предпубертетна възраст. [86]

Ранни проучвания установяват, че дефицитът на ADNC води до изострена сърдечна хипертрофия, когато е подложен на претоварване с налягане. Редица епидемиологични проучвания съобщават, че индивиди със затлъстяване, Т2Д, МС, хипертония и КАБ имат понижени нива на ADNC и в частност на HMW. [95,150,250] Установява се намалено съотношение между HMW и общия ADNC, което корелира значимо с ангиографската степен на коронарната атеросклероза. [240]

Скорешни метаанализи съобщават, че повишените плазмени нива едновременно на общия и HMW адипокин са положително асоциирани със ССЗ. [170] Тази противоречива и двусмислена връзка е наречена „адипонектинов парадокс“. [124,170,240] Едно от обясненията за подобно явление се основава на пряката корелация между натриуретичните пептиди (NP) и ADNC. NP насърчават секрецията на адипокина и следователно повишават плазмените му концентрации. [240] Друго правдоподобно обяснение при пациенти със ССР и съпътстващи метаболитни нарушения е нарушената чернодробна функция и разграждането на ADNC. [249] ADNC има силна инсулинова сенсibiliзираща функция, която може да доведе до сърдечна хипертрофия. [307]

Според някои автори повишените нива на ADNC, асоциирани със сърдечно-съдова смъртност се наблюдават при мъже, но не и при жени. [170]. Според други изследователи увеличеното производство на ADNC при пациенти с напреднала СН е компенсаторен механизъм. [283] Високи серумни нива на ADNC са отбелязани и при пациенти с увредена бъбречна функция. Този факт може да се обясни с адипокиновия клирънс чрез гломерулна филтрация. [167,248]

При Т1Д се наблюдава намалена инсулинова чувствителност в сравнение с контролите без диабет, което предполага дисрегулация на функцията на ADNC. [240] Пациенти с Т1Д и васкуларни усложнения имат по-високи серумни нива на адипокина спрямо пациенти без усложнения. [145] Необходимо е да се изясни дали увеличената концентрация на адипонектин е патологично асоциирана с развитието на съдови усложнения или представлява компенсаторен имуен отговор.

Уникалните характеристики на ADNC превръщат хормона в правдоподобен кандидат в търсенето на терапевтични стратегии при диабет. Напредъкът по отношение на плейотропното действие на ADNC ни помогна значително да разберем ролята на мастната тъкан при различни патологични състояния.

5. Lер

Откриването на Lер (от старогръцки: $\lambda\epsilon\lambda\tau\acute{o}\varsigma$ – „слаб“) през 1994 г. се определя като крайъгълен камък в изследване на затлъстяването и опознаване на механизмите за контрол на телесното тегло. Заедно с ADNC, Lер се счита за пионер в концепцията, че мастната тъкан не е инертен орган за съхранение на енергия, а активен ендокринен орган. Lер действа като аферентен сигнал в отрицателна обратна връзка с количеството на мастната тъкан. Хормонът регулира приема на храна и разхода на енергия. [83] Липсата на Lер при ob/ob мишки е свързана с ранно начало на болестно затлъстяване. [207] Установено е, че прилагането на Lер възстановява нормалното телесно тегло и редица промени, свързани с дефицита на хормона като: хиперфагия, ниска телесна температура, намалена скорост на метаболизма, имунен дефицит и инсулинова резистентност. [207] Подобни фенотипни аномалии са открити и при хора с вроден дефицит на Lер. [207] Хормонът е кодиран от гена *ler*, разположен на хромозома 7. [177,207] Регулаторните механизми, включени в транскрипционния контрол на гена на Lер, са слабо разбрани.

5.1. Lер – структура и синтез

Lер се произвежда и секретира предимно от бялата мастна тъкан. Той е пептиден хормон с молекулна маса от 16 кДа. [177] Установен е циркаден ритъм на хормоналната секреция и зависимост от хранителния статус. Гладуването се асоциира с ниски нива на циркулиращ Lер, докато храненето или затлъстяването повишават нивата на Lер. Освен от мастната тъкан, Lер се произвежда и от други тъкани като стомах, плацента и млечна жлеза. [207] Lер упражнява широк спектър от краткосрочни, междинни и дългосрочни регулаторни действия на централно и периферно ниво. Експресията на Lер се регулира от различни хормони като инсулин, глюкокортикоиди и катехоламини. При физиологични обстоятелства полуживотът на миши Lер е $40,2 \pm 2,2$ минути. Концентрациите на циркулиращия Lер до 1 час след прилагане на екзогенен Lер са 170 пъти по-високи от ендогенните нива на гладно. Серумните нива на Lер обикновено се покачват 4-7 часа след консумация на храна, основно в резултат на инсулин-стимулирано усвояване на глюкоза с последващо освобождаване на Lер от адипоцитите. [210]

5.2. Lер – рецептори и биологична роля

Биологичните функции на адипокина са медиирани от взаимодействието му с мембранно-свързани рецептори (LEPR или ObR), LEPR се кодира от LEPR (или OBR) гена и принадлежи към семейството на цитокини клас 1. Идентифицирани са шест изоформи с общ Lер-свързващ домен, които се различават по дължината на С-терминалния вътреклетъчен домен. [207,287] Тези изоформи включват: една дълга форма (LEPRb), четири къси форми

(LEPRa, LEPRc, LEPRd и LEPRf) и една разтворима форма (LEPRe). [287] Причините, поради които се произвеждат различни форми на лептинови рецептори и съответните им функции, все още не са ясни. Основни таргетни участъци за Lep са разположени в специфични структури на хипоталамуса, известни като Lep-чувствителни области. При свързване на Lep с рецепторите се задейства каскада от процеси в клетките: активиране на тирозин-киназна система (JAK/Stat), митоген-активираща протеинова каскада (MARK), инсулинов рецепторен субстрат/фосфоинозитид 3-киназа/Akt (IRS/PI3K/Akt), mTOR и AMP-активирана протеин киназа (AMPK) пътища. [50] Освен централно действие, Lep упражнява разнообразие от периферни ефекти, свързани с основните му роли в регулирането на енергийния баланс. [207] Експресия на LEPRs се установява в адипоцити, хепатоцити, остеокласти, левкоцити, гладкомускулни клетки, тромбоцити и ендотелни клетки. [235] Този факт обуславя убиквитерността на хормона. Скорошни проучвания изтъкнаха експресия на LEPRs и в имунни клетки, с което се обяснява участието на Lep във вродения и придобития имунитет. [50] Промените в експресията на LEPRs могат да повлияят на чувствителността към Lep и развитие на лептинова резистентност. [207]

Lep оказва незабавен ефект, като действа върху мозъка за регулиране на апетита. Чрез ObRb-рецепторно свързване в хипоталамуса Lep активира сложна невронна верига от анорексигенни и орексигенни невропептиди за контролиране на приема на храна. Lep взаимодейства и с мезолимбичната допаминова система, като регулира чувството за глад и ситост. Lep е плейотропен хормон, който участва в множество биологични процеси, като възпалителни процеси, имунни функции, ангиогенеза, костна хомеостаза и възпроизводство. [218] Lep регулира липидния метаболизъм пряко чрез взаимодействие с LEPRb [198] и индиректно чрез симпатикова инервация. [140] Lep стимулира адипогенезата, липолизата, окислението на мастни киселини, апоптозата и термогенезата. Установено е наличие на LEPRs в β -клетките на панкреаса, което предполага участието на Lep в ендокринната функция и връзката му с инсулина. [90] Доказано е, че Lep инхибира експресията на инсулин чрез повлияване на LEPR в панкреасните β -клетки. Той също така инхибира както базалната, така и стимулираната с глюкоза секреция на инсулин чрез АТФ-зависимите калиеви канали. От друга страна, Lep се свързва с LEPR в аркуатното ядро на хипоталамуса, където два типа неврони с антагонистично действие са основни мишени на адипокина, а също и на инсулина. Следователно действията на Lep и инсулина са взаимосвързани и допринасят за оптимален метаболитен контрол. Двата хормона изпълняват ключова роля в централната регулация на енергоразхода глюкозната хомеостаза. [90,210] Доказано е, че дефицитът на Lep или LEPRs намалява инсулиновата чувствителност, обуславя хипергликемия и води до развитие на

затлъстяване при ob/ob мишки. Инсулинът, от своя страна, действа директно върху адипоцитите чрез увеличаване секрецията на Lер, вероятно поради повишен транспорт на глюкоза и метаболизъм. Приложението на Lер в диви мишки повишава усвояването на глюкоза, независимо от нивата на циркулиращия инсулин. Изследователите предполагат и подобен благоприятен ефект върху хомеостазата на глюкозата при мишки с Т1Д. При хора с вроден дефицит на Lер са доказани метаболитни нарушения като хипергликемия, инсулинова резистентност и хиперлипидемия. При пациенти с инсулинорезистентна липодистрофия е установено, че лечението с Lер подобрява метаболизма на глюкозата, триглицеридите, инсулиновата чувствителност и чернодробната стеатоза.

5.3. Lер – патогенетични механизми за развитие на ССЗ

Изследвания при хора и гризачи са документирали повишена експресия на LEPRs в увредената съдова стена и атеросклеротичните плаки. [218] В допълнение, взаимодействието на Lер с неговия рецептор беше идентифицирано като първата критична стъпка в образуването на атером. [218] Доказано е, че Lер модулира експресията на гени, свързани с атеросклероза и абнормна ангиогенеза. Счита се, че централно медираните действия на Lер могат да бъдат компрометирани при хиперлептинемични индивиди, а периферните ефекти на хормона са добре запазени. Следователно хипоталамусът, черният дроб, панкреасът и скелетните мускули се считат за устойчиви на Lер тъкани, които медираят метаболитните му ефекти. Съдовата стена, миокардът, имунните и кръвните клетки не са устойчиви на Lер тъкани. [218]

Хиперлептинемията обуславя активирането на неутрофилни гранулоцити, моноцитно-макрофагиална продукция на цитокини, повишаване на цитотоксичността на НК-клетките, производство на ендотелин-1 (ET-1) и ROS. Хронично повишеният Lер нарушава физиологичния баланс между ET-1 и NO-медираните пътища във васкулатурата, което предполага състояние на лептинова резистентност в ендотела. Следователно адипокинът обуславя развитие на възпалителни процеси и хипертония. От друга страна, Lер стимулира В-клетъчната пролиферация и редуцира Т- и В-клетъчната апоптоза. При *in vitro* и *ex vivo* проучвания се установява, че Lер потенцира АДФ-медираната тромбоцитна агрегация. [59] Класифициран като цитокин, Lер допълва проинфламаторния си ефект посредством въздействие върху функцията на тромбоцитите и респективно упражняване на протромбогенен ефект. Способността на адипокина да потенцира тромбоцитната агрегация е описана при научни експерименти с ob/ob мишки. [59]

In vitro експерименти за въздействието на Lер върху тромбоцитната функция докладват дозово-зависимо повишаване концентрацията на Ca⁺ йони в тромбоцитите. [280] За обуславящи тази зависимост патофизиологични механизми, се считат: активиране на

фосфолипаза C (PLC) с последващо образуване на инозитол трифосфат (IP3) и респективно Ca⁺ освобождаване от вътреклетъчните гранули в цитозола; индуциране на калциев инфлукс от екстрацелуларното пространство. [235] Активирането на PLC води, от своя страна, до хидролиза на фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат, в резултат на което се формира IP3 и 1,2-диацилглицерол (1,2 DAG). DAG активира PLC, която успоредно с IP3-медираното Ca⁺ мобилизиране, потенцира синергично тромбоцитното активиране и агрегация (повишена секреция на алфа- и плътни гранули, образуване на TXA2 и експресия на адхезионни рецептори). [111] Описаните механизми са инициирани от свързването на Lep с ObRb, експресирани в тромбоцитната мембрана като начален етап и активиране на JAK/Stat сигнална система като втори посредник. [111]

При патологични условия, Lep упражнява мощни проатерогенни ефекти върху множество съдови клетки, включително макрофаги, ендотелни клетки и гладкомускулни клетки. Някои проучвания съобщават, че Lep стимулира пролиферация и миграция на съдови гладкомускулни клетки (СГМК). Изследвания върху животни и *in vitro* експерименти са потвърдили, че при патологични условия, Lep насърчава трансформацията на СГМК в остеобластни клетки с повишена минерализация. [218] Установено е, че повишените плазмени нива на Lep при пациенти с Т2Д и затлъстяване корелират положително със степента на калцификация на коронарната артерия. [218] В допълнение, Lep-индуцирания синтез на MMP-9 от СГМК обуславя нестабилност на плаката. Следователно хронично повишените концентрации на Lep повишават оксидативния стрес, тромбогенезата, както и обуславят развитието на съдово възпаление и атеросклероза. [253] Физиологичните концентрации на Lep упражняват зависими от ендотела вазодилативни ефекти, докато патофизиологично обусловените повишени нива на хормона проявяват множество проатерогенни свойства. [218]

Скорошни проучвания докладват, че високи (фармакологични) нива на Lep са необходими, но не достатъчни, за да предизвикат резистентност към адипокина. [285] При липса на други стимулиращи фактори, като диета с високо съдържание на мазнини, хиперлептинемията подобрява метаболизма на глюкозата и инсулиновата чувствителност, както се наблюдава при трансгенни слаби мишки, свръхекспресиращи Lep, и при мишки с хронични интрацеребровентрикуларни перфузии на Lep. [285] При излагане на високомазнинна диета хиперлептинемията насърчава лептинова резистентност. [285] Хронично повишените нива на Lep при мишки водят до повишена чувствителност към затлъстяване, предизвикано от диетата, както и увеличена маса на мастната тъкан със стареенето. [285] Най-обсъжданата дефиниция на лептинова резистентност е неспособността на фармакологични дози Lep да потиснат приема на храна и телесното тегло. Въпреки това

„селективна резистентност към Lер“ също се предлага, за да обясни запазването на действието на Lер при хипертония и в репродуктивната ос при лица със затлъстяване, индуцирано от диета. [285] За разлика от инсулиновата резистентност, която може да бъде поне частично преодоляна чрез допълнително повишаване на нивата на инсулин, повишаването на циркулиращите нива на Lер е напълно неефективно. [285]

В ССС резистентността към Lер проявява неблагоприятен ефект върху реакцията на сърцето към стресови състояния и насърчаване на сърдечно ремоделиране поради нарушен сърдечен метаболизъм, повишена фиброза, съдова дисфункция и засилено възпаление. Резистентността към Lер или дефицитът на LEPRs води до повишаване на риска от сърдечна дисфункция и СН, което е водеща причина за заболяемост и смъртност, свързани със затлъстяването и Т2Д.

5.4. Lер – аналитични методи за количествено определяне

Преданалитични, аналитични и постаналитични източници на вариации могат значително да повлияят на измерването на концентрациите на Lер в кръвта. Съобщава се, че Lер има циркадианен и ултрадианен ритъм. Серумните концентрации на Lер са най-високи между полунощ и рано сутрин. В допълнение, Lер може да бъде повлиян от фактори като хранене, потискане на апетита по време на сън и относителна обща телесна мазнина. Приемът на храна причинява колебания в концентрациите на Lер, за които се предполага, че са медиирани от инсулин.

RIA е имуноанализ, използван в ранните изследвания с поликлонални антитела. Съвременните RIA и ELISA комплекти, в зависимост от производителя, са базирани на моноклонални или поликлонални антитела. Поликлоналните антитела откриват различни епитопи, което предполага нежелана кръстосана реакция. По този начин специфичността на антиялото може да обясни някои вариации при измерване на Lер и затрудняване при сравняването на резултатите от различните проучвания. Методологията на ELISA отчита по-високи средни концентрации на Lер и по-голямо SD от RIA. Международно приет стандартен референтен материал няма и това прави сравнението на резултатите от изследванията допълнително предизвикателство.

ELISA е най-широко използваният метод за количествено определяне на Lер в серум и плазма, последван от RIA. През последните години бяха разработени много различни мултиплексни имуноанализи, базирани на Luminex® технология. [159] Корелацията между тестваните мултиплексни и ELISA имуноанализи е много добра ($r > 0,9$, $p < 0,001$) с приемлив коефициент на съгласуваност. Въпреки това резултатите, получени с двете техники, не са

напълно взаимозаменяеми. [92] Treviño-Garza С. и сътр. въвеждат методи, базирани на технологията за мултиплексен имуноанализ (MIA) и демонстрират предимства пред ELISA и RIA. Коефициентът на съгласуваност е 0,158 (95% CI 0,10–0,21). Коефициентът на корелация $r = 0,6651$ (95% CI 0,52–0,77; $p < 0,0001$), а в диаграмата на Бланд–Алтман съгласуваността е приемлива. [263]

В проучване на Cheng J. и сътр. (2022) са анализирани серумни нива на Lер на гладно при 469 мъже и 773 жени от произволно избрани китайски жители с цел извеждане на специфични за пола и ИТМ референтни интервали за серумен Lер (при ИТМ < 20 (Lер = 1.26 ± 1.10 ng/ml); от 20 до 25 (4.08 ± 3.14 ng/ml); от 25 до 27,5 (7.29 ± 5.73 ng/ml); 27,5 до 30 (9.32 ± 3.93 ng/ml) и ≥ 30 кг/м² (14.42 ± 6.33) за мъже и при ИТМ < 20 (Lер = 9.23 ± 5.61 ng/ml); от 20 до 25 (16.29 ± 8.96 ng/ml); от 25 до 27,5 (24.27 ± 11.01 ng/ml); 27,5 до 30 (29.31 ± 11.47 ng/ml) и ≥ 30 кг/м² (40.85 ± 16.62). Серумният Lер е определен с помощта на търговски комплект ELISA (EMDMilipol, Billerica, MA, USA). Коефициентът на вариация в рамките на анализа на метода ELISA е $< 5\%$, а коефициентът на вариация между анализите е $< 8,6\%$. Проучване на данните от третото Национално изследване на здравето и храненето (NHANES III) показва серумните концентрации на Lер по етническа принадлежност и ИТМ и при двата пола. [225] Мъжете имат сходни нива на Lер с китайските мъже от всички групи с ИТМ ($6,0 \pm 0,16$ ng/mL), докато жените от Китай имат по-високи от тези в проучването NHANES III. [48] Друго проучване в множество етноси също установи, че в сравнение с европейските жени, жените от Южна Азия имат значимо по-високи концентрации на Lер, което не може да се обясни с разпределение на мазнини и хиперинсулинизъм. Въпреки това има доказателства, че хипертрофията на подкожните адипоцити може да допринесе за високи концентрации на Lер при южноазиатците. [48]

Предложени са и референтни стойности на Lер при идентифициране на кардиометаболитни аномалии в испанското население. [92] Стойностите на Lер са определени по метода ELISA и са отчетени по-високи при жените, отколкото при мъжете ($21,9$ vs $6,6$ ng/mL; $p < 0,001$). Медианата (интерквартилен диапазон) е $24,5$ ($14,1$ - $37,0$) ng/mL при жените и $7,2$ ($3,3$ - $14,3$) ng/mL при мъжете. Lер е значимо свързан с антропометрични показатели, инсулин, CRP и обратнопропорционално свързан с възрастта, тютюнопушенето и физическата активност при жени ($r^2 = 0,53$; $p < 0,001$) и при мъже ($r^2 = 0,61$; $p < 0,001$). Стойностите на Lер, които идентифицират кардиометаболитна патология са $23,75$ ng/mL при жени (площ под кривата $0,722$; чувствителност $72,3\%$; специфичност $58,7\%$) и $6,45$ ng/mL при мъже (площ под кривата $0,716$; чувствителност $71,4\%$; специфичност $60,2\%$). [92]

Валидиран е и имунологичен метод за измерване само на биоактивната фракция (bioLep) на Lep, способна да се свърже с рецептора. Изследвана е голяма кохорта с широк диапазон на възраст и ИТМ. [279] Изследователите демонстрират, че bioLep отразява концентрациите на Lep в серума толкова надеждно и точно, колкото конвенционалните имуноанализи. Специфичен SPRi имуносензор за Lep може да бъде нов инструмент за определяне на Lep в кръвна плазма. Имуносензорът се състои от заешко антилептиново антитяло, имобилизирано върху златен чип чрез цистеаминов линкер, използвайки протокола EDC/NHS. За формиране на аналитичен сигнал се използва нефлуиден масив SPRi. При оптимизирани условия, обхватът на линейния отговор на имуносензора обхваща концентрации от 0,23 до 5 ng/mL. LOD на имуносензора е 0,07 ng/mL, а LOQ е 0,23 ng/mL. Имуносензорът и свързаният с него аналитичен метод са валидирани чрез паралелно определяне на Lep в серия от плазма от деца, страдащи от недोхранване, и контролна група, използвайки ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) и SPRi. Разработеният имуносензор и свързаният с него метод са директни, по-бързи и много по-прости от ELISA. [229]

Разработен е и първият базиран на аптамер електрохимичен импедансен спектроскопски метод за определяне на Lep. Този аптасензор е базиран на наночастици от титанов диоксид и златни наночастици, модифициран със ситопечатен електрод за определяне на Lep в проби от човешки серум и човешка плазма. Аптасензорът показва висока електрокаталитична производителност към възпрепятстващо откриване на Lep с два линейни диапазона (1,0–100,0 pg/mL и 100,0–1000,0 pg/mL) и LOD = 0,312 pg/mL. Изработеният аптасензор показва отлична чувствителност и стабилност, което го превръща в обещаваща платформа за определяне на Lep. [75]

Наскоро бяха представени резултати и от имунотурбидиметричен метод. Последният позволява адаптация на различни химични анализатори. [160] Разнообразието от аналитични методи за количествено определяне на Lep предполага липсата на междулабораторна хармонизация и унифицирани референтни стойности.

5.5. Lep – клинично приложение

Епидемиологичните данни съобщават за връзка между хиперлептинемията и развитие на ССЗ като застойна СН, ОМИ, хипертония и КАБ. [218] В напречно проучване при Т2Д е установена корелация между плазмени нива на Lep и калцификация на коронарните артерии. [218] McMahon и съавт. съобщават, че хиперлептинемията повишава риска от субклинична атеросклероза при системен лупус еритематозус и това е придружено с повишени нива на възпалителни маркери като Lp(a) и oxPL/apoB100. [168] В друго проучване увеличената

обиколка на талията и високи серумни нива на Lер се асоциират положително с повишен общ холестерол, триглицериди и CRP при пациенти с КАБ в сравнение със здрави контроли. [174] У нас Раянова Г. и съавт. изследват промените в серумните нива на ADNC, Lер и резистин при пациенти с метаболитен синдром. [13]

Силна положителна корелация се наблюдава между повишените плазмени нива на Lер и броя на стенозиращите коронарни съдове при пациенти с КАБ. [217] Хиперлептеинемията се асоциира с развитието на хипертония, атеросклероза и тромбоцитна агрегация. Lер корелира положително с острофазови белтъци като CRP и тромбоцитни индекси при пациенти със ЗД. [126,160]

Доклад на източношотландската организация за превенция от коронарна болест (WOSCOPS) определя Lер като независим РФ за развитие на ССЗ при лица със затлъстяване/МС и Т2Д. [280] Според изследователите, описаният вреден ефект на Lер е в пряка зависимост с напредването на възрастта и намалената бъбречна функция. В скорошно напречно проучване, проведено при млади нормотензивни индивиди, нивата на циркулиращия Lер показват благоприятна обратна връзка с сІМТ и площта на напречното сечение на стената. Изследователите отчитат положителна корелация между плазмените нива на Lер и показателите за субклинична атеросклероза само при индивиди с наднормено тегло. [151]

Резистентността към Lер или дефицитът на LEPRs повишава риска от сърдечна дисфункция и СН, което е водеща причина за заболяемост и смъртност, свързани със затлъстяването и Т2ЗД. [210] Наблюдаваното несъответствие между благоприятни спрямо вредни ефекти на Lер върху развитието и прогресията на атеросклерозата вероятно се дължи на разлики в концентрацията на Lер (физиологична срещу патологична).

Според последните проучвания Lер може да предизвика терапевтичен отговор при физиологични концентрации, но този благоприятен ефект е напълно отменен при болестни състояния като затлъстяване и ЗД, характеризиращи се с хиперлептеинемия. При такива условия повишените плазмени нива на адипокина се определят като компенсаторен механизъм за преодоляване на намалената тъканна чувствителност и представляват ключова движеща сила за развитието на атеросклеротични усложнения. [218]

По отношение на Т1Д наличната база данни е инсуфициентна. Установените серумни концентрации на Lер при Т1Д са противоречиви. [50] При новодиагностицирани пациенти се описват предимно ниски серумни нива, а при пациенти с дългогодишен Т1Д – по-високи стойности в сравнение със здрави лица. [50] Възможно обяснение за тази динамика в серумните нива на Lер е интензифицирането на инсулинотерапията с последваща

хипертрофия и хиперплазия на висцералните адипоцити и ускорен синтез на Lер. При научни експерименти с мишки е наблюдавана Lер-индуцирана прогресия на Т1Д. [50] Сигнификантно по-висока експресия на LEPRb в циркулиращи имунни клетки е установена при Т1Д в сравнение със здрави лица и Т2Д. [50] Lер ускорява началото и прогресията на заболяването като стимулира разрушаване на β -клетките и производството на γ -интерферон от Т-клетките в експериментални проучвания с мишки без диабет. [202] Докато при Т2Д експресията на LEPRb се асоциира предимно с високия ИТМ, то при Т1Д превалира експресия в имунни клетки. Този факт подкрепя тезата за хронично нискостепенно възпаление при Т1Д, което увеличава риска от ССЗ. [50] Резултати от експериментално проучване върху мишки с неконтролиран Т1Д показват, че терапията с Lер потиска хиперглюкогаонемията в черния дроб и възстановява еугликемията. Тази хипотеза е потвърдена при животински модели и от други изследователи. [213] От друга страна, в пилотно проучване на Vasandani Ch. и сътр. (2017) за оценка на ефикасността и безопасността на терапията с метрелептин (рекомбинантен метионил човешки лептин) са проследени пациенти с Т1Д за период от 20 седмици. [213] Изследователите установяват, че терапията с метрелептин понижава средното телесно тегло и дневната инсулинова доза, но не подобрява гликемичния контрол. Следователно са необходими допълнителни клинични изпитвания при хора за уточняване ефективността на предложената терапия при Т1Д.

В обобщение, балансът между физиологичните и патологичните концентрации на Lер определя неговите полезни срещу вредни ефекти върху васкулатурата. В клиничната практика, въпреки споменатите по-горе механизми на мощно проатерогенно действие на хормона, значението на хиперлептинемията като изолиран сърдечно-съдов РФ или медиатор е ограничено. Имплементирането на ОРГ в клинично-лабораторната практика се препоръчва с цел по-добро стратифициране на ССР и ефективност на терапията.

6. Заключение

ССЗ са основна причина за смъртност при пациенти с дългогодишен Т1Д. Диабетната васкулопатия се асоциира с хипергликемия-медирана ЕД и хронично нискостепенно възпаление. Патогенетичните механизми за развитие на ССЗ при Т1Д не са напълно изяснени. Понастоящем, ЗД се определя като еквивалент на ССЗ и затова повечето от биомаркерите, характерни за съпътстващите го макро- и микроваскуларни усложнения, са потенциални маркери за оценка на ССР. Докато ССУ при Т2Д в повечето случаи са налице още при поставяне на диагнозата, то при Т1Д се извяват средно 5-10 години след диагностицирането му. Ето защо изборът на подходящи биомаркери за оценка на ССР може значително да подобри скрининга, диагнозата и прогнозата на ССЗ при Т1Д. Изследователският интерес към

биомаркерите се е увеличил през последните години. Основно предизвикателство при валидирането им е разработване на персонализирана медицина, както и активно сътрудничество между лабораторни и клинични специалисти.

Актуалността на темата на настоящия дисертационен труд е обусловена от перспективите за превенция и профилактика на ССЗ, персонализиран подход за лечение на ССЗ, приложение в клиничната практика на неинвазивни методи за лабораторна оценка на ССЗ предвид високата честота на ССЗ и смъртност и недостатъчна здравна информираност, които изискват квалифицирана, дългосрочна и комплексна клинично-лабораторна грижа за пациентите с Т1Д.

Настоящото проучване изследва прогностичната стойност на ADMA, OPG, ADNC и Lер за оценка на ССР при пациенти с дългогодишен Т1Д. Не бяха открити цялостни изследвания, свързани с анализа и възможностите на иновативните биомаркери спрямо специфични скали за оценка на ССР при Т1Д (ST1RE и ESC от 2019 г.) и хематологични промени при Т1Д.

ЗД е пряко свързан с промени в хематоморфологичните показатели, които засягат червените кръвни клетки (RBC), белите кръвни клетки (WBC) и тромбоцитите (PLT). В настоящото проучване се анализираха взаимодействията между хематоморфологичните показатели и предложените биомаркери в контекста на ССР при лица с дългогодишен Т1Д.

Приложението на неинвазивни инструменти за оценка на ССР осигурява своевременна адаптация на терапевтичното поведение за подобрени клинични резултати при минимален разход на финанси. Научното изследване ще даде възможност да се установи дали приложението на ADMA, OPG, ADNC и Lер ще повиши чувствителността на методиката за комплексна оценка на ССР при лица с дългогодишен Т1Д и ще бъде основание да се препоръча въвеждането им в рутинната клинична практика.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Да се анализира прогностична стойност на: ADMA, OPG, ADNC и Lер спрямо специфични инструменти за оценка на ССР – ST1RE и ESC 2019 г. и спрямо хематологични показатели при лица с дългогодишен Т1Д.

ЗАДАЧИ

1. Да се оцени прогностична стойност на ADMA спрямо специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР.
2. Да се оцени прогностична стойност на OPG спрямо специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР.
3. Да се оцени прогностична стойност на ADNC спрямо специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР.
4. Да се оцени прогностична стойност на Lер спрямо специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР.
5. Да се анализират зависимости между серумни нива на ADMA, OPG и хематологични показатели при Т1Д.
6. Да се анализират зависимости между серумни нива на ADNC, Lер и хематологични показатели при Т1Д.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

Дисертационният труд е изготвен като част от научен проект „Сърдечно-съдов и метаболитен риск, свързан с висцералната мастна тъкан, при пациенти с тип 1 захарен диабет“, подкрепен от Фонд „Научни изследвания“ към Министерство на образованието и науката (договор ДН 13/3 от 14.12.2017 г.).

Проучването се проведе в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна за периода 2018–2020 г. с участието на: Катедра по педиатрия, Първа катедра по вътрешни болести, Катедра по образна диагностика, Втора катедра по вътрешни болести, Катедра по клинична лаборатория, Катедра по социална медицина и организация на здравеопазването и Катедра по хигиена и епидемиология.

Протоколът за изследване е одобрен от Комисията по етика на научните изследвания към МУ-Варна – решение № 72, заседание 1.03.2018 г. Всички участници са получили и попълнили протокол за информирано съгласие.

- 1.1.** Обект на научното изследване: 59 здрави доброволци и 124 пациенти с Т1Д.
- 1.2.** Предмет на научното изследване: анализиране на прогностична стойност на ADMA, OPG, ADNC и Lер спрямо специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР и зависимости на биомаркерите с хематологични показатели.
- 1.3.** Място на научното изследване: лабораторните изследвания са извършени в МДЛ Клинична лаборатория към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.
- 1.4.** Характер на наблюдението: тип сравнение случай – контрола.
- 1.5.** Дизайн на проучването: в научното изследване са включени общо 183 участници, като не е извършван насочен подбор, а участието им е изцяло по тяхно желание. Параметрите за изследване са предварително дефинирани и проспективно събирани в рамките на изпитването. Проучването протече двуетапно е рамките на една седмица. При първата визита на пациентите в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна се проведе антропометрични, клинични, лабораторни и образни изследвания. Всеки участник е попълнил анкетна карта за придобиване на информация относно демографски данни, диабетен контрол, инсулинов режим и социално-икономически статус. При втората визита се проведе интервю от обучен изследовател с цел уточняване на неясноти и допълване на липсващата информация. Всеки участник трябва да отговаря на следните критерии:
 - 1.5.1.** Критерии за включване: пациенти с над 15 години давност на Т1Д; здрави доброволци от същия пол и възраст и със сходен ИТМ; желание за участие, удостоверено с писмено

информирано съгласие след съответното разрешение от Комисията по етика на научните изследвания.

1.5.2. Критерии за изключване: участие в клинични изпитвания на медикаменти или друг вид експериментална терапия; значима психична увреда или друг вид запрещение за самостоятелно решение за участие; значима инвалидизация и/или обездвижване; над 3% промяна в телесното тегло в последните 3 месеца; преживян ОМИ или друг съдов инцидент; остро заболяване/състояние по време на изследването (с изключение на диабетна кетоацидоза и хипогликемия) – възможно е отлагане за по-късна дата; бременност; при участници с диабет – преживени тежки хипогликемии или диабетна кетоацидоза в последните три месеца и/или наличие на тежки документирани микроваскуларни диабетни усложнения.

1.6. Биологичен материал.

За изследваните показатели в настоящото проучване е взета кръв при стандартизирани условия – сутрин на гладно (след 12-часова хранителна пауза) и първа сутрешна урина.

1.6.1. Пълна кръв, получена във вакутейнер с антикоагулант K₂EDTA, от който са изследвани пълна кръвна картина и HbA1C.

1.6.2. Серум, получен във вакутейнер с гел сепаратор, който е центрофугиран за 15 минути при 2500 G и с количество около 8 мл. От серум са изследвани CRP, ADMA, OPG, ADNC и Lер.

1.6.3. Първа сутрешна урина – в количество 20 мл. Биологичният материал е центрофугиран за 15 минути на 2500 G. От супернатанта е изследвана концентрацията на албумин (AlbU).

1.6.4. Пробите са изследвани до два часа след получаване на биологичния материал за всички параметри с изключение на ADMA, OPG, ADNC и Lер. Серумите за специфичните биомаркери са отпипетирани във вакутейнери без адитив с последващо съхранение на материала при температура -70°C до провеждане на анализа едновременно.

2. Методи

2.1. Анкетен метод. Преди получаване на биологичните материали всички участници в проучването са анкетирани от клиницисти с цел установяване наличието на критерии за включване.

2.2. Антропометрични показатели. Индексът на телесната маса (ИТМ) се изчисли по формулата = тегло в kg/ръст в метри².

2.3. Лабораторни методи.

2.3.1. Показателите от кръвната картина са определени на 5-diff хематологичен анализатор Sysmex XN 1000 по метода на флуоресцентна поточна цитометрия с използване на полупроводников лазер и хидродинамично фокусиране. Хематологичният анализатор прилага импедансен и оптичен метод при отчитане брой кръвни клетки, флуоресцентна

флуоцитометрия със странична светлина, предно и странично разсеяна светлина при диференциалното изброяване на левкоцитите и безцианиден колориметричен метод с натриев лаурил сулфат при измерване на хемоглобинова концентрация.

2.3.2. Рутинните биохимични показатели и съответните аналитични методи за количествено определяне са представени в таблица 4.

Таблица 4. Аналитични методи за определяне на CRP, HbA1C и AlbU

Показател	Лабораторен метод	Анализатор	LOD	Линейност	Референтни стойности
CRP (mg/l)	Имуно-турбидиметричен анализ	ADVIA chemistry 1800	0,04 mg/l	0,12–164 mg/l	0–5mg/l
HbA1C (%)	Имуно-инхибиционен анализ*	Advia chemistry 1800	2.0%	2.0–16%	<6%
AlbU (mg/l)	Имуно-турбидиметричен анализ	Olimpus AU600	0,25 mg/l	1,55-500 mg/l	<20 mg/24h

**HbA1C е определен по метод, стандартизиран съгласно DCCT/NGSP като резултатите са представени в процент, изчислен от съотношението HbA1C/Общ хемоглобин (ТНб). ТНб е измерен чрез колориметричен метод*

2.3.3. ADMA, OPG, ADNC и Lep. Серумните нива на биомаркерите са измерени чрез ELISA-метод (enzyme-linked immunosorbent assays) с готов тест набори. В таблица 5 са представени аналитични характеристики, специфични за всеки показател. Изследванията са направени според протоколните изисквания на производителя. Серумните нива на OPG са отчетени в pmol/l, на ADMA – в $\mu\text{mol/l}$, на ADNC – в $\mu\text{g/ml}$, на Lep – в ng/ml .

Таблица 5. Аналитични характеристики на ELISA-методи за количествено определяне на ADMA, OPG, ADNC и Lep

Показател	Производи-тел	LOD	Кръстосана реактивност	Линейност	Възпроизводимост CV%	Референтни стойности
ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	ADMA Fast ELISA, <u>DLDDianostika GmbH</u> , Germany	0,03 $\mu\text{mol/l}$	SDMA: 0,05% NMMA: 1,93% Хомоаргинин: <0,01% Аргинин: 0,03%	0,23–1,53 $\mu\text{mol/l}$	В серия: 0,58–1,04 $\mu\text{mol/l}$; 4,9–5,4%	0,40–0,75 $\mu\text{mol/l}$
					Между серии: 0,57–1,34 $\mu\text{mol/l}$; 4,3–9,6%	
OPG (pmol/l)	Human Osteoprotegerin ELISA, <u>BioVendor</u> , Czech Republic	0,03 pmol/l	sRANKL: не TRAIL: не CD40; TNF RI; TNF RII:<0,06%	1,5–60 pmol/l	В серия: 4,82–15,28 $\mu\text{mol/l}$; 2,5–4,9%	4,1 \pm 2,3 pmol/l
					Между серии: 4,83–14,33 $\mu\text{mol/l}$; 1,7–9,0%	
ADNC ($\mu\text{g/ml}$)	Human Adiponectin ELISA, <u>BioVendor</u> , Czech Republic	0,026 $\mu\text{g/ml}$	Lep: не LEPR: не Резистин: не	0,1–10 $\mu\text{g/ml}$	В серия: 11,71–12,28 $\mu\text{g/ml}$; 3,9–5,9%	Мъже: ИТМ ($\text{кг}/\text{м}^2$) <25: 10,9 \pm 4 $\mu\text{g/ml}$; 25-30: 8,8 \pm 4 $\mu\text{g/ml}$; >30-23 \pm 2,8 $\mu\text{g/ml}$. Жени: ИТМ ($\text{кг}/\text{м}^2$)<25: 13,6 \pm 5,4 $\mu\text{g/ml}$; 25-30: 13,9 \pm 8,6 $\mu\text{g/ml}$; >30-11,4 \pm 3,8 $\mu\text{g/ml}$.
					Между серии: 8,23–19,86 $\mu\text{g/ml}$; 6,3–7,0%	
Lep (ng/ml)	Leptin-ELISA Kit, <u>DIAsource</u> , Belgium	0,04 ng/ml	IL-1 α ; IL-1 β ; IL-4, IL-6, IL-8, IL-10; IL-15, TNF- α ; TNF- β ; IFN- γ ; IGF-1; инсулин; глюкагон - не.	0,5 – 60 ng/ml	В серия: 1,5–43,4 ng/ml; 3,5–13,3%	Жени: ИТМ ($\text{кг}/\text{м}^2$): 14-18:0,5-0,7 ng/ml; 18-24: 0,5-7,9 ng/ml; 25-29:4,1-14,5; 30-56:5,5-40,4 ng/ml. Мъже: ИТМ($\text{кг}/\text{м}^2$): 18-24:0,5-3,2 ng/ml; 25-29:0,5-14,6; 30-56:2,5-42,1 ng/ml.
					Между серии: 5,9-18,9 ng/ml; 10,2-12,7%	

2.4. Калкулатори за оценка на ССР

2.4.1. STENO Type 1 Risk Engine (ST1RE): изчисли се 10-годишен риск от нефатално и фатално ССЗ (ИБС, инсулт, периферно съдово заболяване). Калкулаторът включва пол, възраст, давност на диабета, предходно ССЗ, систолно артериално налягане, албинурия, HbA1C, eGFR, LDL холестерол; тютюнопушене; двигателна активност. Възприема се следните категории на риска: нисък (<10%); умерено повишен (10-20%) и висок ССР (\geq 20%). Приложен е линк на калкулатора: <http://www.sdcc.dk/T1riskengine>

2.4.2. Насоки на ESC от 2019 г. – таблица за систематична оценка на 10-годишен ССР въз основа на следните РФ: възраст, пол, тютюнопушене, систолично кръвно налягане и общ холестерол. Източник: [doi:10.1093/eurheartj/ehz455](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455)

Приема се следните категории на ССР: умерен риск (млади пациенти с Т1Д под 35 години, с продължителност на ЗД над 10 години, без други рискови фактори. Изчислен SCORE

$\geq 1\%$ и $< 5\%$ за 10-годишен риск от фатално ССЗ.); висок риск (пациенти със ЗД без увреждане на таргетните органи, с давност на диабета над 10 години или друг РФ. Изчислен SCORE $\geq 5\%$ и $< 10\%$ за 10-годишен риск от фатално ССЗ); много висок ССР (ЗД с увреждане на таргетните органи или наличие на три големи рискови фактори или ранна поява на Т1Д с голяма давност (над 20 години). Изчислен SCORE $\geq 10\%$ за 10-годишен риск от фатално ССЗ.

2.4.3. RiskFactor3. Конструиран е модел – комбинация от утвърдени в клиничната практика РФ за развитие на ССЗ при ЗД: HbA1C, CRP и AlbU. Възприеха се следните категории: за отдиференциране на лица с умерен от висок ССР – CRP под и над 3 mg/l; за отдиференциране на пациенти с добър от лош гликемичен контрол – HbA1C под и над 7%; за отдиференциране на лица с нормоалбуминурия – AlbU под 30 mg/l, микроалбуминурия – AlbU между 30, и 300 mg/l от микроалбуминурия – AlbU над 300 mg/l. Пациентите са групирани в следните групи: група 0 – без наличие на РФ от включените в предложения модел; група 1 – с наличие на 1 РФ; група 2 – с наличие на 2 РФ и група 3 – с наличие на 3 РФ.

2.5. Статистически методи. За статистическа обработка на данните са използвани възможностите на статистическия пакет SPSS 19 и са приложени следните методи.

2.5.1. Дескриптивна статистика. Определяне мерки за централна тенденция, мерки за разсейване на разпределението. Тестовите за проверка на нормално разпределение – Колмогоров–Смирнов (Kolmogorov–Smirnov) със статистически значимо ниво на Лилиефорс (Lilliefors), Шапиро–Уилк (Shapiro–Wilk) – статистически тестове, които ако не са статистически значими, данните имат нормално разпределение. Коефициенти на асиметрия (skewness) и ексцес (kurtosis), които са равни на 0 при нормално разпределение.

2.5.2. Корелационен анализ. Корелационен коефициент на Пирсън (r) за оценка на линейна връзка и коефициент на рангова корелация на Спирмън ро.

2.5.3. Линеен регресионен анализ. Единична линейна регресия за анализ на зависимостта между една независима променлива X и една зависима променлива Y. Множествен линеен регресионен анализ с цел да се анализира както поотделно, така и съвместно, влиянието на две или повече независими променливи върху една зависима променлива. При множествената линейна регресия зависимата променлива е интервална или пропорционална, а независимите променливи са количествени, категорийни или дихотомни.

2.5.4. Факторен анализ. Т-тест за независими извадки (independent-samples t-test) при определяне на статистически значимо различие между неизвестни средноаритметични стойности за две извадки. Еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA, one-factor ANOVA) за проверка на хипотезата, че средноаритметичните стойности за две и повече групи са равни. Постхок тест (post hoc test) за намиране между кои средноаритметични стойности

има различие – тест на Tukey HSD (Honestly Significant Difference) (тест на Туки за истинска статистическа значимост).

2.5.5. Непараметрични статистически методи за номинални данни. Хи-квадрат (χ^2) тест за съгласуваност (Chi-square (χ^2) test for goodness of fit) или хи-квадрат (χ^2) тест за една извадка (Chi-square one-sample test). Хи-квадрат (χ^2) тест за независимост (Chi-square (χ^2) test of independence) или хи-квадрат (χ^2) тест за асоциация (Chi-square test of association), при оценка дали две променливи са свързани по между си.

2.5.6. Бинарната логистична регресия с цел да се прогнозира вероятността на принадлежност към една от двете възможни групи (категории) на Y , които трябва да се кодират като 0 и 1. С 1 се кодира „успешният“ изход, а с 0 – „неуспешният“. Независимата променлива X е категорична или интервална, а зависимата Y – дихотомна.

2.5.7. Receiver – Operating Characteristic (ROC) анализ и площ под кривата (area under the curve, AUC) за оценка на чувствителност и специфичност на лабораторните показатели и за извеждане на cut-off стойности.

2.5.8. Използвано е критично ниво на значимост $\alpha = 0,05$, като нулевата хипотеза се отхвърля при стойност на p по-малка от α ($p < 0,05$).

2.5.9. Табличен и графичен метод за представяне на данните – прости и многомерни таблици; линейни, кръгово-секторни и стълбови диаграми.

V. РЕЗУЛТАТИ

1. Клинико-лабораторна характеристика на изследваните лица

В настоящото изследване са включени 59 здрави лица и 124 пациенти с Т1Д. Мъжете в контролната група са 33 (55,9%), а с Т1Д са 66 (53,2%). (Табл. 6) Жените при контролите са 26 (44,1%), а в групата с Т1Д – 58 (46,8%). Маргиналната честота за променливата пол е 99 мъже и 84 жени. Не се установява сигнификантна разлика в честотното разпределение на променливата пол и в двете изследвани групи, като $\chi^2 = 0,118$, $p = 0,731$.

Таблица 6. Разпределение по брой и пол на участниците

			ПОЛ		Общо	χ^2	P value
			Мъже	Жени			
Група участници	Контролна група	Бр.	33	26	59	0,118	0,731
		%	55,9%	44,1%	100,0%		
	Пациенти с Т1Д	Бр.	66	58	124		
		%	53,2%	46,8%	100,0%		
Общо		Бр.	99	84	183		
		%	54,1%	45,9%	100,0%		

В таблица 7 е съпоставена средната възраст на участниците в изследването. При контролната група, тя е $45,14 \pm 9,168$ години, а при лицата с Т1Д – $42,68 \pm 10,404$ години. Намерената разлика от 2,458 години не е сигнификантна, $t = 1,550$, $p = 0,123$.

Таблица 7. Разпределение по възраст на участниците в проучването.

	Група участници	N	mean	SD	t	P value	MD
Възраст (год.)	Контролна група	59	45,14	9,168	1,550	0,123	2,458
	Пациенти с Т1Д	124	42,68	10,404			

N – брой, *mean* – средна стойност, *SD* – стандартно отклонение, *MD* – средна разлика

Не се установява сигнификантна възрастова разлика между половете в двете изследвани групи, като мъжете в контролната група са на средна възраст $46,42 \pm 9,906$ години, а жените – $43,50 \pm 8,026$ години. При пациентите с Т1Д средната възраст на двата пола е почти идентична: за мъже – $42,89 \pm 10,459$ години, за жени – $42,43 \pm 10,426$ години. Няма сигнификантна разлика между така изследваните случаи – $p > 0,05$.

Средноаритметична давност на диабета е $25,31 \pm 8,224$ години, а медианата – 24 години. Междуполовото разпределение е следното: за мъжете е $24,50 \pm 7,455$ години, а за жените е $26,24 \pm 8,996$ години. Намерената разлика при продължителността на диабета е $MD = 1,741$ години, $t = 1,78$, $p = 0,241$.

В таблица 8 е представена клинико-лабораторна характеристика на изследваните лица от контролната група и пациентите с дългогодишен Т1Д. Значима междугрупова разлика не се

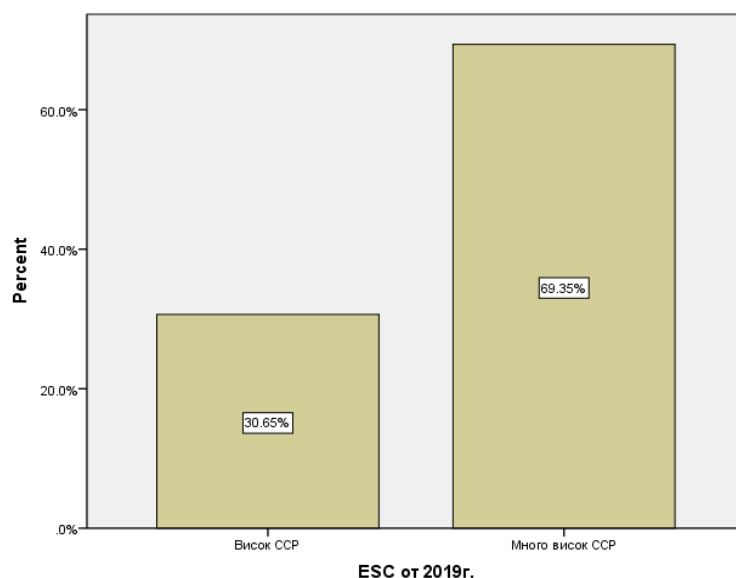
установява при съпоставка на следните променливи: ИТМ, CRP, ADMA, OPG и Лер. Резултатите от F-статистиката отхвърлиха нулевата хипотеза H_0 , че средноаритметичните стойности в двете групи са равни за следните показатели: HbA1C, AlbU и ADNC. Средната стойност на HbA1C% при пациентите с Т1Д е $8,472 \pm 1,619\%$ и тя е сигнификантно по-висока от тази на контролите – $5,403\% \pm 0,385\%$, $F = 205,696$, $p < 0,0001$. Значима разлика в полза на пациентите с Т1Д се установява между средните стойности за AlbU – $63,723 \text{ mg/L} \pm 147,378 \text{ mg/L}$ спрямо $12,217 \pm 19,878 \text{ mg/L}$, $F = 7,004$, $p = 0,009$ при контролите. Разликата, която също заслужава внимание, е при нивото на ADNC, като за лицата с Т1Д, то е $14,718 \pm 10,254 \text{ } \mu\text{g/ml}$, а при контролите – $10,569 \pm 12,283 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Отчетената разлика е сигнификантна, $F = 5,210$, $p = 0,024$.

Таблица 8. Клинико-лабораторна характеристика на участниците в изследването

Показател	Група с Т1Д			Контролна група			F	P value
	N	mean	SD	N	mean	SD		
ИТМ (kg/m^2)	91	25.708	4.110	33	24.879	3.805	1.025	0.313
CRP (mg/l)	123	3.561	9.304	59	2.572	3.761	0.617	0.433
Гликиран хемоглобин (HbA1C%)	124	8.472	1.619	59	5.403	0.385	205.696	0.000
Албуминурия (AlbU) (mg/L)	123	63.723	147.378	58	12.217	19.878	7.004	0.009
ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	114	0.527	0.256	54	0.572	0.186	1.340	0.249
Остеопротегерин (OPG) (pmol/l)	113	5.528	1.545	54	5.568	2.073	0.019	0.891
Адипонектин (ADNC) ($\mu\text{g/ml}$)	111	14.718	10.254	54	10.569	12.283	5.210	0.024
Лептин (Lep) (ng/ml)	109	5.463	5.754	51	4.544	3.472	1.108	0.294

Легенда: N – брой; mean – средна стойност; SD – стандартно отклонение.

Фигура 1 демонстрира процентното разпределение на пациентите спрямо категорията на ССР съгласно критериите на ESC от 2019 г.: 30,6% от пациентите имат висок ССР, а 69,4% – много висок ССР. (фиг. 1)



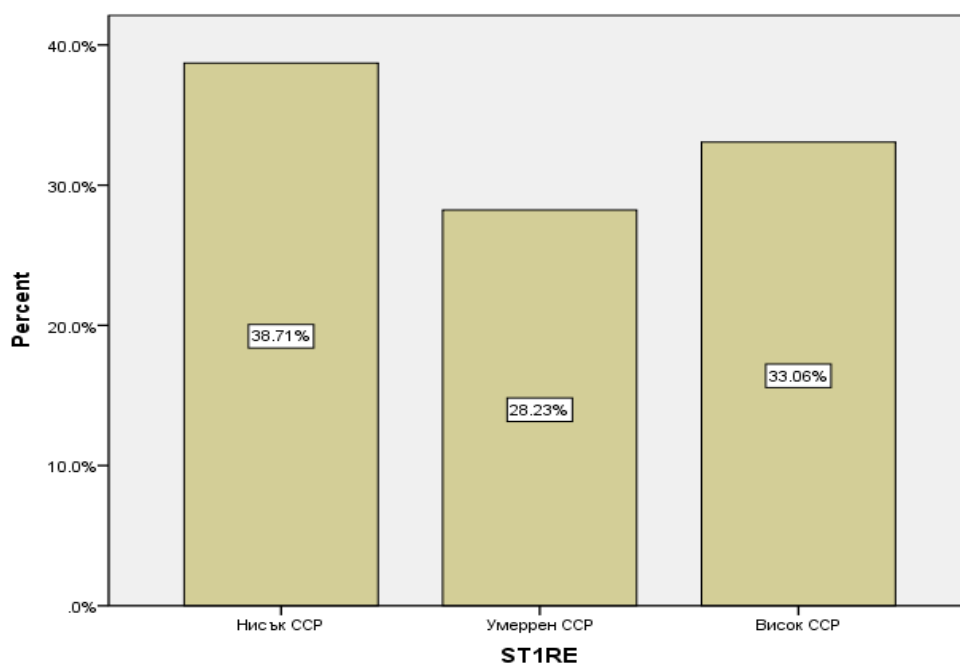
Фигура 1. Процентно разпределение на пациенти с Т1Д според ESC от 2019 г.

Не се установява сигнификантна междуполова разлика при ESC от 2019 г. – $\chi^2 = 0,480$, $p = 0,489$. (табл. 9)

Таблица 9. Честотно разпределение по пол при пациенти с дългогодишен Т1Д според категорията на ССР по ESC от 2019 г.

			ПОЛ		Общ брой/дял	χ^2	P value
			Мъже	Жени			
ESC от 2019 г.	Висок ССР	Count	22	16	38	0,480	0,489
		% within ESC 2019 г.	57,9%	42,1%	100,0%		
	Много висок ССР	Count	44	42	86		
		% within ESC 2019 г.	51,2%	48,8%	100,0%		
Общо брой/дял		Count	66	58	124		
		% within ESC 2019 г.	53,2%	46,8%	100,0%		

Фигура 2 демонстрира процентното разпределение на пациентите спрямо определената с калкулатора ST1RE категорията на ССР: 38,7% попадат в категорията нисък ССР; 28,2% – с умерен риск и 33,1% с висок ССР.

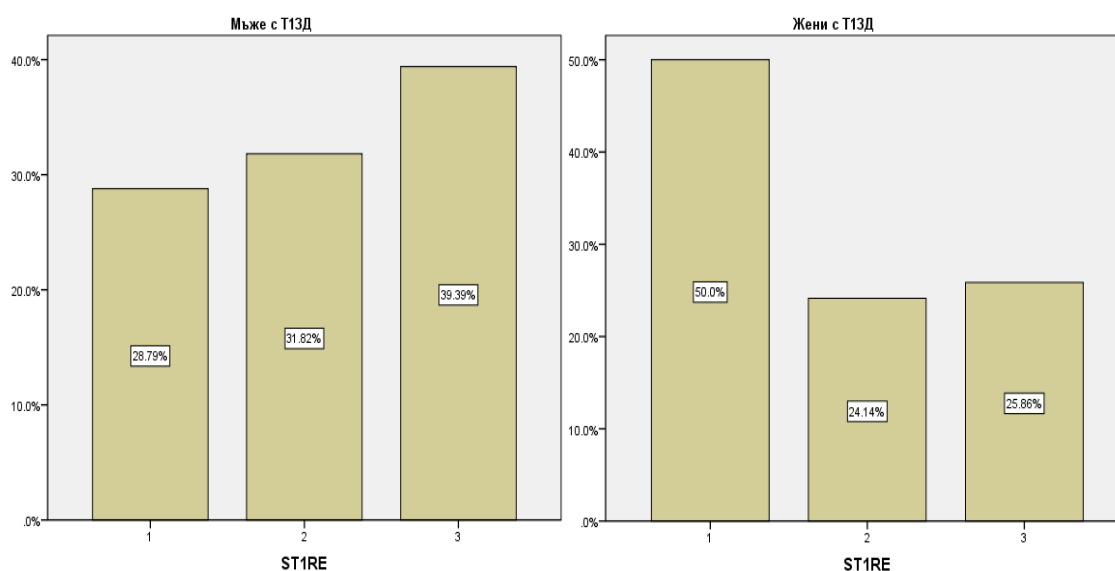


Фигура 2. Процентно разпределение на ССР при лица с Т1Д според ST1RE

В таблица 10 са представени относителните дялове на изследваните от клиничната група мъже и жени с нисък, умерен и висок ССР според ST1RE. Установява се, че 39,6% от пациентите с нисък ССР са мъже, а 60,4% – жени. При лицата с умерен и висок ССР се отчете по-голям относителен дял на мъжете. В групата на висок ССР, 60% са мъже и 40% жени, а в групата на много висок ССР – 63,4% са мъже и 36,6% са жени. Отчита се сигнификантна междугрупова разлика – $\chi^2 = 5,943$, $p = 0,051$. Прави впечатление, че според ST1RE процентният дял на мъжете с умерен и висок ССР (71,1%) е значително по-голям от този при жените (50%). Тази разлика е онагледена на фигура 3. (фиг. 3)

Таблица 10. Честотно разпределение по пол при пациенти с Т1Д според категорията на ССР от калкулатора ST1RE

		ПОЛ		Общ брой/дял	χ^2	P value	
		Мъже	Жени				
ST1RE	Нисък риск	Count	19	29	48	5.943	0,051
		% within ST1RE	39,6%	60,4%	100,0%		
	Умерен риск	Count	21	14	35		
		% within ST1RE	60,0%	40,0%	100,0%		
	Висок риск	Count	26	15	41		
		% within ST1RE	63,4%	36,6%	100,0%		
Общ брой/дял		Count	66	58	124		
		% within ST1RE	53,2%	46,8%	100,0%		



Фигура 3. ССР при мъже и жени с Т1Д според ST1RE

2. Прогностична стойност на ADMA за оценка на ССР при лица с дългогодишен Т1Д

2.1. ADMA – влияние на пол, възраст и давност на диабета

В таблица 11 са съпоставени средните нива на ADMA в зависимост от пола между случаите от контролната група и пациентите с Т1Д. Стойностите на променливата са отчетени по-високи при жените в двете изследвани групи, но намерените разлики не са сигнификантни: $0,5401 \pm 0,244 \mu\text{mol/l}$ за жени с Т1Д спрямо $0,5158 \pm 0,2687 \mu\text{mol/l}$ за мъже с Т1Д, MD = 0,0243, $p = 0,614$ и $0,6148 \pm 0,1435 \mu\text{mol/l}$ за здрави жени спрямо $0,5368 \pm 0,2687 \mu\text{mol/l}$ за здрави мъже, MD = 0,0779 $\mu\text{mol/l}$, $p = 0,126$.

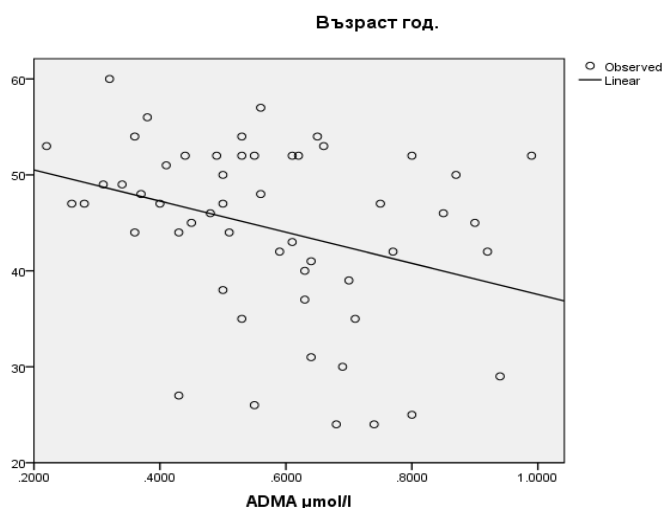
Таблица 11. Средни стойности на ADMA в зависимост от пола

Група		Пол	N	mean	SD	MD	t	P value
Т1Д	ADMA	Мъже	58	0,2687073	-0,0243	0,515862	-0,506	0,614
	($\mu\text{mol/l}$)	Жени	56	0,2444845		0,540179		
Контроли	ADMA	Мъже	29	0,2119485	-0,0779	0,536897	-1,555	0,126
	($\mu\text{mol/l}$)	Жени	25	0,1435595		0,614800		

Предложените от производителя на ELISA реагентен кит за ADMA референтни стойности са от 0,40 до 0,75 $\mu\text{mol/l}$. В групата на контролните изследвани 18,5% имат стойности за ADMA по-ниски от 0,40 $\mu\text{mol/l}$, 63% попадат в референтния обхват, а 18,5% от случаите имат по-високи резултати за ADMA от 0,75 $\mu\text{mol/l}$. При пациентите с дългогодишен Т1Д процентното разпределение на резултатите за ADMA спрямо посочения референтен

интервал е следният: 33,3% от случаите имат по-ниски стойности от 0,40 $\mu\text{mol/l}$; 46,5% попадат в референтния обхват, а 20,5% имат по-високи резултати за ADMA от 0,75 $\mu\text{mol/l}$.

При контролите се регистрира значима отрицателна корелация между възрастта и концентрацията на ADMA, $r = -0,329$, $p = 0,015$. (фиг. 4) В групата на лицата с дългогодишен Т1Д, тази зависимост се запазва като посока, но губи сигнификантността си: $r = -0,0016$, $p = 0,865$. (табл. 18)



Фигура 4. Корелационна зависимост между възрастта и ADMA при контроли

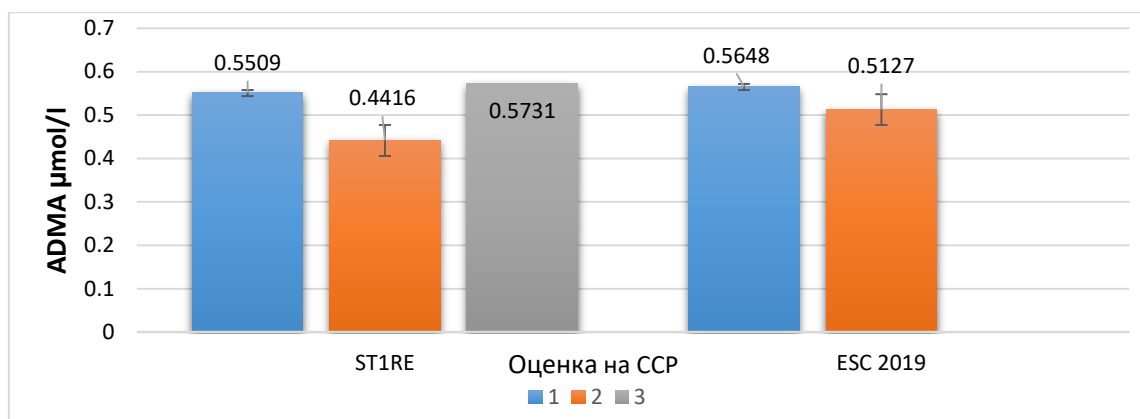
При съпоставката на показателя ADMA случаите с по-голяма продължителност на Т1Д са с по-ниско ниво $0,497 \pm 0,239 \mu\text{mol/l}$, а при давност на Т1Д под 24 години средната стойност на маркера е по-висока – $0,561 \pm 0,271 \mu\text{mol/l}$, MD = $0,064 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,184$. Не се установява значима корелация между давността на Т1Д и ADMA ($\mu\text{mol/l}$).

2.2. ADMA – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.

На фигура 5 са представени средните нива на ADMA в зависимост от категорията на ССР според ST1RE и ESC от 2019 г. при пациентите с Т1Д. Приложи се еднофакторен дисперсионен анализ за проверка на статистическа значимост на разликата между средноаритметичните стойности на ADMA. При пациентите с нисък ССР, оценен със ST1RE, средната стойност на показателя е $0,5509 \pm 0,2572 \mu\text{mol/l}$. При лицата с умерен ССР – $0,4416 \pm 0,2062 \mu\text{mol/l}$, а при пациентите с висок риск е $0,5731 \pm 0,2801 \mu\text{mol/l}$. F-тестът показва, че може да се отклони нулевата хипотеза H_0 , която дефинира, че средните стойности за групите са равни – $F = 2,673$, $p = 0,074$. След приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey) се установи значимо различие в средните нива на ADMA между групата с умерен ССР и тази с висок ССР, но при 90% достоверност на резултатите: MD = $0,1315 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,078$ (тук се предполага допускане на грешка от втори род).

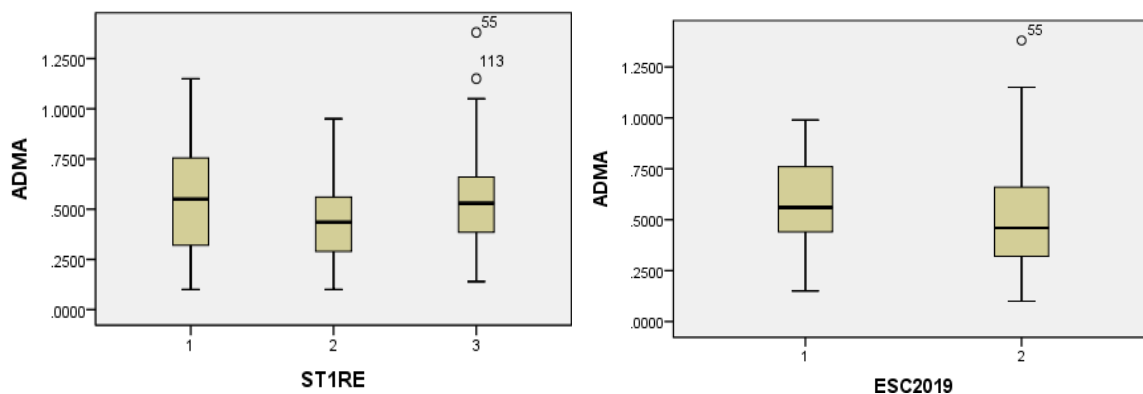
T-тестът за независими извадки (independent-samples t-test) на Стюдънт не отчете сигнификантна разлика между средните нива на ADMA за пациентите с висок и тези с много висок ССР според ESC от 2019 г. ($t = 0,985$, $p = 0,327$). В групата на пациенти с висок риск според ESC от 2019 г. средната стойност на показателя е $0,5648 \pm 0,2262 \mu\text{mol/l}$, а при лицата с много висок ССР – $0,5127 \pm 0,2674 \mu\text{mol/l}$.

При последваща междуполова съпоставка спрямо специфичните за T1D инструменти за оценка на ССР не се установиха значими различия в средните нива на ADMA: $F = 1,90$, $p = 0,159$ за мъже и $F = 0,826$, $p = 0,443$ за жени при ST1RE и $t = 1,019$, $p = 0,209$ за мъже и $t = 0,352$, $p = 0,685$ за жени при ESC от 2019 г.



Фигура 5. Средни стойности на ADMA ($\mu\text{mol/l}$) в зависимост от категорията на ССР, оценен по модела на ST1RE и ESC 2019 г. при лица с дългогодишен T1D. ST1RE: 1 – нисък риск; 2 – умерено висок риск; 3 – много висок риск. ESC 2019 г.: 1 – висок риск; 2 – много висок риск

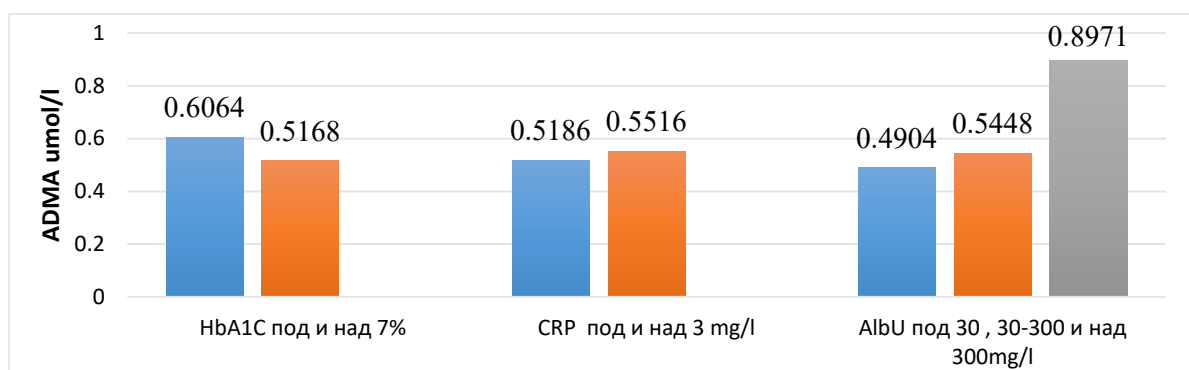
Медианата и интерквартилният обхват на ADMA при лицата с нисък ССР според критериите на ST1RE е $0,55$ ($0,32$ – $0,76$) $\mu\text{mol/l}$; с умерено висок ССР е $0,435$ ($0,285$ – $0,595$) $\mu\text{mol/l}$; с висок риск е $0,53$ ($0,37$ – $0,66$) $\mu\text{mol/l}$. Медианата и интерквартилният обхват на ADMA при лицата с висок ССР според ESC от 2019 г. е $0,560$ ($0,44$ – $0,77$) $\mu\text{mol/l}$; с много висок ССР е $0,46$ ($0,32$ – $0,66$) $\mu\text{mol/l}$. (фиг. 6)



Фигура 6. Разпределение на резултатите за ADMA ($\mu\text{mol/l}$) при пациенти с T1D от различни категории на ССР съгласно критериите на ESC от 2019 г. и калкулатора ST1RE

2.3. ADMA – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3

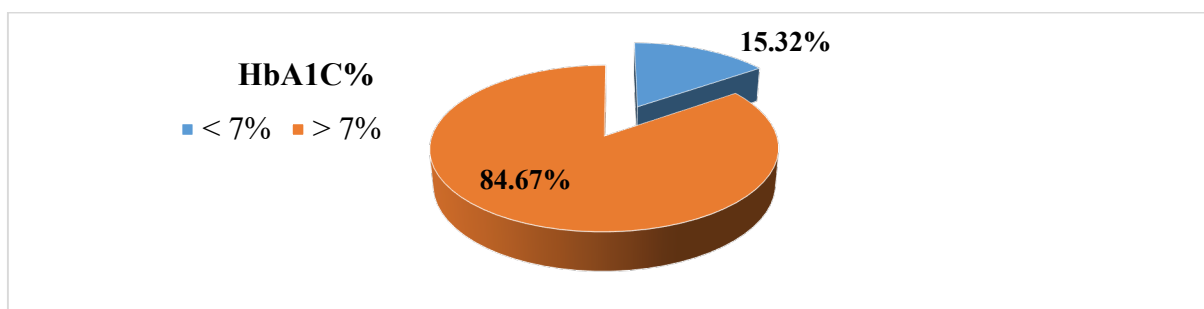
При лицата с дългогодишен Т1Д се приложи еднофакторен дисперсионен анализ за средните нива на ADMA спрямо AlbU и t-тест за независими извадки на Стюдънт спрямо CRP и HbA1C. На фигура 7 са представени средните нива на изследваната променлива спрямо HbA1C под и над 7% ($0,6064 \pm 0,2467 \mu\text{mol/l}$ и $0,5168 \pm 0,2568 \mu\text{mol/l}$); спрямо CRP под и над 3 mg/l ($0,5186 \pm 0,2577 \mu\text{mol/l}$ и $0,5515 \pm 0,2593 \mu\text{mol/l}$) и спрямо AlbU – под 30 mg/l, между 30 и 300 mg/l и над 300 mg/l ($0,4904 \pm 0,2262 \mu\text{mol/l}$; $0,5448 \pm 0,2756 \mu\text{mol/l}$ и $0,8971 \pm 0,2962 \mu\text{mol/l}$). Сигнификантна разлика се установи между така съпоставените групи спрямо стойността на AlbU, $F = 9,193$, $p = 0,000$. (фиг. 7)



Фигура 7. Средни нива на ADMA ($\mu\text{mol/l}$) при: HbA1C под и над 7%, CRP под и над 3 mg/l и AlbU под 30 mg/l, между 30 и 300 mg/l и над 300 mg/l при пациенти с Т1Д

Постхок анализ на Туки HDS (Tukey) демонстрира сигнификантни различия в стойностите на ADMA между изследваните с AlbU под 30 mg/l и AlbU над 300 mg ($MD = 0,407 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,000$) и между случаите с AlbU от 30 до 300 mg/l спрямо случаите с AlbU над 300 mg/l ($MD = 0,352 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,003$).

На фигура 8 е представено процентното разпределение на пациентите с Т1Д спрямо стойността на HbA1C – под и над 7%. Отчита се преобладаващ дял на лош гликемичен контрол: 84,67% (105) спрямо 15,32% (19) с добър гликемичен контрол. При случаите от контролната група не се регистрират лица с HbA1C над 7%. (фиг. 8)



Фигура 8. Процентно разпределение на пациенти с Т1Д според HbA1C – под и над 7%

В таблица 12 се съпоставиха случаите от контролната група и пациентите с Т1Д в зависимост от стойността на AlbU. Нормоалбумнурия се установи при почти всички контроли – 91,4%, а при лицата с Т1Д – 73,4%. Пациентите с микроалбуминурия са 20,2% спрямо 8,6% в контролната група. Макроалбуминурия се регистрира само при пациентите с Т1Д – 6,5%. При тази съпоставка на относителните дялове се отчита сигнификантна разлика – $\chi^2 = 8,552$, $p = 0,014$.

Таблица 12. Разпределение на лицата от контролна и клинична групи в зависимост от стойността на AlbU

			Албуминурия AlbU (mg/l)			Общ брой	χ^2	P value
			под 30 mg/l	от 30 до 300 mg/l	над 300 mg/l			
Група	Контролна група	Count	53	5	0	58	8,552	0,014
		%	91,4%	8,6%	0%	100,0%		
	Т1Д	Count	91	25	8	124		
		%	73,4%	20,2%	6,5%	100,0%		

При анализ на корелационните зависимости между ADMA и изследваните променливи (HbA1C, CRP и AlbU) се установява една сигнификантна връзка при пациентите с дългогодишен Т1Д. ADMA се асоциира положително с AlbU, като регистрираната корелация тук е значима: $r = 0,371$, $p = 0,000$. Отчетената зависимост между ADMA и CRP е незначима, а между ADMA и HbA1C е отрицателна по посока и слаба по сила, но отново не достига сигнификантна значимост: $r = -0,150$, $p = 0,111$. В групата на контролите се установява само една сигнификантна връзка между HbA1C и CRP ($r = 0,310$, $p = 0,014$). (табл. 13)

Таблица 13. Корелационни зависимости между ADMA, HbA1C, CRP и AlbU

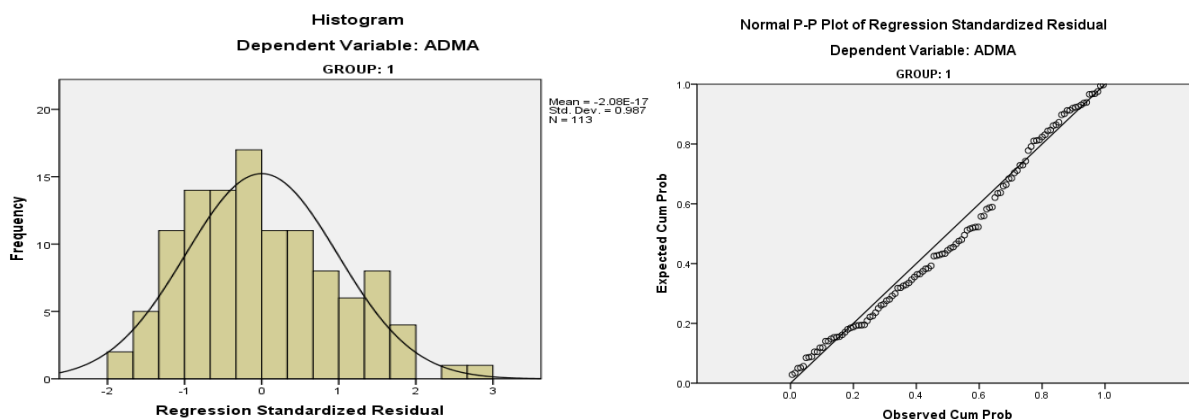
			HbA1C%	AlbU (mg/l)	CRP (mg/l)
Т1Д	ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	Pearson Correlation	-0.150	0.371**	-0.027
		P value	0.111	0.000	0.774
		Брой	114	114	113
	HbA1C %	Pearson Correlation		0.092	0.043
		P value		0.309	0.635
		Брой		123	123
	AlbU (mg/l)	Pearson Correlation			0.020
		P value			0.823
		Брой			122
Контроли	ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	Pearson Correlation	-0.196	0.095	0.012
		P value	0.156	0.497	0.933
		Брой	54	53	54
	HbA1C %	Pearson Correlation		-0.070	0.319*
		P value		0.602	0.014
		Брой		58	59
	AlbU (mg/l)	Pearson Correlation			-0.091
		P value			0.498
		Брой			58

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). * . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

С цел да се установи линейната комбинация между ADMA и анализираниите променливи (CRP, HbA1C и AlbU) беше приложен множествен линеен регресионен анализ. Регистрира се статистически значима комбинация от променливите CRP, HbA1C и AlbU за прогноза на стойността на ADMA при лицата с Т1Д, $F = 7,584$, $p = 0,000$. Конструираният модел е статистически незначим за контролната група – $F = 0,902$, $p = 0,447$. При лицата с Т1Д, регресионната константа $\alpha = 0,739$, $p = 0,000$ и стандартизираните регресионни коефициенти $\beta_{\text{AlbU}} = 0,387$, $p = 0,000$, $\beta_{\text{HbA1C}} = -0,186$, $p = 0,036$ са статистически значими, а β_{CRP} загубва сигнификантността си. Намереното уравнение за връзката между променливите е:

$$\text{ADMA}(\mu\text{mol/l}) = 0,739 + 0,387 \cdot \text{AlbU}(\text{mg/l}) - 0,186 \cdot \text{HbA1C}(\%)$$

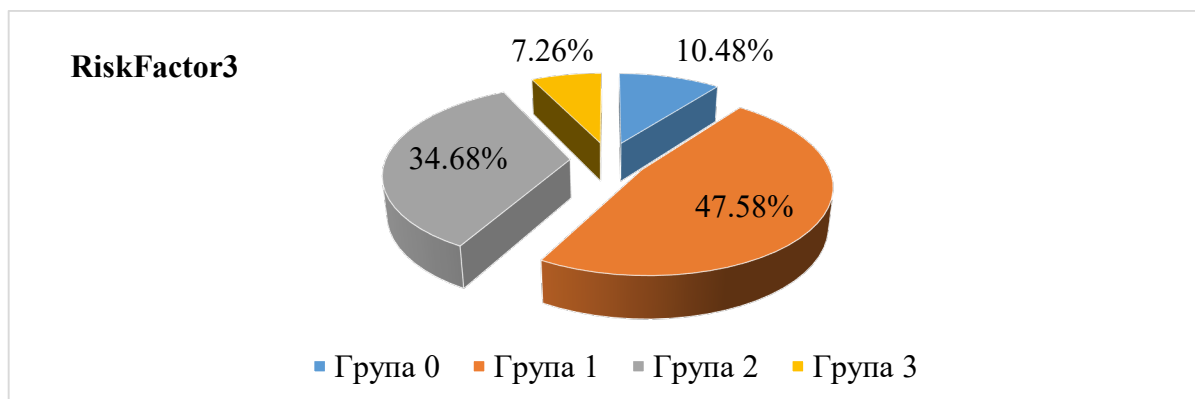
Силата на зависимостта между комбинацията от независимите променливи (CRP, HbA1C и AlbU) и зависимата променлива (ADMA) е умерена към силна: $R = 0,414$. Следователно има праволинейна, абсолютна корелация. Стойността на коригирания коефициент на детерминация (adjusted R^2) е $R^2 = 0,149$. Това показва, че 15% от измененията в стойността на ADMA могат да се обяснят с представения регресионен модел. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е средна към голяма или по-голяма от типичната големина на ефекта. За проверка на ключовата предпоставка на множествения регресионен анализ за хомогенност на дисперсията са представени стандартизирани графики за остатъчни членове. Статистическата проверка за нормално разпределение на резултатите, както и визуалната оценка на хистограмата, показва нормално Гаусово разпределение на резултатите за ADMA при лицата с Т1Д. От P-P Plot се вижда се, че „дебелата“ линия лежи много близо до „тънкия“ диагонал. (Фиг. 9)



Фигура 9. Графики за нормално разпределение като предпоставка на регресионния анализ: хистограма и P – P Plot

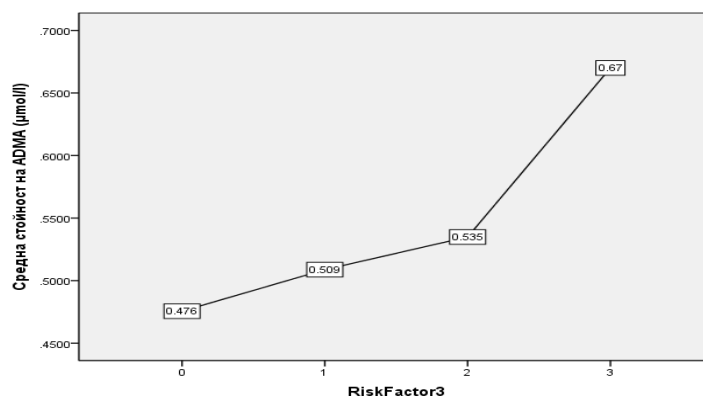
Пациентите с дългогодишен Т1Д бяха разпределени в допълнителни три подгрупи в зависимост от броя и наличието на следните отрязващи стойности: $\text{CRP} \geq 3 \text{ mg/l}$, $\text{HbA1C} \geq 7\%$ и $\text{AlbU} \geq 30 \text{ mg/l}$), дефинирани като РФ за развитие на ССЗ. Предложеният модел е наименуван

RiskFactor3 и определя следните категории: 0 – без наличие на нито един от избраните рискови фактори, 1 – наличие на един РФ, 2 – наличие на два рискови фактора и 3 – наличие на три рискови фактора. (фиг. 10)



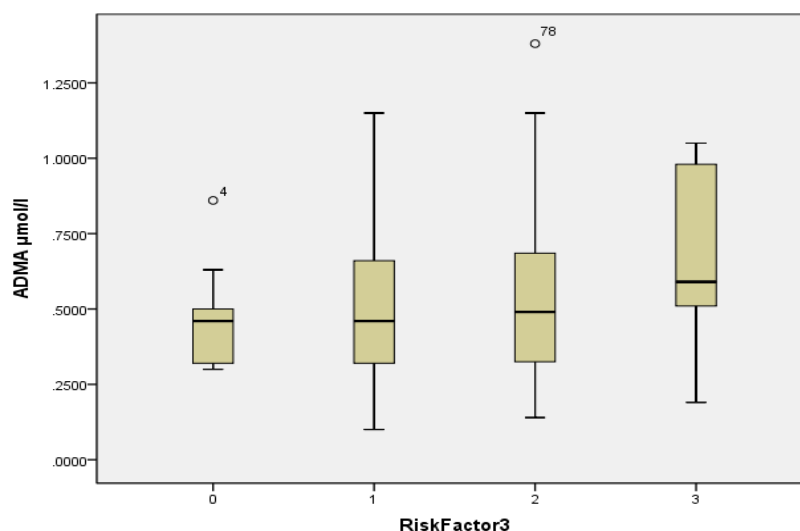
Фигура 10. Процентно разпределение на пациентите с Т1Д според Riskfactor3

Определиха се съответстващи на всяка група от RiskFactor3 средни стойности на ADMA. В група 0 относителният дял на пациенти с Т1Д е 10,48% при ADMA – $0,476 \pm 0,18 \mu\text{mol/l}$. Най-голям дял се регистрира в подгрупата с един РФ – 47,58% и средна стойност на ADMA – $0,509 \pm 0,241 \mu\text{mol/l}$. В подгрупа 2 попадат 34,68% от общия брой пациенти при ADMA – $0,535 \pm 0,276 \mu\text{mol/l}$, а в подгрупа 3 – 7,26% при ADMA – $0,67 \pm 0,306 \mu\text{mol/l}$. Не се отчита сигнификантна разлика в средните нива на ADMA, $F = 1,168$, $p = 0,325$. Независимо от този факт се наблюдава тенденция за правопрпорционално увеличаване в стойността на ADMA. При по-голям брой изследвани вероятно ще бъде статистически значима. (фиг. 11)



Фигура 11. Средни стойности на ADMA според Riskfactor3. На ординатната ос са маркирани средните нива на ADMA, а на абсцисата – съответните групи според RiskFactor3

Медианите и интерквартилните обхвати на ADMA при лицата с Т1Д от различните групи според RiskFactor3 са следните: $0,46 (0,31-0,565) \mu\text{mol/l}$ за група 0; $0,46 (0,32-0,66) \mu\text{mol/l}$ за група 1; $0,49 (0,32-0,69) \mu\text{mol/l}$ за група 2 и $0,59 (0,44-1,01) \mu\text{mol/l}$ за група 3. (фиг. 12)



Фигура 12. Разпределение на резултатите за ADMA ($\mu\text{mol/l}$) при лица с Т1Д в зависимост от групите на RiskFactor3

В таблица 14 са представени корелационни зависимости при пациентите с дългогодишен Т1Д между ADMA и инструменти за оценка на ССР – ST1RE и ESC от 2019 г., както и с предложения модел RiskFactor3. Установените корелации между избраните скали са сигнификантни и прави по посока. Най-силна зависимост се отчита между ST1RE и ESC от 2019 г. с $r = 0,349$, $p = 0,000$, последвана от тази между ST1RE и RiskFactor3 с $r = 0,254$, $p = 0,004$. Корелацията между ESC от 2019 г. и RiskFactor3 е значима, но по-слаба по сила с $r = 0,224$, $p = 0,012$. ADMA се асоциира по-силно единствено с Riskfactor3, но не достига статистическа значимост, $r = 0,159$, $p = 0,092$.

Таблица 14. Корелационни зависимости при лица с Т1Д между ADMA и: ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3

			RiskFakctor3	ESC от 2019 г.	ST1RE
	ADMA (umol/l)	Pearson Correlation	0.159	-0.093	0.031
		P value	0.092	0.327	0.741
		Брой	114	114	114
	RiskFakctor3	Pearson Correlation		0.224*	0.254**
		P value		0.012	0.004
		Брой		124	124
	ESC от 2019 г.	Pearson Correlation			0.349**
		P value			0.000
		Брой			124

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). * . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

2.4. ROC анализи за извеждане на прагови стойности на ADMA при Т1Д

За установяване на прагови стойности на ADMA, които отдиференцират групите с нисък към умерен от тези с висок ССР според различните модели се приложи ROC анализ. В таблица

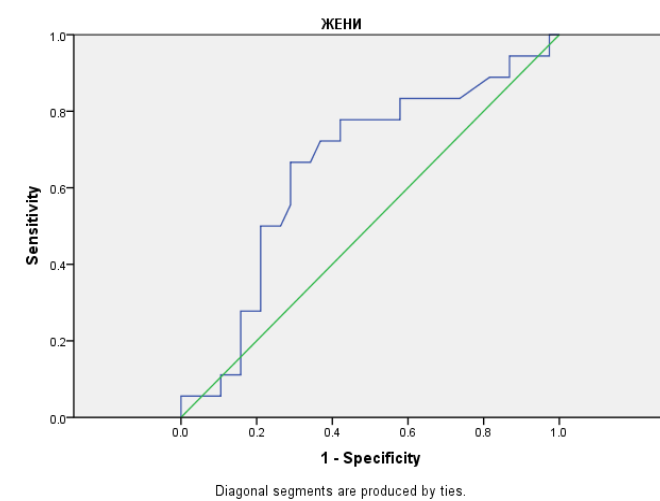
15 са представени обобщени резултати от анализа. Не се установява добра прогностична стойност на ADMA спрямо специфичните за Т1Д инструменти за оценка на ССР: при ST1RE, AUC е 0,564, $p = 0,265$, а при ESC от 2019 г. – AUC е 0,410, $p = 0,131$. При RiskFactor3, AUC е 0,543, $p = 0,451$. (табл. 15)

Таблица 15. ROC анализ за оценка на прогностична стойност на ADMA

Модел	Критерий	Area Under the Curve				
		Променлива: ADMA				
ST1RE	Висок ССР	AUC	SE	P value	Asymptotic 95% CI	
					Lower Bound	Upper Bound
		0,564	0,056	0,265	0,453	0,674
ESC 2019 г.	Много висок ССР	0,410	0,058	0,131	0,297	0,523
RiskFactor3	2 РФ	0,543	0,058	0,451	0,430	0,657

AUC – площ под кривата; SE – standard error; CI (confidence interval) – интервал на доверителност.

При последващо анализиране в зависимост от половата принадлежност, се отчете по-висока стойност на AUC само при жените спрямо RiskFactor3 (AUC – ROC е 0,653, $p = 0,067$). (фиг. 13) Този факт позволи извеждането на прагова стойност за ADMA – 0,535 $\mu\text{mol/l}$ при чувствителност 72,2% и специфичност 63,2%. Определиха се вероятностни отношения ($LR+ = 1,96$ и $LR- = 0,51$), диагностично отношение на шансовете ($DOR = 3.84$), индекс на Youden = Чувствителност + специфичност - 1 = 1,09 и диагностична ефективност (ДЕ) = 66%. (табл. 16)



Фигура 13. AUC-ROC крива за оценка на прогностична стойност на ADMA при жени спрямо RiskFactor3. AUC – площ под кривата; SE – standard error; CI – confidence interval

Таблица 16. Диагностична надеждност на ADMA при жени спрямо RiskFactor3

Показател	Критерий	cut-off	N	ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС	ДЕ
ADMA – жени (μmol/l)	RiskFactor3 ≥ 2 фактора	0,535	56	13	24	14	5	72,2%	63,2%	66%

ИП – истински положителни, ИО – истински отрицателни, ФП – фалшиво положителни, ФО – фалшиво отрицателни

3. Прогностична стойност на OPG за оценка на ССР при лица с дългогодишен Т1Д

3.1. OPG – влияние на пол, възраст и давност на диабета

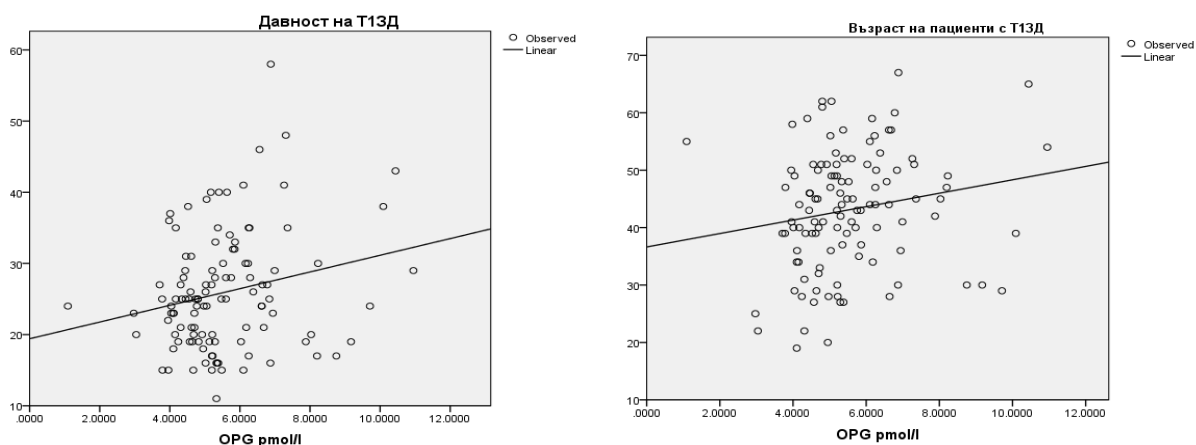
В таблица 17 са съпоставени средните нива на OPG в зависимост от пола между случаите от контролната група и пациентите с Т1Д. В двете групи се установи статистически значима разлика в полза на жените. При пациентите с Т1Д средната стойност на OPG е $5,3417 \pm 1,996$ pmol/l за мъже и $5,7261 \pm 1,8323$ pmol/l за жени, а намерената разлика MD е $0,3844$ pmol/l, $p = 0,055$. Средните нива на OPG при контролите мъже са $5,0555 \pm 1,6451$ pmol/l, а при жените са $6,1632 \pm 2,3772$ pmol/l. Отчетената разлика от $1,1077$ pmol/l отново е сигнификантна – $p = 0,049$.

Таблица 17. Средни стойности на OPG в зависимост от пола

Група	Пол	N	mean	SD	t	P value	MD
Т1Д	Мъже	58	5,341724	1,1996463	-1,326	0,055	-0,3844
	Жени	55	5,726182	1,8323770			
Контроли	Мъже	29	5,055517	1,6450935	-2,013	0,049	-1,1077
	Жени	25	6,163200	2,3772265			

брой; mean – средна стойност; SD – стандартно отклонение

При съпоставяне на средните нива на OPG спрямо медианата на давността на диабета (под и над 24 години) се отчитат по-високи стойности при изследваните с по-голяма продължителност на заболяването ($5,723 \pm 1,506$ pmol/l) спрямо изследваните с давност под 24 години – $5,317 \pm 1,574$ pmol/l. Разликата тук е $0,406$ pmol/l, $t = -1,400$, $p = 0,164$. Давността на диабета корелира сигнификантно с нивото на OPG: $r = 0,220$, $p = 0,019$. (табл. 18, фиг. 14)



Фигура 14. Корелационни зависимости между OPG и: възрастта и давността на заболяването при пациенти с Т1Д

В таблици 18 са представени регистрирани корелации между анализирани променливи – давност на Т1Д, възраст, ADMA и OPG при лицата от контролната група и изследваните от клиничната група. При контролите между OPG и възрастта се отчита отрицателна и слаба по сила корелация ($r = -0,284$, $p = 0,038$), която при по-нататъшно междуполово изследване се оказва значима само при мъжете ($r = -0,565$, $p = 0,001$).

При диабетно болните анализиранията зависимост става положителна и е по-слабо изразена, а значимостта ѝ е при 90% достоверност на резултатите: $r = 0,173$, $p = 0,067$. Възрастта на пациентите се асоциира положително с давността на диабета, като корелацията е закономерна ($r = 0,435$, $p = 0,000$). Представени са регресионни криви, които изобразяват зависимостите между OPG и възрастта и давността на диабета при лицата с Т1Д. Отчетените коефициенти на детерминация са съответно: $R^2 = 0,030$, $p = 0,06$ спрямо възрастта и $R^2 = 0,048$, $p = 0,019$ спрямо давността на диабета. (фиг. 14)

Отчита се и значима положителна корелация между OPG и ADMA и в двете изследвани групи. При контролите тя е средна по сила $r = 0,362$, $p = 0,007$. При лицата с дългогодишен Т1Д зависимостта е по-слаба по сила и е значима при 90% достоверност на резултатите – $r = 0,175$, $p = 0,064$. (табл. 18)

Таблица 18. Корелации между OPG и: ADMA, възраст и давност на Т1Д

Група			ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	Възраст (год.)	Давност (год.)
Т1Д	OPG (pmol/l)	Pearson Correlation	0,175	0,173	0,220
		P value	0,064	0,067	0,019
		Брой	113	113	113
Контроли	OPG (pmol/l)	Pearson Correlation	0,362	-0,284	*
		P value	0,007	0,038	*
		Брой	54	54	*

3.2. OPG – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.

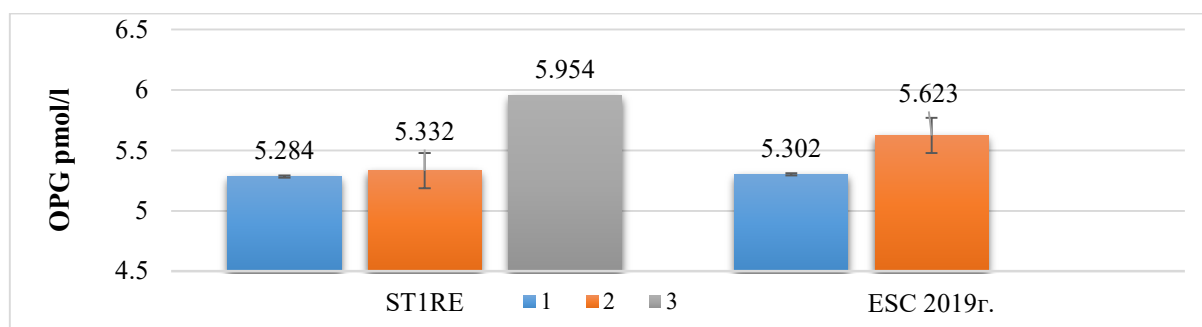
В таблица 19 са представени корелационни зависимости между OPG и специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР – ST1RE, ESC от 2019 г., както и с предложения модел RiskFactor3. OPG се асоциира положително със ST1RE, като намерената корелация е сигнификантна, но слаба по сила – $r = 0,183$, $p = 0,053$. Аналогична корелация се установява между OPG и Riskfactor3: $r = 0,194$, $p = 0,039$. Не се отчита значима връзка между OPG и ESC от 2019 г. (табл. 19)

Таблица 19. Корелации между OPG и: ST1RE, ESC 2019 г. и RiskFactor3

Група			RiskFaktor3	ESC 2019 г.	ST1RE
Т1Д	OPG (pmol/l)	Pearson Correlation	0,194*	0,095	0,183
		P value	0,039	0,318	0,053
		Брой	113	113	113

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). * . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

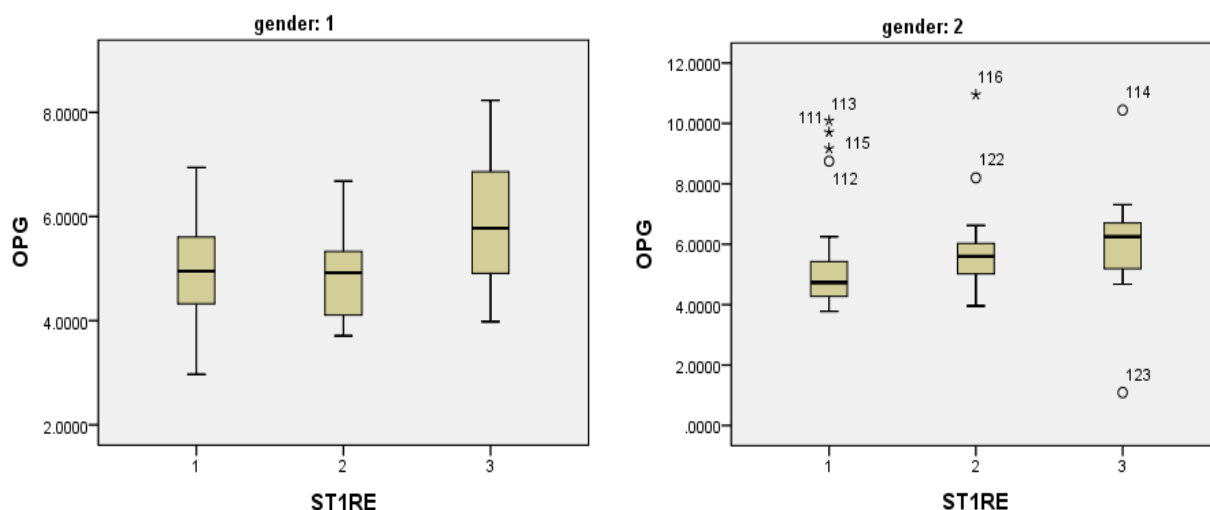
На фигура 15 са представени средни стойности на OPG в зависимост от категорията на ССР, оценен по модела на ST1RE и ESC от 2019 г. при лицата с дългогодишен Т1Д. Приложи се еднофакторен дисперсионен анализ за проверка на статистическа значимост на разликата между средноаритметичните стойности на OPG спрямо ST1RE – дефинирани категории на ССР и t-тест за независими извадки на Стюдънт при ESC от 2019 г. При пациентите с нисък ССР според ST1RE средната стойност на OPG е $5,284 \pm 1,617$ pmol/l; с умерен ССР е $5,332 \pm 1,418$ pmol/l, а с висок ССР – $5,954 \pm 1,514$ pmol/l. Не се отчита сигнификантна междугрупова разлика ($F = 2,322$, $p = 0,103$). Наблюдава се пропорционална тенденция за увеличаване на концентрацията на OPG спрямо категорията на ССР. Средните нива на OPG, които съответстват на лицата с Т1Д в определените от ESC от 2019 г. категории ССР, са: при висок риск – $5,302 \pm 1,534$ pmol/l, а при много висок риск – $5,623 \pm 1,550$ pmol/l, $t = -1,003$, $p = 0,318$. (фиг. 15)



Фигура 15. Средни нива на OPG (pmol/l) спрямо ST1RE и ESC от 2019 г. при лица с Т1Д
ST1RE: 1 – нисък риск; 2 – умерен риск; 3 – висок риск. ESC 2019: 1 – висок риск; 2 – много висок риск

В допълнение се приложи еднофакторен дисперсионен анализ на резултатите за OPG в зависимост от половата принадлежност и тяхното разпределение според критериите на ST1RE. F-тестът показва, че при мъжете може да се отклони нулевата хипотеза H_0 : $F = 5,423$, $p = 0,007$. След приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey), тази разлика се оказва сигнификантна между мъжете с нисък и висок CCR ($4,99 \pm 1,229$ pmol/l спрямо $5,914 \pm 1,218$ pmol/l, $p = 0,041$) и между мъжете с умерен ($4,89 \pm 0,858$ pmol/l) и изследваните с висок CCR ($p = 0,012$). При жените не се отчита сигнификантна разлика ($5,443 \pm 1,799$ pmol/l за нисък CCR; $5,976 \pm 1,826$ pmol/l за умерен CCR и $6,019 \pm 1,943$ pmol/l за висок CCR, $F = 0,627$, $p = 0,538$).

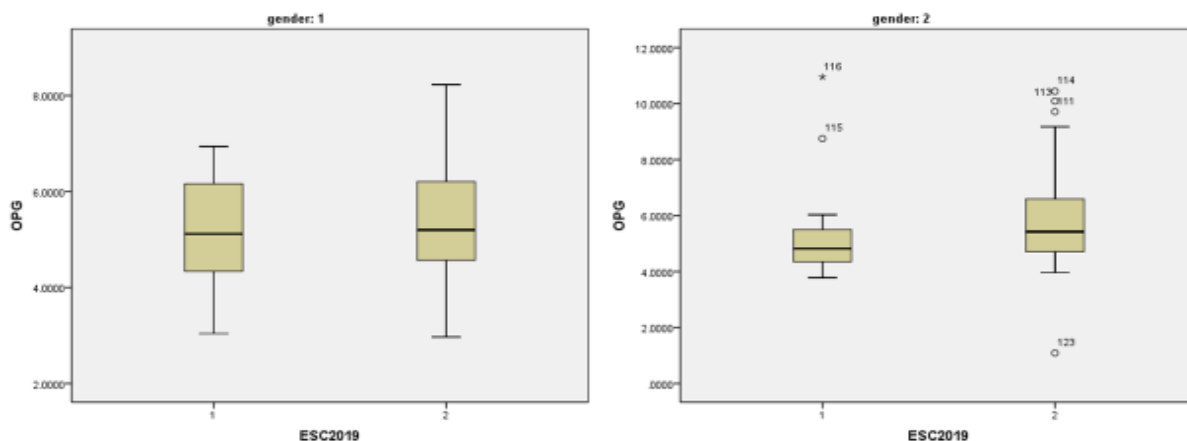
Медианата и интерквартилният обхват на OPG при мъжете с нисък CCR според критериите на ST1RE са $4,95$ ($4,31$ – $5,86$) pmol/l; при мъжете с умерен CCR са $4,92$ ($4,04$ – $5,37$) pmol/l; при мъжете с висок риск са $5,775$ ($4,855$ – $6,87$) pmol/l. Медианите и интерквартилните обхвати на OPG при жени от различните категории CCR според ST1RE са следните: при нисък CCR са $5,73$ ($4,24$ – $5,74$) pmol/l; при умерен CCR са $5,60$ ($4,91$ – $6,325$) pmol/l; при висок CCR са $6,25$ ($5,05$ – $6,78$) pmol/l. (фиг. 16)



Фигура 16. Разпределение на резултатите за OPG при мъже и жени от различни категории на CCR според ST1RE. Gender 1 – мъже, gender 2 – жени

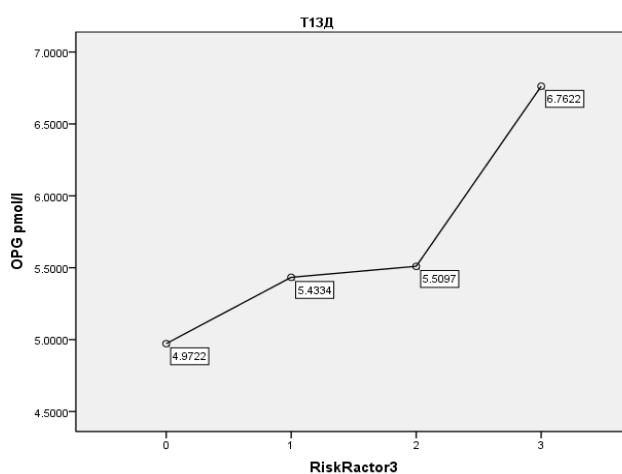
По отношение на дефинираните категории CCR според насоките на ESC от 2019 г., средноаритметични стойности за OPG при мъже и жени са следните: $5,186 \pm 1,144$ pmol/l за мъже с висок CCR и $5,412 \pm 1,231$ pmol/l за мъже с много висок CCR; $5,441 \pm 1,936$ pmol/l за жени с висок CCR и $5,833 \pm 1,806$ pmol/l за жени с много висок CCR. Резултатите от t-тест за независими извадки на Стюдънт демонстрираха невъзможност да се отхвърли нулевата хипотеза H_0 ($t = -0,662$, $p = 0,511$ за мъже и $t = -0,703$, $p = 0,485$ за жени). Медианите и интерквартилните обхвати на OPG при мъжете от различните категории CCR според ESC 2019 г. са: $5,12$ ($4,265$ – $6,215$) pmol/l при мъже с висок риск и $5,20$ ($4,56$ – $6,218$) pmol/l при мъже с

много висок ССР. При жените са следните: 4,82 (4,24–5,60) pmol/l при жени с висок риск и 5,425 (4,708–6,605) pmol/l при жени с много висок ССР. (фиг. 17)



Фигура 17. Разпределение на резултатите за OPG при мъже и жени спрямо ESC от 2019 г. Gender 1 – мъже, 2 – жени

Еднофакторен дисперсионен анализ на резултатите за OPG спрямо RiskFactor3 показва следното разпределение: в група 0 средното ниво на OPG е $4,972 \pm 0,489$ pmol/l; в група 1 то е $5,433 \pm 1,51$ pmol/l; в група 2 е $5,51 \pm 1,69$ pmol/l; в група 3 – $6,76 \pm 1,35$ pmol/l. Отчетените разлики тук са със значимост, близка до сигнификантната ($F = 2,466$, $p = 0,066$). (фиг. 18)

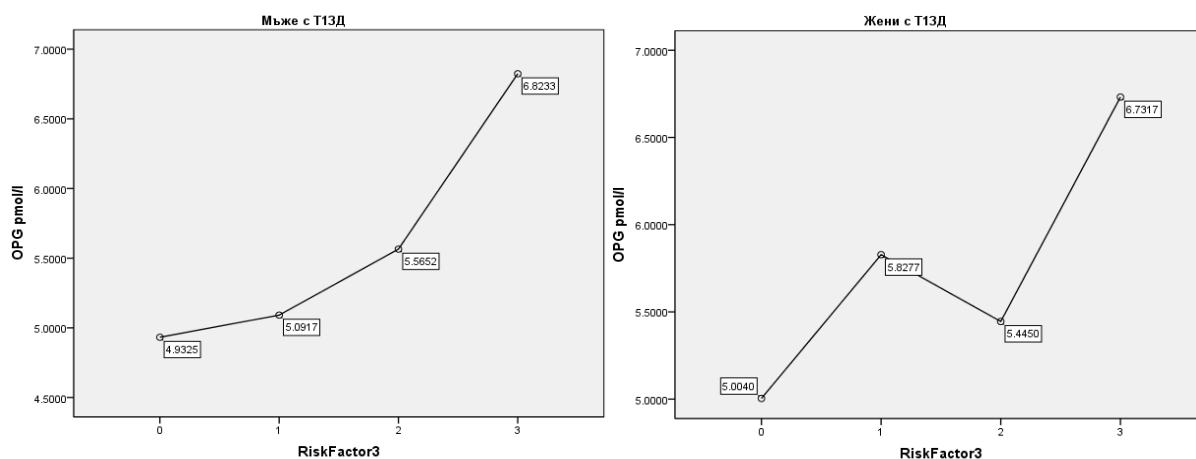


Фигура 18. Средни стойности на OPG за определените групи на RiskFactor3

3.3. OPG – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3

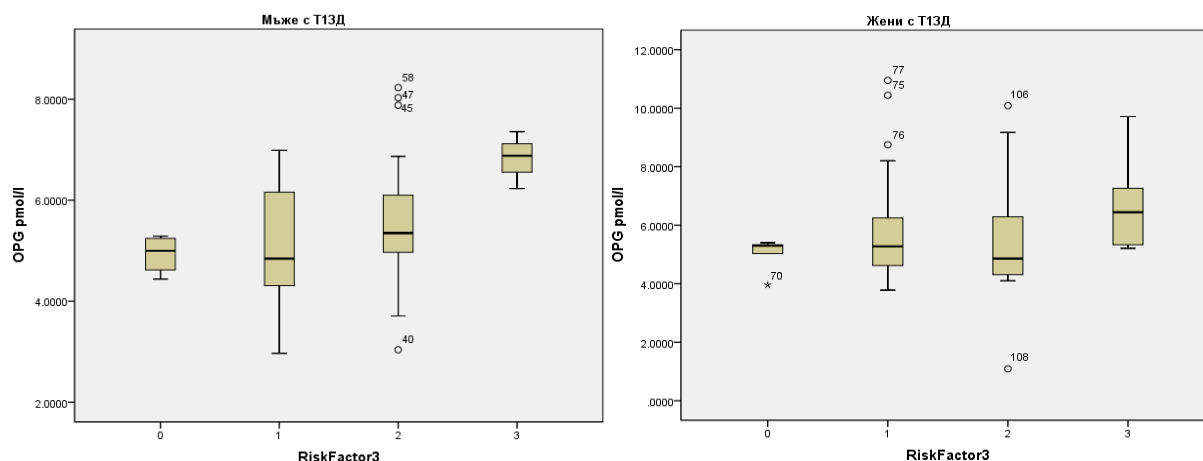
Еднофакторен дисперсионен анализ за проверка на статистическа значимост на разликата между средноаритметичните стойности на OPG при мъже и жени според групите на RiskFactor3 демонстрира значима разлика само в стойностите на мъжете, но при 90% доверителен интервал ($4,93 \pm 0,391$ pmol/l за мъже от група 0; $5,092 \pm 1,05$ pmol/l за група 1; $5,565 \pm 1,392$ pmol/l за група 2 и $6,823 \pm 0,567$ pmol/l за група 3, $F = 2,550$, $p = 0,065$). Отчетените средни нива за OPG при жените са следните: $5,004 \pm 0,600$ pmol/l за група 0; $5,828 \pm 1,855$ pmol/l

за група 1; $5,445 \pm 2,024$ pmol/l за група 2 и $6,732 \pm 1,663$ pmol/l за група 3, $F = 1,031$, $p = 0,387$. (фиг. 19)



Фигура 19. Средни стойности на OPG при мъже и жени с Т1Д спрямо RiskFactor3 (за групи 0, 1, 2 и 3)

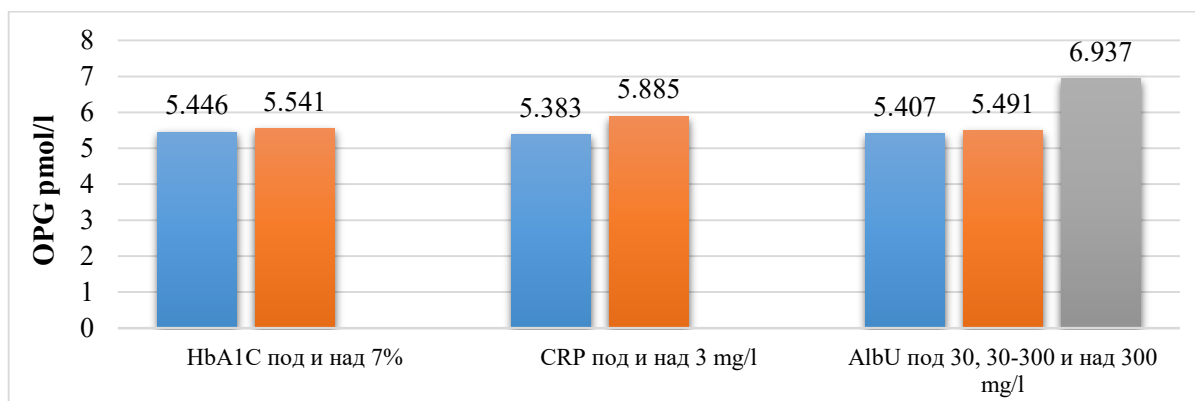
Медианите и интерквартилните обхвати на OPG при мъже от различните групи на RiskFactor3 са: 5,00 (4,53–5,267) pmol/l за група 0; 4,845 (4,275–6,165) pmol/l за група 1; 5,35 (4,76–6,47) pmol/l за група 2; 6,88 (6,23 -*) pmol/l за група 3. Медианите и интерквартилните обхвати на OPG при жените са: 5,30 (4,495–5,365) pmol/l за група 0; 5,275 (4,608–6,343) pmol/l за група 1; 4,86 (4,293–6,358) pmol/l за група 2; 6,44 (5,30–7,873) pmol/l за група 3. (фиг. 20)



Фигура 20. Разпределение на резултатите за OPG при мъже и жени спрямо RiskFactor3

При лицата с дългогодишен Т1Д се съпоставиха средните нива на OPG в зависимост от стойността на AlbU, CRP и HbA1C. На фигура 21 са представени средните стойности на изследваната променлива спрямо HbA1C под и над 7% ($5,446 \pm 1,4691$ pmol/l и $5,541 \pm 1,563$ pmol/l); спрямо CRP под и над 3 mg/l ($5,383 \pm 1,557$ pmol/l и $5,885 \pm 1,499$ pmol/l) и спрямо стойността на AlbU – под 30 mg/l, между 30 и 300 mg/l и над 300 mg/l ($5,407 \pm 1,423$ pmol/l;

5,491 ±1,848 pmol/l и 6,937 ±1,609 pmol/l). Сигнификантна разлика се установи в средните нива на OPG между така съпоставените групи спрямо AlbU, $F = 3,263$, $p = 0,042$. (фиг. 22)



Фигура 21. Средни стойности на OPG в зависимост от HbA1C под и над 7%, CRP под и над 3 mg/l и AlbU под 30 mg/l, между 30 и 300 mg/l и над 300 mg/l mg/l при лица с дългогодишен Т1Д

След приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey) се регистрираха значими разлики в стойностите на OPG между пациенти с AlbU под 30 mg/l и AlbU над 300 mg/l ($MD = 1,53$ pmol/l, $p = 0,032$) и между пациенти с AlbU от 30 до 300 mg/l и AlbU над 300 mg/l ($MD = 1,45$ pmol/l, $p = 0,080$). В контролната група намерените разлики между стойностите на OPG при лица с CRP под и над 3 mg/ml и спрямо AlbU под 30 mg/l и между 30 и 300 mg/l са несигнификантни. При анализа на корелационните зависимости между OPG и изследваните променливи (HbA1C, CRP и AlbU) в групата на Т1Д се установи една значима корелация – между OPG и AlbU ($r = 0,218$, $p = 0,021$). При контролите не се отчетоха сигнификантни зависимости. (табл. 20)

Таблица 20. Корелационни зависимости между променливите OPG, HbA1C, CRP и AlbU

Група			OPG pmol/l	AlbU mg/l	HbA1C%	CRP mg/l
Т1Д	OPG pmol/l	Pearson Correlation	1	0.218*	0.026	0.088
		P value		0.021	0.787	0.354
		Брой	113	113	113	112
Контрол-на група	OPG pmol/l	Pearson Correlation	1	-0.023	-0.062	0.095
		P value		0.867	0.658	0.495
		Брой	54	53	54	54

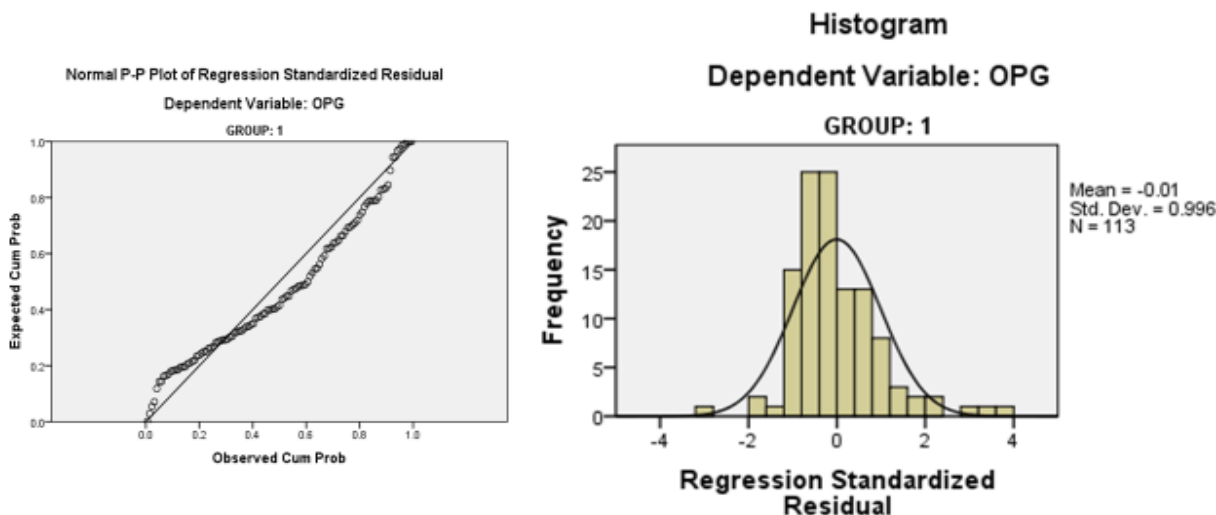
** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). * . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

С цел да се установи линейната комбинация между стойностите на ALbU и OPG беше приложен единичен линеен регресионен анализ. H_0 се отхвърли само при лицата с Т1Д и се направи изводът, че наличната информация за AlbU позволява да се прогнозира концентрацията на OPG. Изпълнени са предпоставките за единичен линеен регресионен

анализ като $F = 5,521$, $p = 0,021$. Регресионната константа $\alpha = 5,383$, $p = 0,000$ и регресионният коефициент $\beta = 0,218$, $p = 0,021$ са също статистически значими. Намереното уравнение за връзката между променливите е:

$$\text{OPG (pmol/l)} = 5,381 + 0,218 \cdot \text{AlbU (mg/l)}$$

Стойността на коригирания коефициент на детерминация ($\text{adjusted } R^2$) е 0,039, което показва, че 4% от измененията в концентрацията на OPG могат да се обяснят от представения регресионен модел, т.е. от стойността на AlbU. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е малка към средна или типична големина на ефекта. За проверка на ключовата предпоставка на регресионния анализ за хомогенност на дисперсията са представени стандартизирани графики за остатъчни членове. Статистическата проверка за нормално разпределение на резултатите, както и визуалната оценка на хистограмата, показва нормално Гаусово разпределение на резултатите за OPG при лицата с Т1Д. Нормално разпределение е необходимо както за зависимата променлива, така и за остатъчния член или грешката от прогнозата (разликата между наблюдаваната и оценената стойност на зависимата променлива). Линейността се отнася към остатъчния член. Хомоскедастичността се отнася до дисперсията за остатъчния член, която трябва да съвпада с дисперсията за прогнозните оценки. От P-P Plot се вижда се, че „дебелата“ линия лежи много близо до „тънкия“ диагонал. (Фиг. 23)



Фигура 22. Графики за нормално разпределение като предпоставка на регресионния анализ: хистограма и P – P Plot

3.4. ROC анализи за извеждане на прагови стойности на OPG при Т1Д

За установяване на прагови стойности на OPG, които отграничават групите с нисък към умерен от висок ССР според различните модели, се приложи ROC анализ. В таблица 22 са представени обобщени резултати от анализа. При ST1RE, AUC- ROC е 0,687, $p = 0,001$, а при

ESC 2019 г. – 0,589, $p = 0,138$. Не се отчита добра прогностична стойност на OPG спрямо RiskFactor3 като AUC е 0,520, $p = 0,734$. (табл. 21)

Таблица 21. ROC анализ за оценка на прогностична стойност на OPG

Модел	Критерий	Area Under the Curve ^c				
		Променлива: OPG				
ST1RE	Висок CCP	AUC	SE	P value	Asymptotic 95% CI	
		0,687	0,052	0,001	Lower Bound	Upper Bound
ESC от 2019 г.	Много висок CCP	0,589	0,060	0,138	0,472	0,706
RiskFactor3	2 рискови фактора	0,520	0,059	0,734	0,404	0,636

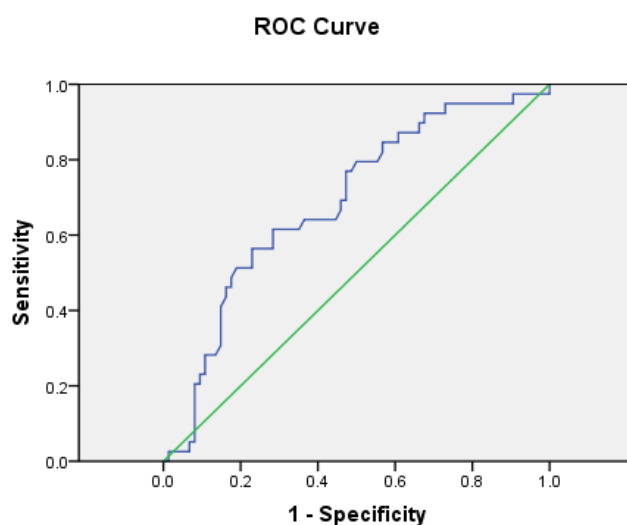
AUC – площ под кривата; SE – standard error; CI – confidence interval

За разграничаване на пациенти с нисък към умерено висок CCP от такива с много висок CCP според ST1RE е изведена cut-off стойност за OPG 5,315 pmol/l, с чувствителност 64,1% и специфичност 63,5%. Определиха се: $LR+ = 1,75$ и $LR- = 0,57$, $DOR = 3,07$, индекс на Youden = 1,006 и ДЕ = 63,7%. На фигура 23 е представена съответната AUC-ROC крива, а в таблица 23, пациентите са разпределени според това дали са ИП, ИО, ФП или ФО според съответната cut-off стойност. (табл. 22)

Таблица 22. Диагностична надеждност за OPG спрямо критериите на ST1RE

Показател	Критерий	cut-off	N	ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС	ДЕ
OPG (pmol/l)	ST1RE - висок CCP	5,315	113	25	47	27	14	64,1%	63,5%	63,7%

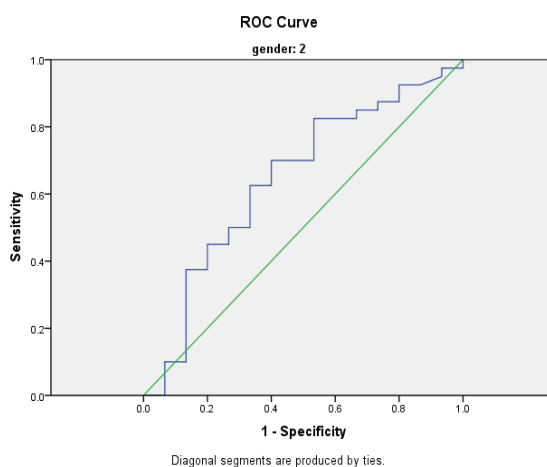
ИП – истински положителни, ИО – истински отрицателни, ФП – фалшиво положителни, ФО – фалшиво отрицателни



Фигура 23. AUC-ROC за оценка прогностична стойност на OPG при Т1Д спрямо ST1RE

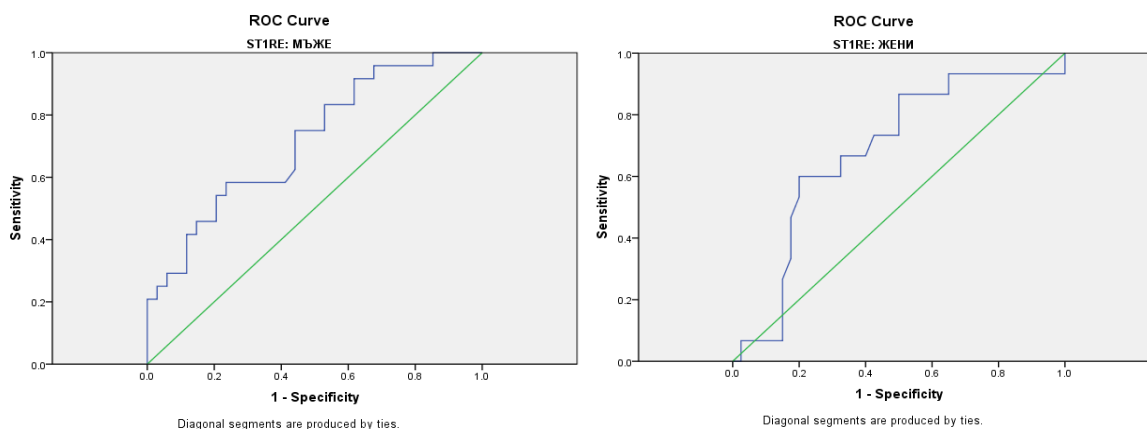
В допълнение се приложи ROC анализ при мъже и жени за отдиференциране групите с нисък към умерен от висок ССР според ST1RE, ESC от 2019 г. и групи 0, 1, 2 от група 3 според RiskFactor3. При ST1RE за мъже AUC е 0,716, $p = 0,005$ и AUC = 0,683, $p = 0,039$ за жени. При ESC 2019 г. – AUC = 0,537, $p = 0,650$ за мъже и AUC = 0,644, $p = 0,102$ за жени. При RiskFactor3 – AUC = 0,565, $p = 0,418$ за мъже и AUC = 0,471, $p = 0,727$ за жени.

Изведена е cut-off стойност на OPG за жени при отдиференциране на висок от много висок ССР според ESC от 2019 г. – 5,025 pmol/l, при чувствителност 70% и специфичност 60%. Определиха се: LR+ = 1.75, LR- = 0.571, DOR = 3,064, индекс на Youden = 1.1 и ДЕ = 67,2%. ROC кривата, която съответства на анализа, е онагледена на фигура 24.



Фигура 24. AUC-ROC крива – жени за оценка на прогностична стойност на OPG спрямо ESC от 2019 г.

Изведени са прагови стойности на OPG за мъже и жени при отдиференциране на лица с много висок ССР според ST1RE: cut-off = 5,075 pmol/l с чувствителност 70,8% и специфичност 55,9% за мъже и cut-off = 5,355 pmol/l за жени с чувствителност 66,7% и специфичност 60%. Определиха се: LR+ = 1.605, LR- = 0,623, DOR = 2,576, индекс на Youden = 1,149 и ДЕ = 62% за мъже и LR+ = 1.668, LR- = 0,599, DOR = 2,784, индекс на Youden = 1,067 и ДЕ = 61,8% за жени. ROC кривите, които съответстват на анализа, са онагледени на фигура 25. В таблица 23 пациентите са разпределени според това дали са ИП, ИО, ФП или ФО според съответните cut-off стойности.



Фигура 25. AUC-ROC крива за оценка на прогностична стойност на OPG при мъже и жени с дългогодишен Т1Д спрямо критериите на ST1RE

Таблица 23. Диагностична надеждност на OPG при отдиференциране на пациенти с нисък към умерено висок ССР от такива с много висок ССР спрямо критериите на ST1RE и ESC от 2019 г.

Показател	Критерий	Cut-off	N	ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС	ДЕ
OPG (pmol/l) Мъже	St1RE – висок ССР	5,075	58	17	19	15	7	70,8%	55,9%	62%
OPG (pmol/l) Жени	St1RE – висок ССР	5,355	55	10	24	16	5	66,7%	60%	61,8%
OPG (pmol/l) Жени	ESC от 2019 г. – много висок ССР	5,025	55	28	9	6	12	70%	60%	67,2%

4. Прогностична стойност на ADNC за оценка на ССР при Т1Д

4.1. ADNC – влияние на пол, възраст и давност на диабета

В таблица 24 са съпоставени средните нива на ADNC, като групите са обособени в зависимост от пола. Установява се, че и при здравите, и при болните изследвани, средноаритметичната стойност на този показател е значимо по-висока при жените: $14,964 \pm 16,998 \mu\text{g/ml}$ за жени спрямо $6,781 \pm 2,415 \mu\text{g/ml}$ за мъже от контролна група ($MD = 8,182 \mu\text{g/ml}$, $t = -2,566$, $p = 0,013$) и $18,394 \pm 12,551 \mu\text{g/ml}$ за жени с Т1Д спрямо $11,237 \pm 5,667 \mu\text{g/ml}$ за мъже с Т1Д ($MD = 7,157 \mu\text{g/ml}$, $t = -3,906$, $p = 0,000$). При така направената съпоставка се установява, че средните стойностите на ADNC и при мъже и при жени с Т1Д са по-високи от тези на контролите. (табл. 24)

Таблица 24. Средни стойности на ADNC в зависимост от пола

Група участници		Пол	N	mean	SD	t	P value	MD
Контролна група пациенти	ADNC (µg/ml)	Мъже	29	6,7814	2,41481	-2,566	0,013	-8,18222
		Жени	25	14,9636	16,99800			
Пациенти с Т1Д	ADNC (µg/ml)	Мъже	57	11,2365	5,66648	-3,906	0,000	-7,15703
		Жени	54	18,3935	12,55128			

N – брой; *mean* – средна стойност; *SD* – стандартно отклонение

С оглед на отчетените значими междуполови различия между средноаритметичните стойности на ADNC в двете изследвани групи, последващите статистически анализи бяха приложени паралелно за мъже и жени.

Мъжете с по-голяма продължителност на заболяването имат по-високи нива на показателя ($12,327 \pm 5,662 \mu\text{g/ml}$) спрямо изследваните с давност под 24 години – $9,625 \pm 5,394 \mu\text{g/ml}$. Отчетената разлика тук е $2,702 \mu\text{g/ml}$, $t = 1,801$, $p = 0,077$. При жените, не се регистрира статистически значимо различие ($18,313 \mu\text{g/ml}$ при давност над 24 г. спрямо $18,511 \mu\text{g/ml}$ при давност под 24 г., $MD = 0,198 \mu\text{g/ml}$, $t = -0,056$, $p = 0,960$).

С помощта на корелационния коефициент на Пирсън беше измерена оценката на линейната връзка между давността на диабета и серумната концентрация на ADNC. Отчете се умерено положителна корелация между двете променливи при мъжете, $r = 0,273$, $p = 0,040$. При жените изследваната връзка е несигнификантна: $r = 0,042$, $p = 0,761$. Не се отчете значима корелационна зависимост между възрастта и средните нива на ADNC при изследваните лица от контролната група и тази на Т1Д. В клиничната група се установи сигнификантна корелационна връзка между ИТМ и серумните нива на Lер при мъжете и тя е с обратна посока и голяма по сила: $r = -0,466$, $p = 0,000$. При жените с Т1Д отчетената значимост отново е отрицателна, но при 90% достоверност на резултатите: $r = -0,241$, $p = 0,080$. (табл. 25)

В групата на контролите мъже се регистрира положителна линейна корелация между ADNC и ADMA и тя е средна по сила ($r = 0,430$, $p = 0,020$). При контролите жени намерената зависимост е незначима: $r = 0,127$, $p = 0,545$. В групата на Т1Д, ADNC не корелира значимо с ADMA ($r = 0,066$, $p = 0,625$ за мъже и $r = 0,147$, $p = 0,289$ за жени). Не се установиха значими корелационни връзки между серумните нива на ADMA и OPG и при двете изследвани групи. (табл. 25)

Таблица 25. Корелационни зависимости между ADNC и: възраст, давност на диабета, ADMA и OPG

Пол	Група			Възраст (години)	Давност на диабета (години)	ИТМ (kg/m ²)	ADMA (μmol/l)	OPG (pmol/l)
Мъже	Т1Д	ADNC (μg/ml)	Pearson Correlation	0.032	0.273*	-0.466**	0.066	0.173
			P value	0.815	0.040	0.000	0.625	0.199
			Брой	57	57	57	57	57
	Контроли	ADNC (μg/ml)	Pearson Correlation	-0.067	.	0.006	0.430*	0.095
			P value	0.730	.	0.977	0.020	0.625
			Брой	29		29	29	29
Жени	Т1Д	ADNC (μg/ml)	Pearson Correlation	0.098	0.042	-0.241	0.147	-0.198
			P value	0.482	0.761	0.080	0.289	0.151
			Брой	54	54	54	54	54
	Контроли	ADNC (μg/ml)	Pearson Correlation	-0.220	.	-0.193	0.127	-0.106
			P value	0.291	.	0.355	0.545	0.616
			Брой	25		25	25	25
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).								
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)								

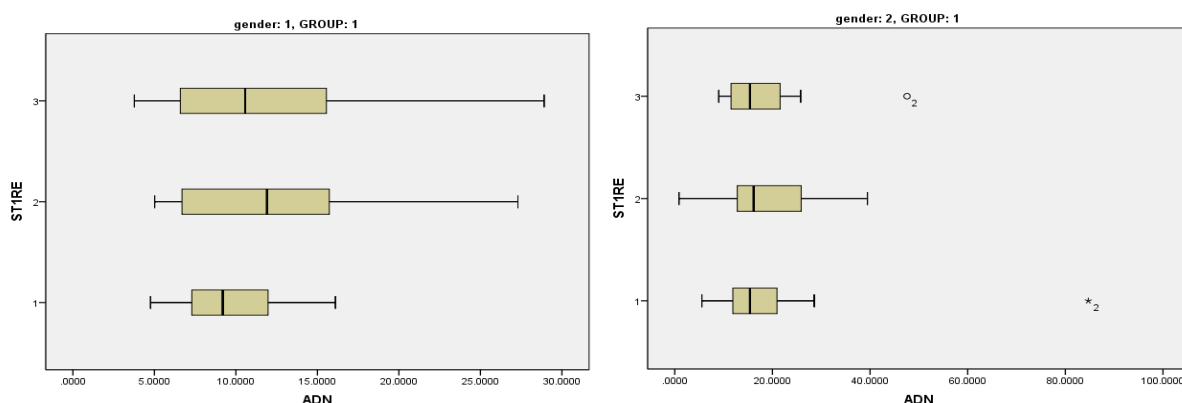
4.2. ADNC – връзки със ST1RE, ESC от 2019 г. и Riskfactor3

С цел да се изследва връзката между стойността на ADNC и категорията на ССР според ST1RE, ESC от 2019 г. и предложения модел RiskFactor3 беше използван коефициентът на рангова корелация Спирмън ро. (табл. 26) Последният за нивото на ADNC и RiskFactor3 е: $\rho = -0,23$, $p = 0,015$. Стойността на коефициента на детерминация r^2 показва, че приблизително 5% от дисперсията в концентрациите на ADNC при лица с Т1Д се асоциират с дисперсията на RiskFactor3, т.е. с броя на РФ, дефинирани като групи 0, 1, 2 и 3. Тук е важно да се акцентира върху знака на корелацията. Последният е отрицателен и се запазва такъв при отчетените зависимости между ADNC и: ESC от 2019 г. и ST1RE, но не е статистически значим. Това означава, че колкото по-висок е ССР според утвърдените скали, толкова по-ниска е стойността на ADNC при лицата с дългогодишен Т1Д.

Таблица 26. Корелационни зависимости на ADNC със ST1RE, ESC от 2019 г. и предложения модел RiskFactor3

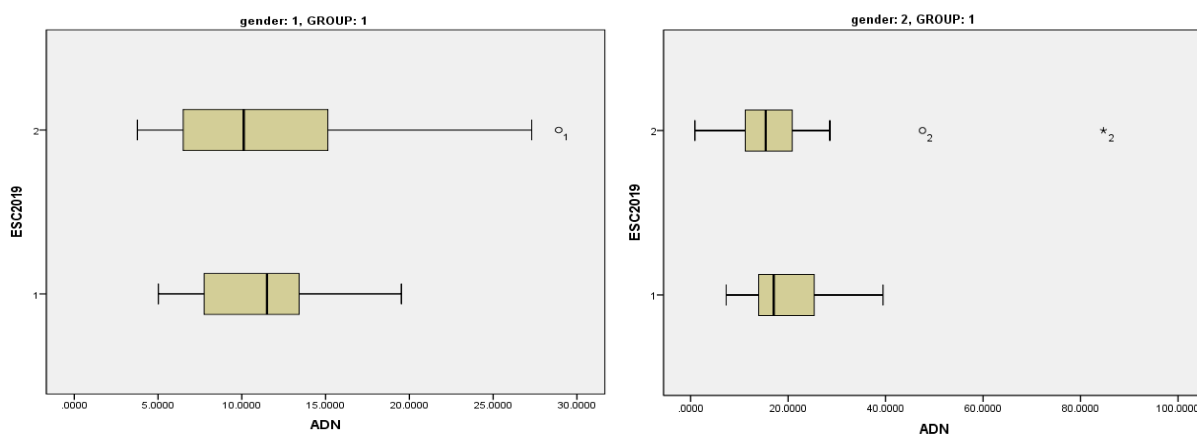
			ADNC (μg/ml)	RiskFaktor3	ESC от 2019 г.	ST1RE
Spearman's rho	ADNC (μg/ml)	Correlation Coefficient	1.000	-0.231*	-0.074	-0.028
		P value	.	0.015	0.443	0.768
		Брой	111	111	111	111
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). **. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)						

Приложи се еднофакторен дисперсионен анализ на резултатите за ADNC спрямо дефинираните групи при STIRE. Липсва статистически значимо различие в средноаритметичните нива на ADNC: $9,63 \pm 3,21 \mu\text{g/ml}$ при нисък ССР, $12,17 \pm 6,38 \mu\text{g/ml}$ при умерен ССР и $11,534 \pm 6,27 \mu\text{g/ml}$ при висок ССР, $F = 0,878$, $p = 0,422$ за мъже и $18,208 \pm 14,885 \mu\text{g/ml}$ при нисък ССР, $19,232 \pm 10,795 \mu\text{g/ml}$ при умерен ССР и $17,989 \pm 9,997 \mu\text{g/ml}$ при висок ССР, $F = 0,038$, $p = 0,963$ за жени. Медианите и интерквartilните обхвати на ADNC при мъжете с нисък ССР са $9,19$ ($7,19$ – $12,24$) $\mu\text{g/ml}$; при мъжете с умерен ССР са $11,905$ ($6,528$ – $16,488$) $\mu\text{g/ml}$; при мъжете с висок риск са $10,57$ ($6,45$ – $15,555$) $\mu\text{g/ml}$. Медианите и интерквartilните обхвати на ADNC при жените са: при нисък ССР са $15,39$ ($11,433$ – $21,168$) $\mu\text{g/ml}$; при умерен ССР са $16,15$ ($11,895$ – $26,54$) $\mu\text{g/ml}$; при висок ССР са $15,39$ ($11,44$ – $22,29$) $\mu\text{g/ml}$. (Фиг. 26)



Фигура 26. Разпределение на резултатите за ADNC при мъже и жени от различни категории на ССР според STIRE. Gender 1 – мъже, 2 – жени; 1 – нисък; 2 – умерен, 3 – много висок ССР

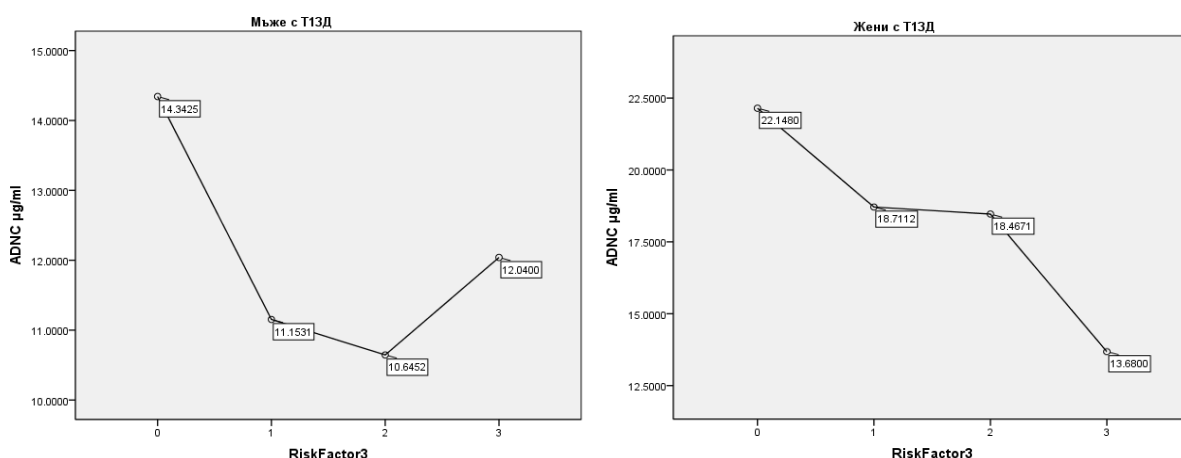
При ESC от 2019 г., след приложение на t-тест за независими извадки на Стюдънт, се установи близко до статистически значимо различие в средните нива на ADNC при мъжете: $10,913 \pm 3,972 \mu\text{g/ml}$ при висок ССР и $11,386 \pm 6,339 \mu\text{g/ml}$ при много висок ССР, $MD = -0,4723 \mu\text{g/ml}$, $t = -0,290$, $p = 0,065$. При жените – $20,006 \pm 9,099 \mu\text{g/ml}$ с висок ССР и $17,773 \mu\text{g/ml}$ с много висок ССР, $MD = 2,233 \mu\text{g/ml}$, $t = 0,582$, $p = 0,563$. Медианите и интерквartilните обхвати са: $11,50$ ($7,665$ – $13,44$) $\mu\text{g/ml}$ при мъже с висок риск и $10,11$ ($6,31$ – $15,56$) $\mu\text{g/ml}$ при мъже с много висок риск, а при жените: $17,05$ ($13,94$ – $25,46$) $\mu\text{g/ml}$ при висок риск и $15,39$ ($10,98$ – $20,85$) $\mu\text{g/ml}$ при много висок ССР. (фиг. 27)



Фигура 27. Разпределение на резултатите за ADNC при мъже и жени от различни категории на CCP според ESC от 2019 г. (Gender 1 – мъже, 2 – жени; 1 – висок, 2 – много висок CCP)

4.3. ADNC – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3

Еднофакторен дисперсионен анализ за проверка на статистическа значимост на разликата между средноаритметичните стойности на ADNC при мъже и жени според RiskFactor3 демонстрира тенденция за намаляване, но без значима разлика ($F = 0,485$, $p = 0,694$ при мъже и $F = 0,423$, $p = 0,738$ при жени). Средните нива на ADNC при мъжете са: $14,343 \pm 6,423 \mu\text{g/ml}$ за група 0; $11,153 \pm 4,937 \mu\text{g/ml}$ за група 1; $10,645 \pm 6,623 \mu\text{g/ml}$ за група 2; $12,04 \pm 5,773 \mu\text{g/ml}$ за група 3. При визуална оценка на графиката от фигура 6 прави впечатление, че съответстващата концентрация на ADNC за група 3 рязко се отклонява от установената пропорционална тенденция за намаляване в нивата на маркера. (фиг. 28)

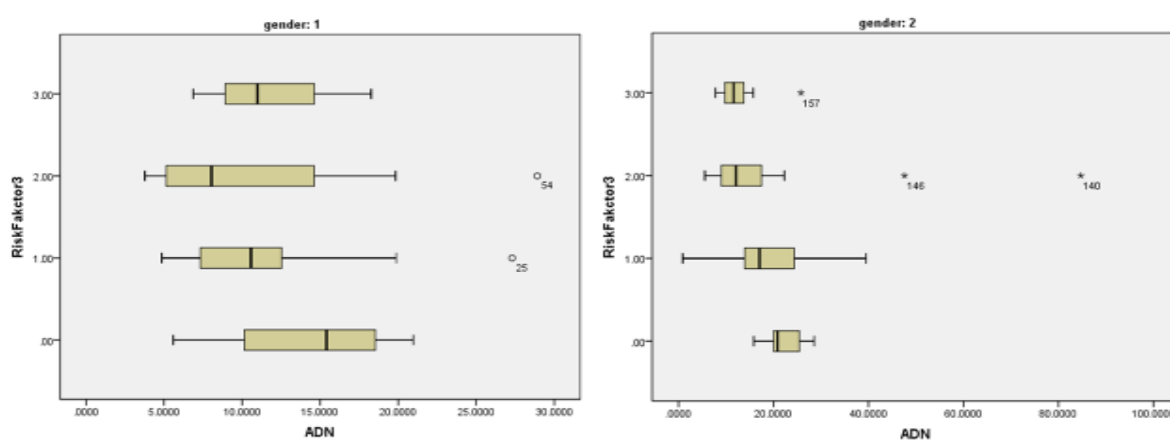


Фигура 28. Средни стойности на ADNC при мъже и жени според RiskFactor3
На ординатната ос са маркирани средни стойности на ADNC, а на абсцисата – групи (0,1,2,3,4) според RiskFactor3

Средните нива на ADNC при жени от различните категории според RiskFactor3 са следните: $22,148 \pm 4,951 \mu\text{g/ml}$ за група 0; $18,711 \pm 8,136 \mu\text{g/ml}$ за група 1; $18,467 \pm 19,653 \mu\text{g/ml}$ за група 2; $13,68 \pm 6,5 \mu\text{g/ml}$ за група 3. След приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey),

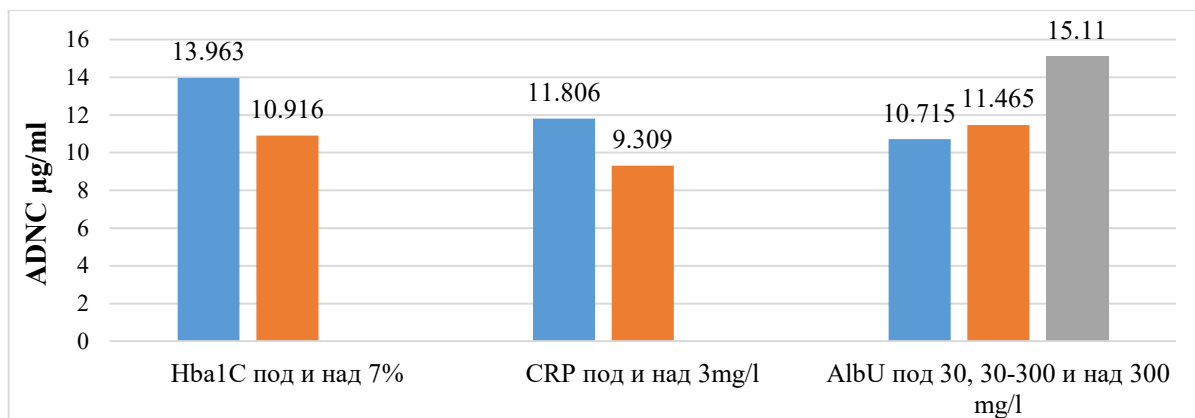
не се установи сигнификантна междугрупова разлика. При жените, за разлика от мъжете, наблюдаваната пропорционална тенденция за намаляване в концентрациите на ADNC е по-категорична. (фиг. 28)

Медианите и интерквартилните обхвати на ADNC при мъжете от различните категории според RiskFactor3 са: 15,405 (7,87–19,75) $\mu\text{g/ml}$ за група 0; 10,57 (7,295–12,59) $\mu\text{g/ml}$ за група 1; 8,04 (5,07–15,172) $\mu\text{g/ml}$ за група 2; 10,98 (6,87 - *) $\mu\text{g/ml}$ за група 3. Медианите и интерквартилните обхвати на ADNC при жени от различните категории според RiskFactor3 са: 20,85 (17,935–27,01) $\mu\text{g/ml}$ за група 0; 17,05 (13,705–24,795) $\mu\text{g/ml}$ за група 1; 12,13 (8,735–19,155) $\mu\text{g/ml}$ за група 2; 11,60 (9,46–15,74) $\mu\text{g/ml}$ за група 3. (фиг. 29)



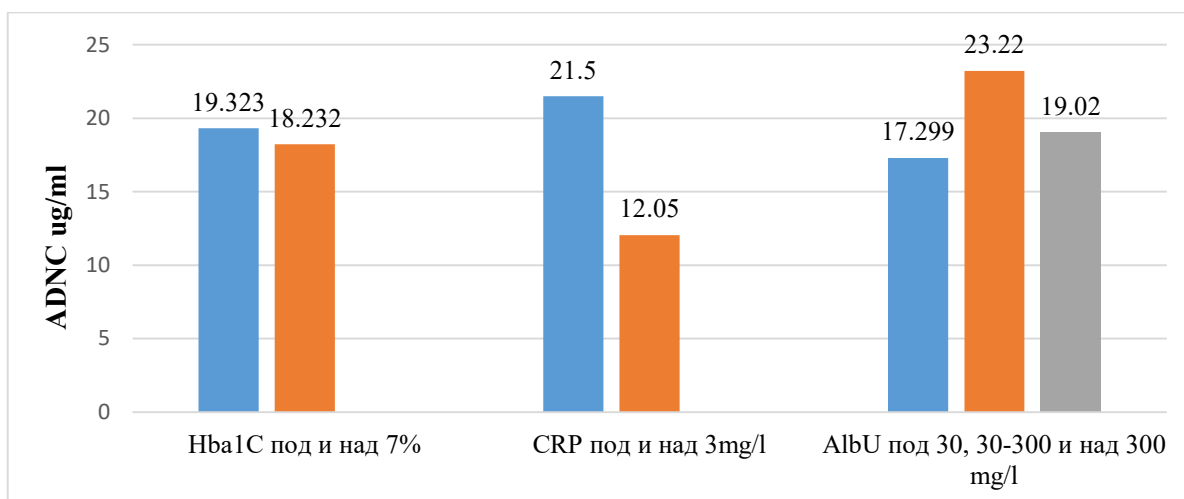
Фигура 29. Разпределение на резултатите за ADNC при мъже и жени от различни групи на предложения модел RiskFactor3. Gender 1 – мъже, 2 – жени

На фигура 30 са представени средни стойности на ADNC за мъже с Т1Д в зависимост от HbA1C под и над 7%, CRP под и над 3 mg/l и AlbU под 30, между 30 и 300 и над 300 mg/l. Според резултатите от t-теста за независими извадки на Стюдънт не се установяват статистически значими различия. При мъже с Т1Д и HbA1C под и над 7% средната концентрация на ADNC е съответно $13,963 \pm 5,226 \mu\text{g/ml}$ и $10,916 \pm 5,677 \mu\text{g/ml}$ (MD = 3,048 $\mu\text{g/ml}$, $t = -1,252$, $p = 0,216$), а спрямо CRP под и над 3 mg/l – $11,806 \pm 5,775 \mu\text{g/ml}$ и $9,309 \pm 5,012 \mu\text{g/ml}$ (MD = 2,497 $\mu\text{g/ml}$, $t = -1,408$, $p = 0,165$). По отношение стойността на AlbU средните нива на ADNC при мъжете с Т1Д са: $10,715 \pm 5,235 \mu\text{g/ml}$ при AlbU под 30 mg/l; $11,465 \pm 5,318 \mu\text{g/ml}$ при AlbU между 30 и 300 mg/l и $15,11 \pm 9,496 \mu\text{g/ml}$ при AlbU над 300 mg/l ($F = 1,343$, $p = 0,270$). (фиг. 30)



Фигура 30. Средни нива на ADNC ($\mu\text{g/ml}$) при HbA1C под и над 7%, CRP под и над 3 mg/l и AlbU под 30 mg/l, от 30 до 300 mg/l и над 300 mg/l при мъже с T1D

На фигура 31 са представени средните стойности на ADNC при жени с T1D в зависимост от HbA1C под и над 7%, CRP под и над 3 mg/l и AlbU под 30, между 30 и 300 и над 300 mg/l. Според резултатите от t-теста за независими извадки на Стюдънт не се отчитат статистически значими различия между жените с HbA1C под и над 7% ($19,323 \pm 5,456 \mu\text{g/ml}$ спрямо $18,232 \pm 13,444 \mu\text{g/ml}$, MD = 1,09 $\mu\text{g/ml}$, $t = -0,225$, $p = 0,823$). Значима разлика в стойностите на ADNC се отчита при жените спрямо CRP под и над 3 mg/l ($21,500 \pm 14,012 \mu\text{g/ml}$ и $12,054 \pm 5,184 \mu\text{g/ml}$) и тя е MD = 9,447, $t = -2,683$, $p = 0,01$. По отношение на AlbU, еднофакторен дисперсионен анализ с последващо приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey), не установиха статистически значими различия в концентрациите на ADNC при жените с AlbU под 30 mg/l, между 30 и 300 mg/l и над 300 mg/l ($17,299 \pm 8,016 \mu\text{g/ml}$, $23,223 \pm 23,247 \mu\text{g/ml}$ и $19,015 \pm 4,632 \mu\text{g/ml}$, $F = 0,955$, $p = 0,392$). (фиг. 31)



Фигура 31. Средни нива на ADNC ($\mu\text{g/ml}$) при HbA1C под и над 7%, CRP под и над 3 mg/l и AlbU под 30 mg/l, от 30 до 300 mg/l и над 300 mg/l при жени с T1D

За контролната група t-тестът за независими извадки на Стюдънт показва несигнификантно различие в стойностите на ADNC при лица с CRP под и над 3 mg/ml ($6,693$

$\pm 2,642 \mu\text{g/ml}$ спрямо $7,06 \pm 1,633 \mu\text{g/ml}$, $MD = 0,367 \mu\text{g/ml}$, $t = 0,345$, $p = 0,733$ при мъже и $15,973 \pm 18,772 \mu\text{g/ml}$ спрямо $10,928 \pm 5,849 \mu\text{g/ml}$, $MD = 5,045 \mu\text{g/ml}$, $t = -0,585$, $p = 0,564$ при жени). При еднофакторен дисперсионен анализ се установи сигнификантна разлика в стойностите на ADNC при жени с AlbU под $30 \mu\text{g/ml}$ и $30\text{--}300 \mu\text{g/ml}$ ($12,287 \pm 3,767 \mu\text{g/ml}$ спрямо $36,91 \pm 49,81 \mu\text{g/ml}$, $F = 6,674$, $p = 0,017$). При мъжете подобно различие не се отчита ($6,907 \pm 2,444 \mu\text{g/ml}$ спрямо $5,99 (N=1) \mu\text{g/ml}$, $F = 0,955$, $p = 0,392$). Случаи с AlbU над 300 mg/ml и HbA1C над 7% в контролната група не се регистрират.

За да се изследва асоциацията между променливите ADNC, CRP, HbA1C и AlbU е използван коефициентът на Пирсън. При жените с дългогодишен Т1Д се установява близка до сигнификантна отрицателна корелация между ADNC и CRP ($r = -0,224$, $p = 0,107$). В групата на контролите се регистрира само една сигнификантна корелация и тя е между ADNC и AlbU при жените с права посока и много голяма по сила: $r = 0,777$, $p = 0,000$. (табл. 27)

Таблица 27. Корелации между променливите ADNC, AlbU, CRP и HbA1C

Група				AlbU mg/l	CRP mg/l	HbA1C%
Т1Д	Мъже	ADNC $\mu\text{g/ml}$	Pearson Correlation	0,159	0,181	0,104
			P value	0,237	0,177	0,444
			Брой	57	57	57
	Жени	ADNC $\mu\text{g/ml}$	Pearson Correlation	-0,005	-0,224	-0,178
			P value	0,972	0,107	0,197
			Брой	54	53	54
Контролна група	Мъже	ADNC $\mu\text{g/ml}$	Pearson Correlation	-0,078	0,024	-0,079
			P value	0,689	0,901	0,683
			Брой	29	29	29
	Жени	ADNC $\mu\text{g/ml}$	Pearson Correlation	0,777	-0,181	-0,011
			P value	0,000	0,387	0,958
			Брой	24	25	25

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). **. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

С цел да се установи линейната комбинация между стойностите на AlbU и ADNC, беше приложен единичен линеен регресионен анализ. Нулевата хипотеза H_0 , че няма линейна зависимост между променливите, предварително се тества на базата на еднофакторния дисперсионен анализ. Регистрира се статистическа значимост, но само в групата на контролите жени ($F = 6,674$, $p = 0,017$). При лицата с дългогодишен Т1Д губи силата и значимостта си.

Следователно H_0 се отхвърли само за контролите. Наблюдава се статистически значима зависимост при физиологични условия между двете изследвани променливи и наличната информация за AlbU позволи да се прогнозира стойността на ADNC, $F = 33,603$, $p = 0,015$. Регресионната константа $\alpha = 7,068$, $p = 0,000$ и регресионният коефициент $\beta = 0,477$, $p = 0,000$ са също статистически значими. Намереното уравнение за връзката между променливите е:

$$\text{ADNC } (\mu\text{g/ml}) = 7,068 + 0,477 \cdot \text{AlbU } (\text{mg/l})$$

Стойността на коригирания коефициент на детерминация (adjusted R²) е 0,586, което показва, че 58,6% от измененията в концентрацията на ADNC при физиологични условия могат да се обяснят от представения регресионен модел, т.е. от стойността на AlbU. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е много по-голяма от типичната големина на ефекта. Необходимо е да се направи допълнителен анализ на тези установени пропорционални зависимости между променливите в организма на фона на Т1Д.

4.4. ROC анализи за извеждане на прагови стойности на ADNC спрямо категорията на ССР при лица с дългогодишен Т1Д

За установяване на прагови стойности на OPG, които отдиференцират групите с умерен и висок от много висок ССР според различните модели се приложи ROC анализ.

В таблица 4 са представени обобщените резултати от анализа. Не се установява добра прогностична стойност на OPG спрямо утвърдените скали за оценка на ССР при Т1Д: при ST1RE, AUC е 0,559, p = 0,476 за мъже и AUC = 0,578, p = 0,401 за жени. Спрямо ESC от 2019 г., AUC е 0,466, p = 0,680 за мъже и AUC = 0,378, p = 0,167 за жени. Не се отчита добра прогностична стойност на OPG и спрямо RiskFactor3: AUC е 0,408, p = 0,256 за мъже и AUC = 0,341, p = 0,063 за жени. (табл. 28)

Таблица 28. ROC анализи за извеждане на прагова стойност на ADNC при мъже и жени

Модел	Критерий	Area Under the Curve ^c				
		Променлива: ADNC			Asymptotic 95% CI	
		AUC	SE	P value	Lower Bound	Upper Bound
RiskFactor3 Мъже	Наличие на ≥ 2 рискови фактора	0,408	0,089	0,256	0,235	0,582
RiskFactor3 Жени	Наличие на ≥ 2 рискови фактора	0,341	0,087	0,063	0,171	0,511
ST1RE Мъже	Висок ССР	0,559	0,087	0,476	0,389	0,729
ST1RE Жени	Висок ССР	0,578	0,098	0,401	0,385	0,771
ESC 2019 г. Мъже	Много висок ССР	0,466	0,077	0,680	0,315	0,617
ESC 2019 г. Жени	Много висок ССР	0,378	0,085	0,167	0,211	0,545

AUC – площ под кривата; SE – standard error; CI – confidence interval

В обобщение, ROC анализът демонстрира, че ADNC като самостоятелен биомаркер няма достатъчно добра диагностична надеждност в отдиференциране на пациенти с нисък към

умерено висок от много висок ССР съгласно критериите на ST1RE и ESC от 2019 г. С оглед на тази незадоволителна надеждност на маркера не са изведени cut-off стойности.

5. Прогностична стойност на Lер за оценка на ССР при лица с дългогодишен Т1Д

5.1. Lер – влияние на пол, възраст, давност на диабета и ИТМ

В таблица 29 са представени средноаритметични стойности на Lер за мъже и жени от контролна група и тази на лицата с Т1Д. След приложение на t-тест за независими извадки на Стюдънт се установиха значими междуполови различия и в двете изследвани групи: MD = 3,109, t = -3,540, p = 0,001 при контроли и MD = -5,349, t = -5,458, p = 0,000 при пациенти с Т1Д. Средните нива при контролната група за Lер са съответно: 3,0815 ±1,998 ng/ml за мъже и 6,1908 ±4,045 ng/ml за жени. При пациентите с Т1Д, стойностите за Lер при мъжете са 2,863 ±2,948 ng/ml, а при жените са 8,211 ±6,679 ng/ml.

Таблица 29. Средни стойности на Lер в зависимост от пола

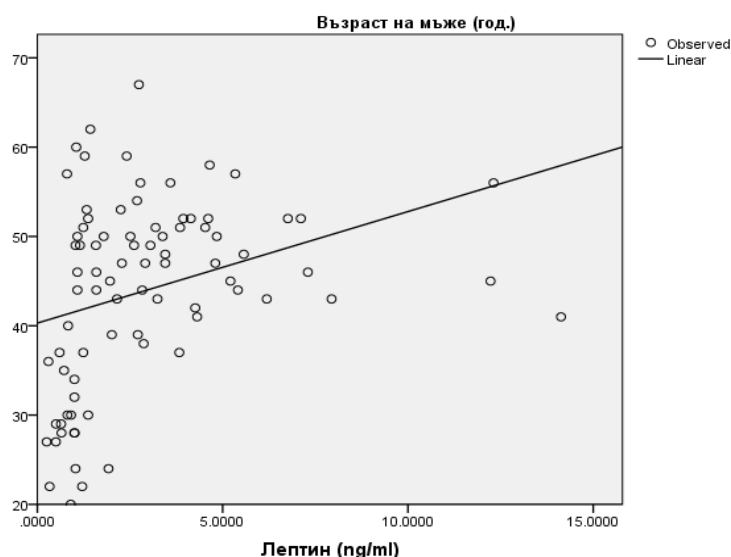
Група участници		Пол	N	mean	SD	t	P value	MD
Контролна група пациенти	Лептин (ng/ml)	Мъже	27	3,0815	1,99841	-3,540	0,001	-3,10935
		Жени	24	6,1908	4,04543			
Пациенти с Т1Д	Лептин (ng/ml)	Мъже	56	2,8625	2,94780	-5,458	0,000	-5,34863
		Жени	52	8,2111	6,67952			

N – брой; *mean* – средна стойност; *SD* – стандартно отклонение

С оглед на отчетените значими междуполови различия в средноаритметичните стойности на Lер в двете изследвани групи, последващите статистически анализи бяха приложени паралелно за мъже и жени.

Статистически значимо различие се установи в средните нива на Lер при мъже и жени, съпоставени спрямо медианата на давността на ЗД (24 г.). При мъжете с давност на ЗД над 24 г. се отчитат по-високи стойности за Lер спрямо изследваните с давност под 24 г. (3,4685 ±3,443 ng/ml спрямо 1,926 ±1,618 ng/ml, MD = 1,54 ng/ml, t = 1,961, p = 0,048). Интересно е да се отбележи, че при жените по-високите стойности за Lер се регистрират при давност на ЗД под 24 години (9,976 ±8,799 ng/ml) спрямо изследваните с давност над 24 години (7,0525 ±4,625 ng/ml, MD = 2,924, t = -1,581, p = 0,050).

В таблица 30 са представени резултати от приложен анализ за изследване на връзките между стойността на Lер, давността на диабета, възрастта на пациентите, ИТМ и концентрацията на ADNC. Корелационна зависимост, която се отчита в двете изследвани групи, е между възрастта на мъжете и концентрацията на Lер. (фиг. 32)



Фигура 32. Корелационна зависимост между концентрацията на Лер и възрастта на изследваните мъже

В двете изследвани групи се установиха сигнификантни корелационни връзки между ИТМ и серумните нива на Лер и те са с права посока и големи по сила: $r = 0,667$, $p = 0,000$ за мъже с Т1Д и $r = 0,635$, $p = 0,000$ за жени с Т1Д; $r = 0,806$, $p = 0,000$ за контроли мъже и $r = 0,762$, $p = 0,000$ за контроли жени. (табл. 30)

Таблица 30. Корелационни зависимости между стойността на Лер, давността на диабета, възрастта на пациентите и концентрацията на ADNC

Група				Възраст год.	Давност год.	ИТМ (кг/м ²)	ADNC µg/ml
Т1Д	Мъже	Lep ng/ml	Pearson Correlation	0.284*	0.196	0.667**	-0.185
			P value	0.034	0.147	0.000	0.171
			Брой	56	56	56	56
	Жени	Lep ng/ml	Pearson Correlation	-0.024	-0.194	0.635**	-0.198
			P value	0.863	0.168	0.000	0.159
			Брой	52	52	52	52
Контролна група	Мъже	Lep ng/ml	Pearson Correlation	0.425*	*	0.806	-0.067
			P value	0.027		0.000	0.740
			Брой	27		27	27
	Жени	Lep ng/ml	Pearson Correlation	-0.008	*	0.762	-0.052
			P value	0.971		0.000	0.810
			Брой	24		24	24

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

С помощта на корелационния коефициент на Пирсън беше оценена и линейната връзка между Лер, ADMA и OPG. При изследваните от контролната група не се отчетоха сигнификантни корелационни зависимости между посочените променливи. В групата на Т1Д се установи значима корелация с права посока между Лер и OPG ($r = 0,296$, $p = 0,027$) при мъжете. При жените не се отчитат значими резултати.

5.2. Лер – връзки със ST1RE, ESC от 2019 г. RiskFactor3

С цел да се изследва връзката между концентрацията на Лер и категорията на ССР, дефинирана според ST1RE, ESC от 2019 г., и предложения модел RiskFactor3 беше използван коефициентът на рангова корелация Спирмън ро. (табл. 31)

Таблица 31. Корелационни зависимости на Лер със ST1RE, ESC 2019 г. и предложения модел RiskFactor3

			Lep (ng/ml)	RiskFakctor3	ESC от 2019 г.	ST1RE
Сpearman's rho Мъже с Т1Д	Lep (ng/ml)	Correlation Coefficient	1.000	0.233	0.361**	0,549**
		P value	.	0.084	0,006	0.000
		Брой	56	56	56	56
Сpearman's rho Жени с Т1Д		Correlation Coefficient	1	0,437**	0,200	0,070
		P value	.	0,001	0,151	0,617
		Брой	53	53	53	53
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)						

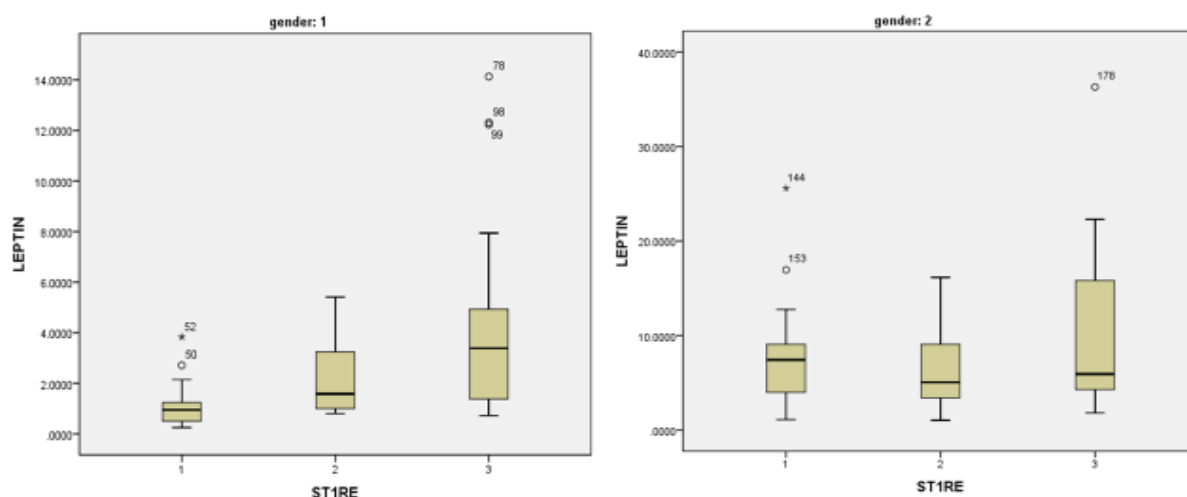
Стойността на рангова корелация Спирмън ро между така изследваните променливи при мъжете е: $rho = 0,23$, $p = 0,084$ между Лер и RiskFactor3; $rho = 0,361$, $p = 0,006$ между Лер и ESC 2019 г. и $rho = 0,549$, $p = 0,000$ между Лер и ST1RE. Прави впечатление, че и трите установени зависимости са сигнификантни. Знакът на корелациите е положителен, а големината на ефекта е най-голяма при ST1RE. При ESC от 2019 г. големината на ефекта е средна или типична, а при RiskFactor3 – малка. (Cohen, 1988). Стойността на рангова корелация Спирмън ро между така изследваните променливи при жените е: $rho = 0,437$, $p = 0,001$ за Лер и RiskFactor3; $rho = 0,20$, $p = 0,151$ за Лер и ESC2019 и $rho = 0,070$, $p = 0,617$ за Лер и ST1RE. Тук значима положителна корелация се установява само между стойността на Лер и броя на рискови фактори, дефинирани като категории според RiskFactor3. Като се прилага ръководството на Коен (Cohen, 1988), големината на ефекта е близка до средната.

Приложи се еднофакторен дисперсионен анализ на резултатите за Лер и тяхното разпределение по групи според ST1RE. Статистически значимият F-тест при мъжете показва, че може да се отклони нулевата хипотеза H_0 : $F = 7,070$, $p = 0,002$. След приложение на постхок анализ на Туки HDS (Tukey), сигнификантна разлика се отчете в средните нива на Лер между мъжете с нисък ССР и изследваните с много висок ССР ($1,206 \pm 1,026$ ng/ml спрямо $4,354 \pm 3,743$ ng/ml, MD = 3,148 ng/ml, $p = 0,003$) и между мъжете с умерен и тези с много висок ССР ($2,162 \pm 1,561$ ng/ml спрямо $4,354 \pm 3,743$ ng/ml, MD = 2,192 ng/ml, $p = 0,029$). При жените с Т1Д резултатите от F-тестата показаха, че не може категорично да се отклони нулевата хипотеза H_0 . Отчетената разлика тук в средните стойности за Лер спрямо категорията ССР е несигнификантна ($F = 2,029$, $p = 0,142$). (табл. 32)

Таблица 32. Средноаритметични стойности за Лер при лица с Т1Д, групирани според критерии за оценка на ССР по ST1RE

Пол	Категория на ССР	N	Лер (Mean) ng/ml	SD	F	P value
Мъже с Т1Д	Нисък	14	1,205714	1,0259983		
	Умерено висок	18	2,162222	1,5609181		
	Много висок	24	4,354167	3,7425903		
	Общо	56	2,862500	2,9477975	7,070	0,002
Жени с Т1Д	Нисък	26	7,555000	5,1289042		
	Умерено висок	12	6,188333	4,4207544		
	Много висок	15	10,966667	9,5365228		
	Общо	53	8,211132	6,6795286	2,029	0,142

На фигура 33 е представено разпределението на резултатите за Лер при мъже и жени според ST1RE. Медианите и интерквартилните обхвати на Лер са: при мъжете с нисък ССР – 0,95 (0,458–1,468) ng/ml; с умерен ССР – 1,585 (1,000–3,293) ng/ml; с висок ССР – 3,39 (1,355–5,07) ng/ml; при жените с нисък ССР – 7,43 (3,975–9,103) ng/ml; с умерен ССР – 5,06 (3,345–9,688) ng/ml; с висок ССР – 5,94 (4,27–16,11) ng/ml. (фиг. 33)



Фигура 33. Разпределение на резултатите за Лер при мъже и жени от различни категории на ССР съгласно критерии на ST1RE (Gender 1 – мъже, gender 2 – жени, 1 – нисък ССР, 2 – умерен ССР, 3 – висок ССР)

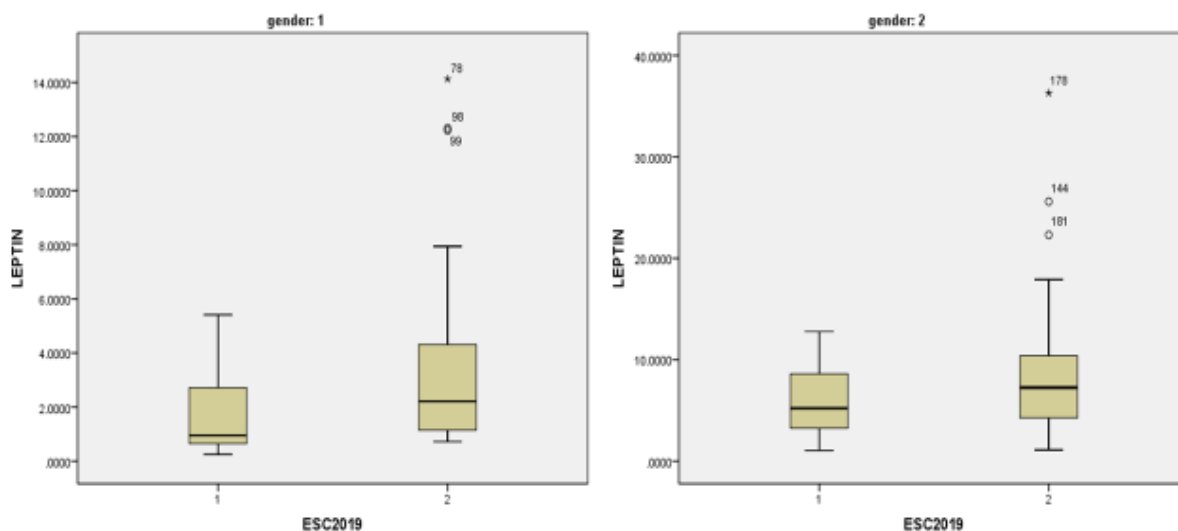
Резултатите от t-тест за независими извадки на Стюдънт при сравнение на средните нива за Лер от различни категории ССР според ESC от 2019 г. отново показват значимо различие. При мъжете отчетената разлика между изследваните с висок и тези с много висок ССР е 1,6288 ng/ml, $t = -1,982$, $p = 0,053$ ($1,757 \pm 1,664$ ng/ml спрямо $3,386 \pm 3,281$ ng/ml). При жените MD е 3,188 ng/ml, $t = -2,080$, $p = 0,043$ ($5,925 \pm 3,699$ ng/ml спрямо $9,113 \pm 7,387$ ng/ml). (табл. 33)

Таблица 33. Средноаритметични стойности за Лер при лица с Т1Д, групирани според критерии за оценка на ССР по ESC от 2019 г.

Пол	ESC от 2019 г.	N	mean	SD	MD	t	P value
Мъже	Висок ССР	18	1,757222	-1,62883	1,6644406	-1,982	0,053
	Много висок ССР	38	3,386053	-1,62883	3,2814849		
Жени	Висок ССР	15	5,925333	-3,18809	3,6998318		0,043
	Много висок ССР	38	9,113421	-3,18809	7,3871416	-2,080	

N – брой; mean – средна стойност; SD – стандартно отклонение

Медианите и интерквартилните обхвати на Лер при пациенти с Т1Д от различните категории ССР според насоките на ESC от 2019 г. са: при мъже с висок риск са 0,95 (0,6125–2,895) ng/ml, а при мъже с много висок ССР са 2,21 (1,133–4,365) ng/ml; при жени с висок риск са 5,21 (2,95–9,33) ng/ml, а при жени с много висок ССР са 7,245 (4,203–11,205) ng/ml. (фиг. 34)



Фигура 34. *Разпределение на резултатите за Лер при пациенти с Т1Д от различни категории на ССР според ESC от 2019 г. (1 – висок ССР, 2 – много висок ССР, gender 1 – мъже, 2 - жени)*

5.3. Лер – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3

Еднофакторен дисперсионен анализ за проверка на статистическа значимост на разликата между средноаритметичните стойности на Лер при пациенти с Т1Д според RiskFactor3 демонстрира отново тенденция за пропорционално нарастване в стойностите на Лер. Статистически значимият F-тест при мъжете и при жените показва, че може да се отклони нулевата хипотеза H_0 . ($F = 6,717$, $p = 0,001$ при мъже и $F = 3,666$, $p = 0,018$ при жени). (табл. 34)

Таблица 34. Средни стойности за Лер при мъже и жени според RiskFactor3

Пол	Група	N	Лер (Mean) ng/ml	SD	F	P value
Мъже с Т1Д	0	4	2,102500	0,8187541	.	
	1	28	2,157587	2,6644968		
	2	21	3,056667	2,1236674		
	3	3	9,093333	5,5022935		
	Общо	56	2,862500	2,9477975	6,717	0,001
Жени с Т1Д	0	4	4,890000	2,5237142		
	1	25	5,810800	3,7576965		
	2	18	10,83500	8,5814185		
	3	6	12,55500	7,5478679		
	Общо	53	8,211132	6,6795286	3,666	0,018

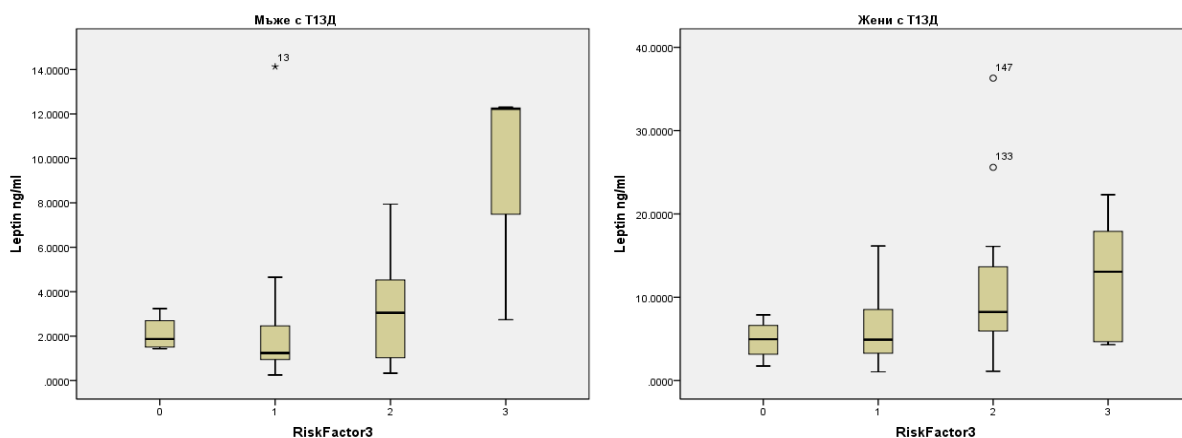
N – брой; *mean* – средна стойност; *SD* – стандартно отклонение

Средноаритметичните нива на Лер при мъже от различните категории според RiskFactor3 са: 2,103 ±0,819 ng/ml за група 0; 2,158 ±2,664 ng/ml за група 1; 3,057 ±2,127 ng/ml за група 2 и 9,093 ±5,502 ng/ml за група 3. След приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey) се установи сигнификантна разлика между мъжете от група 3 и изследваните от останалите групи – 0,1 и 2 ($p < 0,005$).

Средноаритметичните нива на Лер при жени от различните категории според RiskFactor3 са: 4,89 ±2,524 ng/ml за група 0; 5,811 ±3,758 ng/ml за група 1; 10,835 ±8,581 ng/ml за група 2 и 12,555 ±7,548 ng/ml за група 3. След приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey) се установи близка до сигнификантна разлика между жените от група 1 и група 2 ($p = 0,056$), както и между изследваните от група 1 и група 3 ($p = 0,093$).

Медианите и интерквартилните обхвати на Лер при мъже от различните категории според RiskFactor3 са: 1,87 (1,47–2,298) ng/ml за група 0; 1,24 (0,924–2,485) ng/ml за група 1; 3,05 (1,015–4,87) ng/ml за група 2; 12,23 (2,74 – *) ng/ml за група 3.

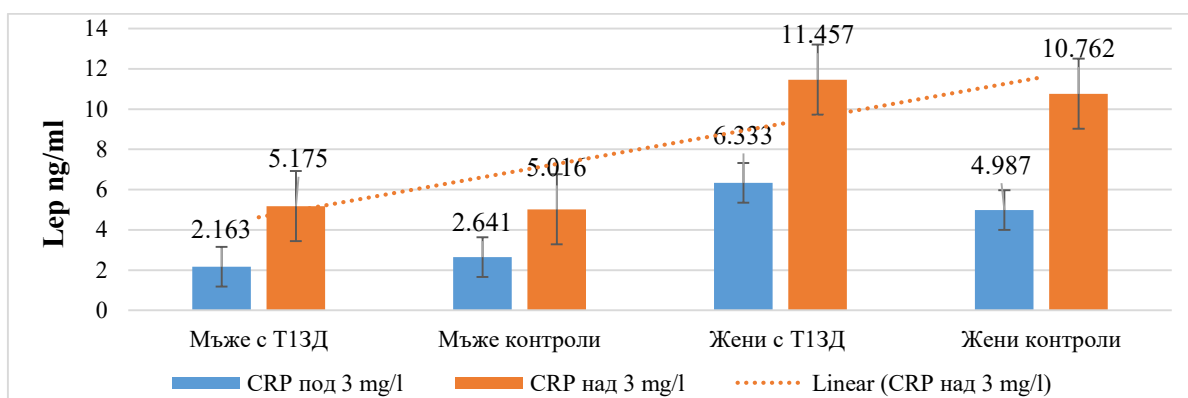
Медианите и интерквартилните обхвати на Лер при жени са: 4,965 (2,457–7,247) ng/ml за група 0; 4,91 (3,22–8,745) ng/ml за група 1; 8,235 (5,758–14,125) ng/ml за група 2; 13,065 (4,58–19,01) ng/ml за група 3. (фиг. 35)



Фигура 35. Разпределение на резултатите за Лер при мъже и жени от различни групи на предложения модел RiskFactor3. Gender 1 – мъже, 2 – жени

След приложение на t-тест за независими извадки на Стюдънт, не се регистрират значими различия в средните нива на Лер при изследваните пациенти с Т1Д спрямо HbA1C над и под 7% ($2,662 \pm 2,64$ ng/ml при HbA1C% > 7% спрямо $4,532 \pm 4,853$ ng/ml при HbA1C% < 7%, MD = 1,869 ng/ml, $t = -1,484$, $p = 0,127$ за мъжете с диабет и $8,361 \pm 7,045$ ng/ml при HbA1C% над 7% спрямо $7,226 \pm 3,626$ ng/ml при HbA1C% под 7%, MD = 1,135 ng/ml, $t = 0,416$, $p = 0,249$ за жените с диабет).

На фигура 36 са представени средните стойности на Лер при CRP под и над 3 mg/l. Маркирана е линия на тенденцията, според която се наблюдава пропорционално увеличение в стойностите на изследваната променлива. В двете изследвани групи, при мъже с Т1Д и при здрави мъже, се установяват сигнификантно по-високи резултати за Лер при CRP над 3 mg/l ($5,175 \pm 3,685$ ng/ml спрямо $2,163 \pm 2,312$ ng/ml за мъже с Т1Д, MD = 3,011 ng/ml, $t = 3,552$, $p = 0,001$ и $5,016 \pm 3,685$ ng/ml спрямо $2,641 \pm 2,312$ ng/ml за контроли мъже, MD = 2,374 ng/ml, $t = 2,664$, $p = 0,013$. (фиг. 36)

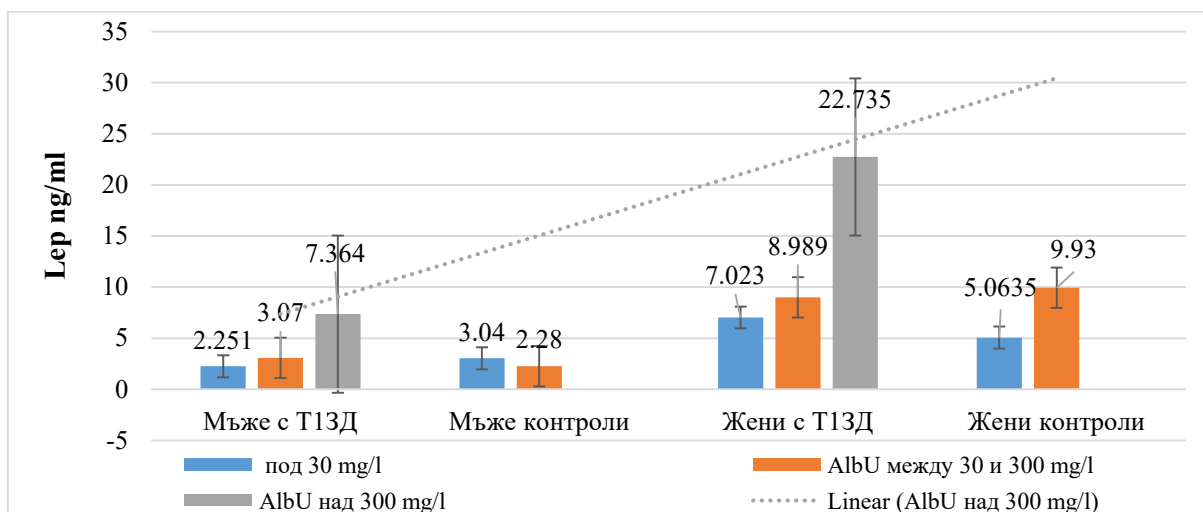


Фигура 36. Средни стойности за Лер в зависимост от CRP под и над 3 mg/l при мъже и жени

При така направената съпоставка Т-тестът за независими извадки на Стюдънт показва сигнификантно различие в стойностите за Lер и при жените. Отчетената разлика при контролите е MD = 5,774 ng/ml, t = 3,446, p = 0,000 (4,988 ±1,983 ng/ml при CRP под 3 mg/l спрямо 10,762 ±6,589 ng/ml при CRP над 3 mg/l), а при жените с Т1Д съответно MD = 5,125 ng/ml, t = 3,446, p = 0,000 (4,987 ±1,983 ng/ml при CRP под 3 mg/l спрямо 10,762 ±6,589 ng/ml при CRP над 3 mg/l). (фиг. 36)

Еднофакторен дисперсионен анализ показва статистически значими различия в концентрациите на Lер при лицата с дългогодишен Т1Д спрямо AlbU под 30 mg/l, между 30 и 300 mg/l и над 300 mg/l. Маркирана е линия на тенденцията, според която се наблюдава пропорционално увеличение в стойностите на изследваната променлива. При мъжете те са съответно: 2,251 ±1,756 ng/ml, 3,070 ±3,570 ng/ml и 5,619 ±2,513 ng/ml, F = 8,401, p = 0,001. При жените са: 7,023 ±4,786 ng/ml, 8,989 ±7,221 ng/ml и 22,735 ±19,1838 ng/ml, F = 6,713, p = 0,003. След приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey), тези разлики останаха сигнификантни между мъжете и жените с AlbU над 300 mg/l и тези с AlbU под 30 mg/l, от една страна, и тези с ALbU между 30 и 300 mg/l, от друга страна (p < 0,05). (фиг. 37)

При мъжете от контролната група подобно различие на се отчита (F = 0,135, p = 0,717), а при жените – значима разлика в стойностите за Lер се отчита между случаите с AlbU под 30 mg/l и тези с AlbU между 30 и 300 mg/l (5,064 ±2,213 ng/ml спрямо 9,93 ±6,620 ng/ml, F = 7,180, p = 0,014). (фиг. 37)



Фигура 37. Средни нива за Lер в зависимост от стойността на AlbU при мъже и жени

Оценката на линейната връзка между променливите Lер, HbA1C, AlbU и CRP беше измерена с помощта на корелационния коефициент на Пирсън. В групата на Т1Д се установиха три сигнификантни корелации: между Lер и AlbU при мъжете (r = 0,367, p = 0,005) и между

Lep и AlbU ($r = 0,413, p = 0,002$) и Lep и CRP ($0,378, p = 0,006$) при жените. Всички зависимости изброени дотук са средни по сила и прави по посока. (табл. 35)

Таблица 35. Корелационни зависимости между Lep и: AlbU, CRP и HbA1C

Група	Пол			AlbU mg/l	CRP mg/l	HbA1C%	Лептин ng/ml
Т1Д	Мъже	Lep ng/ml	Pearson Correlation	0,367**	0,012	-0,149	1
				0,005	0,929	0,272	
				56	56	56	56
	Жени	Lep ng/ml	Pearson Correlation	0,413**	0,378**	0,110	1
				0,002	0,006	0,432	
				53	52	53	53
Контроли	Мъже	Lep ng/ml	Pearson Correlation	0,131	0,309	0,189	1
				0,516	0,116	0,346	
				27	27	27	27
	Жени	Lep ng/ml	Pearson Correlation	0,297	0,685**	0,505*	1
				0,168	0,000	0,012	
				23	24	24	24
** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).							
* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)							

В таблица 35 са представени корелационни зависимости и при контролните случаи, което служи за съпоставка на данните и установяване на наличните патологични промени при Т1Д. С Lep се регистрират следните положителни корелации: с CRP при мъже и жени ($r = 0,309, p = 0,116$ и $r = 0,685, p = 0,000$) и с HbA1C при жени ($r = 0,505, p = 0,012$).

С цел да се установи линейна комбинация между анализирани променливи (Lep, CRP и AlbU) беше приложен множествен линеен регресионен анализ паралелно за мъже и жени от двете изследвани групи. В таблица 36 са представени резултати от модели, които демонстрираха сигнификантна стойност. Комбинацията от променливи CRP и AlbU за прогноза на стойността за Lep е статистически значима при мъже и жени с Т1Д и при жените от контролната група ($F = 4,14, p = 0,021$ при мъже с Т1Д, $F = 8,955, p = 0,000$ при жени с Т1Д и $F = 5,57, p = 0,012$ при здрави жени). Изведени са следните регресионни уравнения:

$$\text{Lep (ng/ml)} = 5,424 + 0,325 \cdot \text{CRP (mg/l)} + 0,358 \cdot \text{AlbU (mg/l)} \text{ за жени с Т1Д}$$

$$\text{Lep (ng/ml)} = 3,615 + 0,521 \cdot \text{CRP (mg/l)} + 0,345 \cdot \text{AlbU (mg/l)} \text{ за здрави жени}$$

Таблица 36. Множествен линеен регресионен анализ със зависима променлива Lер (ng/ml) и независими променливи: CRP (mg/l) и AlbU (mg/l)

Група	Std. Beta	t	P value	F	P value	R	R ²
Мъже с Т1Д	Const 2,372	5,605	0,000	4,14	0,021	0,368	0,102
	CRP 0,018	0,142	0,888				
	AlbU 0,367	2,876	0,006				
Жени с Т1Д	Const 5,424	5,194	0,000	8,955	0,000	0,517	0,238
	CRP 0,325	2,627	0,011				
	AlbU 0,358	2,892	0,006				
Здрави жени	Const 3,615	4,221	0,000	5,57	0,012	0,598	0,294
	CRP 0,521	2,896	0,009				
	AlbU 0,345	1,916	0,070				

Стойността на adjusted R² при жените с Т1Д е 0,238, а при здравите жени е 0,294. Това показва, че 23,8% (при жени с Т1Д) и 29,4% (при здрави жени) от измененията в концентрацията на Lер могат да се обяснят с представените регресионно модели. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е малка към типична големина на ефекта.

При мъжете с Т1Д, в хода на линейния регресионен анализ, CRP като независима променлива загуби сигнификантността си и е създаден редуциран регресионен модел, в който е включен само AlbU: F = 8,412, p = 0,005. Стойността на adjusted R² е 0,119. Това показва, че 11,9% от измененията в концентрацията на Lер могат да се обяснят с представения регресионен модел, което съгласно Коен (Cohen, 1988) отново е малка големина на ефекта. Изведено е следното регресионно уравнение:

$$\text{Lер (ng/ml)} = 2,388 + 0,367 \cdot \text{AlbU (mg/l)}$$

5.4. Lер – логистични регресионни модели и ROC анализи за извеждане на прагови стойности

За да се изследва дали независимата променлива Lер статистически значимо прогнозира категорията на ССР, дефинирана според критериите на ST1RE, ESC от 2019 г. и предложения модел RiskFactor3 са конструирани модели на логистична регресия. Моделите прогнозира дали пациентът ще попадне в категорията на много висок ССР: $\chi^2 = 13,858$, $df = 1$, $p = 0,000$ за мъже и $\chi^2 = 3,394$, $df = 1$, $p = 0,065$ за жени спрямо ST1RE; $\chi^2 = 5,23$, $df = 1$, $p = 0,022$ за мъже и $\chi^2 = 3,141$, $df = 1$, $p = 0,076$ за жени спрямо ESC от 2019 г.; $\chi^2 = 2,34$, $df = 1$, $p = 0,126$ за мъже и $\chi^2 = 10,23$, $df = 1$, $p = 0,001$ за жени спрямо RiskFactor3.

Моделът спрямо ST1RE обяснява между 21,9% (Cox & Snell R²) и 29,4% (Nadelkerkes R²) от дисперсията в статистиката и коректно класифицира 69,6% от наблюденията при мъжете и

73,6% при жените ($R^2 = 0,089$). Критерият на Валд показва, че стойността на биомаркера Lер ($p = 0,005$) влияе съществено върху прогнозата на висок ССР според ST1RE при мъжете. При жените значимостта е близка до сигнификантната, $p = 0,081$. Стойностите на регресионните коефициенти при мъжете и жените са съответно $\beta = 0,527$ и $0,083$, а стойностите на регресионните константи са $\alpha = -1,658$ и $-1,655$.

Моделът спрямо ESC от 2019 г. обяснява между 8,90% (Cox & Snell R^2) и 12,5% (Nadelkerkes R^2) от дисперсията в статистиката и коректно класифицира 67,9% от наблюденията при мъжете (71,7% при жените, $R^2 = 0,083$). Критерият на Валд показва, че стойността на маркера Lер ($p = 0,071$) влияе съществено върху прогнозата на ССР (висок или много висок) при мъжете според ESC2019 г. (при жените не е значимо, $p = 0,129$). Стойностите на регресионните коефициенти при мъжете и жените са съответно $\beta = 0,339$ и $0,107$, а стойностите на регресионните константи са $\alpha = 0,049$ и $0,155$.

Моделът спрямо RiskFactor3 обяснява между 18,8% (Cox & Snell R^2) и 25,1% (Nadelkerkes R^2) от дисперсията в статистиката и коректно класифицира 51% от наблюденията при жените (55,8% при мъжете, $R^2 = 0,059$). Критерият на Валд показва, че стойността на маркера Lер ($p = 0,011$) влияе съществено върху прогнозата на RiskFactor3 (от 1 или ≥ 2 група) при жените (при мъжете не е сигнификантно, $p = 0,153$). Стойността на регресионните коефициенти при мъжете и жените са съответно $\beta = 0,149$ и $0,190$, а стойностите на регресионните константи – $\alpha = 0,664$ и $-1,430$.

В таблица 37 са представени експонентите на регресионните коефициенти $\text{Exp}(B)$ за трите модела при мъже и жени с Т1Д. По отношение на ST1RE, $\text{Exp}(B)$ показва, че ако концентрацията на Lер се увеличи с 1 ng/ml, то шансът пациентът да попадне в категория на висок ССР се увеличава с 1,693 пъти за мъжете. При ESC от 2019 г. шансът пациентът да попадне от категория висок към много висок ССР е съответно 1,404 пъти при мъжете. При RiskFactor3 всяко увеличение в концентрацията на Lер с 1 ng/ml води до увеличение на шанса жените да имат ≥ 2 РФ ($\text{HbA1C} \geq 7\%$, $\text{CRP} \geq 3$ mg/l или $\text{AlbU} \geq 30$ mg/l) с 1,21 пъти. (табл. 37)

При съпоставка на статистическата значимост от логистичните регресионни модели е важно да се отбележи, че най-значим ефект на независимата променлива Lер върху категорията ССР при пациенти има спрямо ST1RE и ESC от 2019 г. за мъже и спрямо Riskfactor3 за жени.

Таблица 37. Прогностична стойност на Lep спрямо: ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3

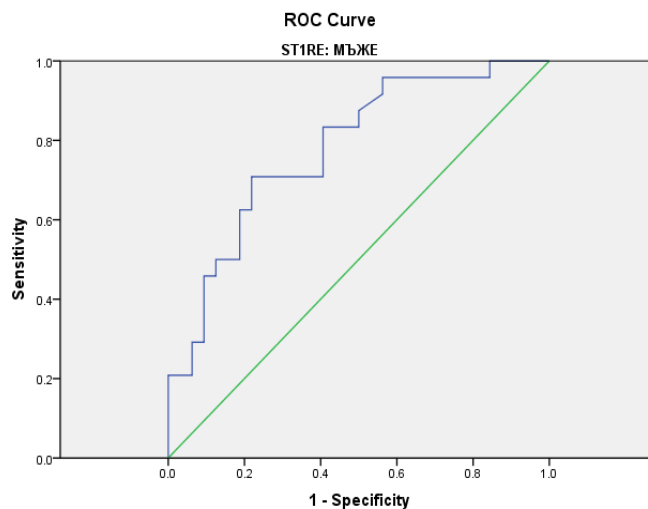
Модел	Пол	OD%	95% CI	P value
ST1RE – висок CCP	Мъже	1,693	1,169–2,451	0,005
	Жени	1,087	0,990–1,193	0,081
ESC от 2019 г. – много висок CCP	Мъже	1,404	0,971–2,029	0,071
	Жени	1,113	0,969–1,278	0,129
RiskFactor3 ≥ 2 РФ (HbA1C $\geq 7\%$, CRP ≥ 3 mg/l или AlbU ≥ 30 mg/l)	Мъже	1,161	0,946–1,424	0,153
	Жени	1,210	1,045–1,400	0,011

За установяване на прагови стойности на OPG, които отдиференцират групите с висок от много висок CCP според различните скали се приложи ROC анализ. В таблица 38 са представени обобщени резултати от анализа.

Таблица 38. ROC анализ за оценка на полово-зависима прогностична стойност на OPG. AUC – площ под кривата; SE – standard error; CI – confidence interval

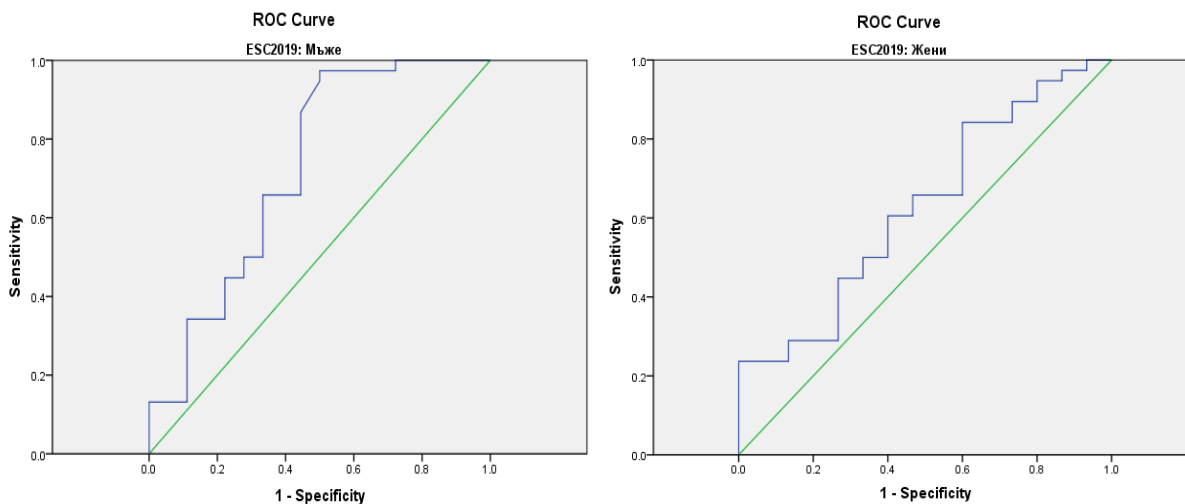
Показател	Критерий	Area Under the Curve ^c				
		Променлива: Lep (ng/ml)				
		AUC	SE	P value	Asymptotic 95% CI	
					Lower Bound	Upper Bound
RiskFactor3 Мъже	Наличие на 2 РФ	0,563	0,083	0,437	0,400	0,726
RiskFactor3 Жени	Наличие на 2 РФ	0,673	0,080	0,041	0,517	0,829
ST1RE Мъже	Висок CCP	0,780	0,062	0,000	0,659	0,901
ST1RE Жени	Висок CCP	0,598	0,095	0,269	0,411	0,785
ESC от 2019 г. Мъже	Много висок CCP	0,723	0,081	0,007	0,565	0,881
ESC от 2019 г. Жени	Много висок CCP	0,628	0,085	0,149	0,462	0,794

При ST1RE, AUC за мъжете е 0,780, $p = 0,000$, а за жените - 0,598, $p = 0,269$. ROC анализът демонстрира добра диагностична точност на Lep в отдиференциране на мъже с висок CCP. При cut-off стойност на Lep = 2,28 ng/ml биомаркерът има диагностична чувствителност 70,8% и диагностична специфичност 78,1%. (фиг. 38) С оглед на незадоволителна надеждност на Lep при жени не е изведена прагова стойност за разграничаване на висок CCP. За мъже се определиха: $LR+ = 3,23$ и $LR- = 0,309$, $DOR = 10,45$, индекс на Youden = 0,927 и $DE = 75\%$.



Фигура 38. AUC - ROC за *Lep* (ng/ml) при отдиференциране на мъже с висок CСР, според ST1RE. Sensitivity – чувствителност, specificity – специфичност

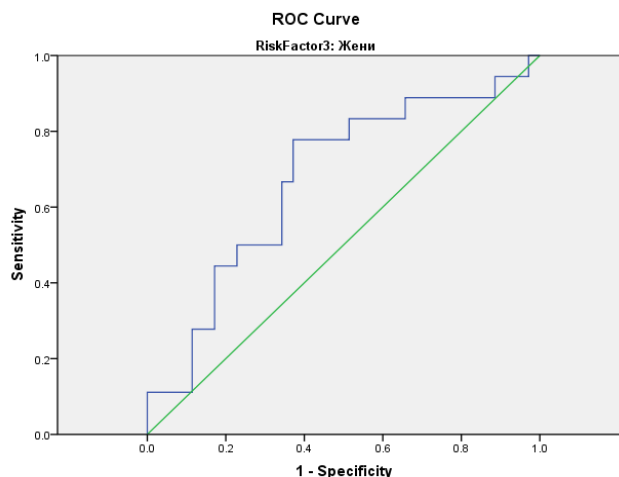
При ESC от 2019 г. AUC за мъжете е 0,723, $p = 0,007$, а за жените е 0,628, $p = 0,462$. ROC анализът тук отново демонстрира по-добра диагностична точност при мъже спрямо жени с Т1Д. При cut-off стойност на *Lep* = 1,38 ng/ml за мъже, биомаркерът има диагностична чувствителност 65,8% и диагностична специфичност 66,7%; при cut-off = 5,475 ng/ml за жени с чувствителност 60,5% и специфичност 60%. (фиг. 39) Определиха се: $LR+ = 1,98$ и $LR- = 0,506$, $DOR = 3,91$, индекс на Youden = 0,991 и ДЕ = 66% при мъже и $LR+ = 1,51$ и $LR- = 0,661$, $DOR = 2,28$, индекс на Youden = 1,005 и ДЕ = 71,7%.



Фигура 39. ROC криви за диагностичната надеждност на *Lep* при отдиференциране на мъже и жени с много висок CСР според ESC от 2019 г.

При RiskFactor3, AUC за мъжете е 0,563, $p = 0,437$, а за жените е 0,673, $p = 0,041$. При cut-off стойност на *Lep* = 5,815 ng/ml за жени биомаркерът има диагностична чувствителност 77,8% и диагностична специфичност 62,9%. (фиг. 40) Не е изведена прагова стойност на *Lep*

за мъже. Определиха се: $LR+ = 2,097$ и $LR- = 0,476$, $DOR = 4,405$, индекс на Youden = 1,149 и $DE = 67,9\%$ за жени с Т1Д.



Фигура 40. AUC-ROC за Lep при отдиференциране на жени от групи 0, 1, 2 спрямо група 3 на RiskFactor3

В таблица 39 пациентите са разпределени според това дали са ИП, ИО, ФП или ФО при съответната cut-off стойност на Lep за ST1RE, ESC 2019 г. и предложения модел RiskFactor3.

Таблица 39. Диагностична надеждност на Lep при отдиференциране на пациенти с много висок ССР спрямо критериите на ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3

Показател	Критерий	cut-off	N	ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС	ДЕ
Lep (ng/ml) Мъже	St1RE – висок ССР	2,28	56	17	25	7	7	70,8%	78,1%	75%
Lep (ng/ml) Мъже	ESC от 2019 г. – много висок ССР	1,38	56	25	12	6	13	65,8%	66,7%	66%
Lep (pmol/l) Жени	ESC от 2019 г. – много висок ССР	5,475	53	23	15	9	6	60,5%	60,0%	71,7%
Lep (pmol/l) Жени	RiskFactor3 – наличие на 2 РФ	5,815	53	14	22	13	4	77,8%	62,9%	67,9%

ИП – истински положителни, ИО – истински отрицателни, ФП – фалшиво положителни, ФО – фалшиво отрицателни

От така изведените данни на ROC анализи може да се обобщи, че Lep има добра прогностична стойност за мъже при отдиференцирането на висок ССР спрямо ST1RE (приблизително 80%) и ESC от 2019 г. (приблизително 70%). При жените Lep има достатъчна диагностична точност при разграничаване на висок от много висок ССР спрямо ESC от 2019 г. (приблизително 63%) и групи 0 и 1 от групи 2 и 3 на RiskFactor3 (приблизително 70%).

6. Хематоморфологични показатели

6.1. Сравнение между пациенти с Т1Д и здрави лица

В таблица 1 са представени хематоморфологични показатели, като средните им стойности са съпоставени между изследваните лица с Т1Д и случаите от контролната група. Т-тестът за независими извадки на Стюдънт демонстрира статистически значимо различие за следните левкоцитни променливи: общ брой на левкоцити (WBC) ($7,03 \pm 1,91 \cdot 10^9/L$ спрямо $6,42 \pm 1,64 \cdot 10^9/L$, MD = $0,604 \cdot 10^9/L$, p = 0,038, t = 2,090), абсолютен брой на Neu ($4,21 \pm 1,50 \cdot 10^9/L$ спрямо $3,71 \pm 1,26 \cdot 10^9/L$, MD = $0,502 \cdot 10^9/L$, t = 2,223, p = 0,027) и Eo ($0,22 \pm 0,217 \cdot 10^9/L$ спрямо $0,16 \pm 0,104 \cdot 10^9/L$, MD = $0,053 \cdot 10^9/L$, t = 2,235, p = 0,027). Изброените променливи се отличават с по-високи стойности при пациентите с Т1Д спрямо изследваните от контролната група. Средният абсолютен брой на Ba при случаите с Т1Д е по-нисък, отколкото при контролите ($0,0439 \pm 0,025 \cdot 10^9/L$ спрямо $0,0441 \pm 0,22 \cdot 10^9/L$), а при Ly е по-висок при лицата с Т1Д ($2,03 \pm 0,65 \cdot 10^9/L$), отколкото е при здравите индивиди ($1,99 \pm 0,531 \cdot 10^9/L$). Няма значима междугрупова разлика между средните нива на Ly и Ba – p > 0,05. (табл. 40)

Еритроцитните показатели се отличават със следните особености – всички отчетени стойности са по-ниски при пациентите с Т1Д. Единствено RDW_CV% е по-висок при болните спрямо контролите ($13,03 \pm 1,56\%$ vs $12,98 \pm 1,41\%$, MD = 0,049%, p = 0,837). Близки до сигнификантни различия след междугруповата съпоставка са средните стойности за MCH и MCHC. При пациентите с Т1Д средното ниво на MCH е $29,21 \pm 2,17$ pg, а при контролите е $30,47 \pm 4,91$ pg с MD = 0,952 pg, p = 0,071. При MCHC средното ниво за болните е $331,62 \pm 15,73$ g/L, а при контролите – $334,75 \pm 11,91$ g/L с MD = 3,125 g/L, p = 0,096. (табл. 40)

При междугрупова съпоставка се установиха по-високи средни нива на всички тромбоцитните показатели при пациентите с дългогодишен Т1Д. Две от намерените различия са сигнификантни при 95% достоверност на резултатите – PLT ($280,60 \pm 76,016 \cdot 10^9/L$ за група с Т1Д спрямо контролната група – $253,08 \pm 47,098 \cdot 10^9/L$, MD = $27,520 \cdot 10^9/L$, t = 2,999, p = 0,003) и PCT ($0,299 \pm 0,070\%$ за лица с Т1Д спрямо $0,264 \pm 0,048\%$ за контроли, MD = 0,0345, t = 3,069, p = 0,003). Установените различия между MPV и PDW са при 90% достоверност на резултатите. Междугруповото различие при показателя MPV е 0,340fL в полза на пациентите с Т1Д – $10,652 \pm 1,172$ fL vs $10,22 \pm 1,16$ fL при контроли, t = 1,840, p = 0,067. При PDW намерената разлика е 0,685fL, t = 1,872, p = 0,063, като средното ниво на променливата при пациентите с Т1Д е $12,924$ fL $\pm 2,19$ fL vs $12,25 \pm 1,87$ fL за контроли. Само при P-LCR не се установи междугрупова сигнификантна разлика, но отново средните нива са по-високи при пациентите с Т1Д ($31,527 \pm 8,123\%$ vs $29,557 \pm 7,354\%$, MD = 1,969, t = 1,428, p = 0,155). (табл. 40)

Таблица 40. Хематоморфологични показатели при пациенти с Т1Д и здрави индивиди

Група участници		N	Mean	SD	t	P value	MD
WBC 10 ⁹ /L	пациенти с Т1Д	124	7,0250	1,90846	2,090	0,038	0,60364
	контролна група-зdravi	59	6,4214	1,63854			
Neu 10 ⁹ /L	пациенти с Т1Д	124	4,2141	1,49966	2,223	0,027	0,50191
	контролна група-зdravi	59	3,7122	1,26142			
Neu %	пациенти с Т1Д	124	58,9960	9,45820	1,599	0,112	2,13156
	контролна група-зdravi	59	56,8644	7,89524			
Eo 10 ⁹ /L	пациенти с Т1Д	124	0,2160	0,21679	2,235	0,027	0,05309
	контролна група-зdravi	59	0,1629	0,10445			
Eo %	пациенти с Т1Д	124	2,8919	2,21387	1,019	0,309	0,32583
	контролна група-зdravi	59	2,5661	1,53326			
Ba10 ⁹ /L	пациенти с Т1Д	124	0,0439	0,02495	-0,052	0,959	-0,00020
	контролна група-зdravi	59	0,0441	0,02174			
Ba %	пациенти с Т1Д	124	0,6476	0,37686	-0,956	0,340	-0,05581
	контролна група-зdravi	59	0,7034	0,35183			
Mo 10 ⁹ /L	пациенти с Т1Д	124	0,5190	0,18890	1,241	0,216	0,03065
	контролна група-зdravi	59	0,4883	0,13787			
Mo %	пациенти с Т1Д	124	7,5113	1,87821	-0,806	0,422	-0,22430
	контролна група-зdravi	59	7,7356	1,70129			
Lym 10 ⁹ /L	пациенти с Т1Д	124	2,0252	0,64846	0,374	0,709	0,03381
	контролна група-зdravi	59	1,9914	0,53075			
Lym %	пациенти с Т1Д	124	29,4944	7,64094	-1,945	0,054	-2,23446
	контролна група-зdravi	59	31,7288	7,07952			
Hb g/L	пациенти с Т1Д	124	138,23	17,734	-1,605	0,111	-3,919
	контролна група-зdravi	59	142,15	14,208			
RBC 10 ¹² /L	пациенти с Т1Д	124	4,6600	0,58851	-1,291	0,198	-0,11797
	контролна група-зdravi	59	4,7780	0,55380			
HCT L/L	пациенти с Т1Д	124	0,4139	0,05145	-1,583	0,115	-0,01068
	контролна група-зdravi	59	0,4245	0,03774			
MCV fl	пациенти с Т1Д	124	88,9589	5,41877	-0,436	0,663	-0,41571
	контролна група-зdravi	59	89,3746	7,13342			
MCH pg	пациенти с Т1Д	124	29,5145	2,17311	-1,819	0,071	-0,95159
	контролна група-зdravi	59	30,4661	4,91362			
MCHC g/L	пациенти с Т1Д	124	331,62	11,734	-1,676	0,096	-3,125
	контролна група-зdravi	59	334,75	11,910			
RDW_CV %	пациенти с Т1Д	124	13,032	1,5562	0,206	0,837	0,0492
	контролна група-зdravi	59	12,983	1,4080			
MPV fL	пациенти с Т1Д	124	10,5621	1,17200	1,846	0,067	0,34006
	контролна група-зdravi	59	10,2220	1,16087			
PDW fL	пациенти с Т1Д	109	12,9339	2,18794	1,993	0,049	0,68501
	контролна група-зdravi	47	12,2489	1,86791			
P-LCR %	пациенти с Т1Д	109	31,5266	8,12278	1,486	0,141	1,96916
	контролна група-зdravi	47	29,5574	7,35452			
PCT %	пациенти с Т1Д	109	0,2992	0,07017	3,545	0,001	0,03449
	контролна група-зdravi	47	0,2647	0,04822			
PLT x10 ⁹ /L	пациенти с Т1Д	124	280,60	76,016	2,999	0,003	27,520
	контролна група-зdravi	59	253,08	47,098			

N – брой; *mean* – средна стойност; *SD* – стандартно отклонение

В таблица 41 са представени избрани хематоморфологични показатели с разлики в средноаритметичните стойности спрямо медианата на давността на диабета (24 години), които

t-тестът за независими извадки на Стюдънт определи като статистически значими. Тенденцията, която се установява, е следната: при пациентите с по-голяма продължителност на заболяването WBC, Eo и Neu показват редукция. Ba, Mo и Lym се увеличават при по-продължително боледуване. За изброените показатели няма установено сигнификантно различие – $p > 0,05$. При сравняването на еритроцитните показатели се установяват няколко сигнификантни разлики. Еритроцитите показват понижение при по-продължително боледуване като успоредно се регистрира повишение при MCV, MCH и при RDW_CV: $4,75 \pm 0,54 \cdot 10^{12}/L$ vs $4,56 \pm 0,63 \cdot 10^{12}/L$, MD = $0,19 \cdot 10^{12}/L$, $p = 0,069$ за еритроцити; $90,42 \pm 4,11$ fl vs $87,55 \pm 6,15$ fl, MD = $2,87$ fl, $p = 0,003$ за MCV; $29,96 \pm 1,7$ pg vs $29,08 \pm 2,48$ pg, MD = $0,88$ pg, $t = -2,319$, $p = 0,022$ за MCH; $12,94 \pm 1,79\%$ vs $13,13 \pm 1,27\%$, MD = $-0,19\%$, $t = -0,695$, $p = 0,488$ за RDW-CV%.

С увеличаване продължителността на Т1Д, PLT и PCT се понижават, но се регистрира повишаване в средните нива на MPV, PDW и P-LCR: $295,03 \pm 72,45 \cdot 10^9/L$ vs $265,70 \pm 77,32 \cdot 10^9/L$, MD = $29,33 \cdot 10^9/L$, $t = 2,180$, $p = 0,031$ за PLT; $0,307 \pm 0,07\%$ vs $0,293 \pm 0,07\%$, MD = $0,014$, $t = 1,047$, $p = 0,297$ за PCT; $10,34 \pm 1,26$ fL vs $10,79 \pm 1,03$ fL, MD = $0,44$ fl, $t = -2,132$, $p = 0,032$ за MPV; $30,15 \pm 9,01\%$, vs $32,78 \pm 7,06\%$, MD = $2,63\%$, $t = -1,700$, $p = 0,092$ за P-LCR и $12,68 \pm 2,46$ fL vs $13,17 \pm 1,89$ fL, MD = $0,49$, $t = -1,173$, $p = 0,243$ за PDW. От петте анализирани показателя се регистрират значими разлики за MPV и PLT. (табл. 41)

Таблица 41. Хематоморфологични показатели и установени различия в зависимост от давността на диабета (под и над 24 години)

Показател	Давност на Т1Д	N	Mean	SD	t	P value	MD
RBC $10^{12}/L$	под 24 год.	63	4,7544	0,53726	1,833	0,069	0,19199
	над 24 год.	61	4,5625	0,62665			
MCV fl	под 24 год.	63	87,5476	6,14880	-3,045	0,003	-2,86877
	над 24 год.	61	90,4164	4,10797			
MCH pg	под 24 год.	63	29,0794	2,47622	-2,319	0,022	-0,88457
	над 24 год.	61	29,9639	1,71484			
MPV fL	под 24 год.	63	10,3444	1,26437	-2,132	0,035	-0,44244
	над 24 год.	61	10,7869	1,03093			
P-LCR %	под 24 год.	52	30,1538	9,01453	-1,700	0,092	-2,62510
	над 24 год.	57	32,7789	7,06356			
PLT $\times 10^9/L$	под 24 год.	63	295,03	72,448	2,180	0,031	29,327
	над 24 год.	61	265,70	77,318			

N – брой; mean – средна стойност; SD – стандартно отклонение

В таблица 42 са представени определени хематоморфологични индекси в зависимост от гликемичния контрол, които t-тестът за независими извадки на Стюдънт определи като статистически значими. При лица с Т1Д с HbA1C над 7% намерената стойност за MCV е $88,352$

$\pm 5,436$ fL vs $92,311 \pm 3,999$ fL, при HbA1C под 7%, MD = 3,958 fL, $t = -3,025$, $p = 0,003$. При случаите с лош гликемичен контрол средното ниво на MCH е $29,320 \pm 2,256$ pg, а при случаите с HbA1C под 7% - $3,589 \pm 1,193$ pg, MD = 1,269 pg, $t = -3,613$, $p = 0,001$. RDW-CV% е по-високо при случаите с HbA1C над 7%: $13,057 \pm 1,652\%$ vs $12,895 \pm 0,875\%$, но без значима разлика. Средното ниво на хемоглобина (Hb) се понижава при HbA1C >7% - $137,9 \pm 18,443$ g/L vs $139,74 \pm 13,453$ g/L при HbA1C <7%, MD = 1,775 g/l, $p = 0,690$. При тромбоцитните показатели се установяват сигнификантни различия при съпоставка на PCT и PLT, като те са по-високи при HbA1C над 7%: $286,32 \pm 78,259 \cdot 10^9/L$ vs $249,00 \pm 53,438 \cdot 10^9/L$, MD = $37,324 \cdot 10^9/L$, $p = 0,014$ за PLT. За PCT намерените разлики са значими при 90% достоверност на резултатите: $0,304 \pm 0,071\%$ vs $0,271 \pm 0,059\%$, MD = 0,033%, $p = 0,059$. (табл. 42)

Таблица 42. Хематоморфологични показатели и установени различия в зависимост от гликемичния контрол (HbA1C% под и над 7%) при лица с дългогодишен Т1Д

	HbA1C над и под 7%	N	Mean	SD	t	P value	MD
MCV fl	Над 7%	105	88,3524	5,43589	-3,025	0,003	-3,95815
	под 7%	19	92,3105	3,98969			
MCH pg	Над 7%	105	29,3200	2,25595	-3,613	0,001	-1,26947
	под 7%	19	30,5895	1,19345			
PCT %	Над 7%	93	0,3040	0,07108	1,982	0,059	0,03273
	под 7%	16	0,2712	0,05909			
PLT $\times 10^9/L$	Над 7%	105	286,32	78,259	2,584	0,014	37,324
	под 7%	19	249,00	53,438			

N – брой; *mean* – средна стойност; *SD* – стандартно отклонение

В таблица 43 са представени средноаритметичните стойности за изследваните тромбоцитни показатели при мъже и жени. В групата с Т1Д се установяват сигнификантни различия при всички анализирани променливи, като по-високите нива са отчетени при жените: $10,524 \pm 0,999$ fl спрямо $10,605 \pm 1,35$ fl, $p = 0,006$ за MPV; $31,188 \pm 6,751\%$ спрямо $31,926 \pm 9,549\%$, $p = 0,026$ за P-LCR%; $0,2824 \pm 0,067\%$ спрямо $0,319 \pm 0,069\%$, $p = 0,006$ за PCT% и $268,73 \pm 5,031 \cdot 10^9/L$ спрямо $294,12 \pm 75,501 \cdot 10^9/L$, $p = 0,063$ за PLT. Изключение правят резултатите за PDW, които са по-високи при мъжете: $12,936 \pm 1,869$ fl vs $12,932 \pm 2,535$ fl, $p = 0,026$. В контролната група отново се отчита превес при жените за средните нива на променливите, но намерените различия не са сигнификантни. Изключение правят резултатите за PCT ($0,25 \pm 0,04\%$ vs $0,28 \pm 0,05\%$). (табл. 43)

Таблица 43. Средноаритметични стойности на тромбоцитни показатели в зависимост от половата принадлежност

Група		Пол	N	Mean	SD	t	P value
Т1Д	MPV fl	Мъже	66	10,5242	0,99878	-0,382	0,006
		Жени	58	10,6052	1,35017		
	PDW fl	Мъже	59	12,9356	1,86979	0,009	0,026
		Жени	50	12,9320	2,53236		
	P-LCR %	Мъже	59	31,1881	6,75104	-0,471	0,026
		Жени	50	31,9260	9,54860		
	PCT %	Мъже	59	0,2824	0,06696	-2,800	0,006
		Жени	50	0,3190	0,06932		
	PLT 10 ⁹ /L	Мъже	66	268,73	75,031	-1,875	0,063
		Жени	58	294,12	75,501		
Контролна група	MPV fl	Мъже	33	10,042	1,26071	-1,348	0,192
		Жени	26	10,450	0,99769		
	PDW fl	Мъже	24	12,2333	1,87655	-0,058	0,895
		Жени	23	12,2652	1,90086		
	PLCR %	Мъже	24	28,8542	7,45975	-0,666	0,688
		Жени	23	30,2913	7,33590		
	PCT %	Мъже	24	0,2467	0,04331	-2,805	0,007
		Жени	23	0,2835	0,04667		
	PLT 10 ⁹ /L	Мъже	33	244,33	47,750	-1,631	0,108
		Жени	26	264,19	44,704		

N – брой; mean – средна стойност; SD – стандартно отклонение

От последваща междугрупова съпоставка на тромбоцитните показатели се установиха значими различия за MPV, PCT и PLT при мъжете и за PCT и PLT при жените и те са съответно – $F = 4,282$, $p = 0,041$, $F = 5,811$, $p = 0,018$, $F = 2,893$, $p = 0,092$ и $F = 4,980$, $p = 0,029$, $F = 3,517$, $p = 0,064$. (табл. 44)

Таблица 44. Сигнификантни различия за тромбоцитни показатели при лица с Т1Д и здрави индивиди

ПОЛ	Група	F	P value
Мъже	MPV fl	4,282	0,041
	PCT %	5,811	0,018
	PLT 10 ⁹ /L	2,893	0,092
Жени	PCT %	4,980	0,029
	PLT 10 ⁹ /L	3,517	0,064

В таблица 45 са съпоставени случаите в двете тествани групи според нивото им на MPV (лимитирано над и под 10%), като са сравнени стойностите между мъже и жени. Жените от контролната група с MPV над 10% са 20 (76.9%), а мъжете са 21 (63.6%). Отчита се разлика с превес на жените, но тя не е сигнификантна – $\chi^2 = 1.211$, $p = 0.270$. Според настоящите данни

рискът при жените от контролната група да имат MPV над 10% е близо два пъти по висок от мъжете – OR= 1,905 (95% CI 0,600-6,049). При пациентите с Т1Д се отчита обратна тенденция за анализирани показатели. Мъжете имат по-високо ниво на случаите с MPV – над 10%, и те са 48 (72,7%). Жените съответно са с това ниво на MPV са 30 (65,5%). Разликата между така съпоставените групи е несигнификантна – $p = 0,385$. Обратната тенденция, която се отчита тук, би била отправна точка за поставяне на хипотезата, че мъжете с Т1Д реагират с повишаване на нивата на MPV над 10%, а жените показват противоположна тенденция спрямо контролните случаи.

Таблица 45. Честотно разпределение на MPV под и над 10fl при мъже и жени

Група участници				MPV над и под 10%		Общ брой/дял	χ^2	P value
				под 10%	над 10%			
Контролна група	Пол	Мъже	брой	12	21	33	1,211	0,271
			%	36,4%	63,6%	100,0%		
	Жени	брой	6	20	26			
		%	23,1%	76,9%	100,0%			
	Общ брой/дял	брой	18	41	59			
		%	30,5%	69,5%	100,0%			
Пациенти с Т1Д	Пол	Мъже	брой	18	48	66	0,755	0,385
			%	27,3%	72,7%	100,0%		
	Жени	брой	20	38	58			
		%	34,5%	65,5%	100,0%			
	Общ брой/дял	брой	38	86	124			
		%	30,6%	69,4%	100,0%			

6.2. Връзки с OPG и ADMA

В таблици 46 и 47 са представени корелационни зависимости между OPG, ADMA и хематоморфологични показатели. Представени са и ранговите стойности на всеки корелационен коефициент и посоката на взаимодействие между променливите. Абсолютната стойност на ранга се определя от силата на връзката на установената корелация, която е в три степени: до 0,30 е с ранг 1 – това е слаба сила на взаимодействие между тестваните променливи; от 0,30 до 0,70 е средна по сила на взаимодействие и е с ранг 2; над 0,70 силата на взаимодействието е определена като силна и съответно рангът е 3. Пред ранга се поставят знакът „+“ или „-“ в зависимост от това дали посоката е положителна или отрицателна, а там, където няма сигнификантна корелация, рангът е 0.

Не се установиха сигнификантни корелационни зависимости между ADMA, OPG и левкоцитните показатели. В таблица 46 са представени корелационни зависимости между OPG, ADMA и еритроцитни показатели. В групата на контролите се отчитат три сигнификантни корелации, които са отрицателни и слаби по сила – с ранг -1: между OPG и MCHC ($r = -0,261$, $p = 0,057$) и между ADMA и: Hb ($r = -0,290$, $p = 0,033$), MCHC ($r = -0,268$, p

= 0,050). При случаите с Т1Д се установяват две сигнификантни корелации при OPG и те са отрицателни и слаби по сила – с ранг -1: с Hb ($r = -0,207$, $p = 0,027$), с MCHC ($r = -0,187$, $p = 0,048$). Между ADMA и еритроцитни показатели не се отчитат сигнификантни връзки. (табл. 46)

Таблица 46. Зависимости между OPG, ADMA и еритроцитни показатели

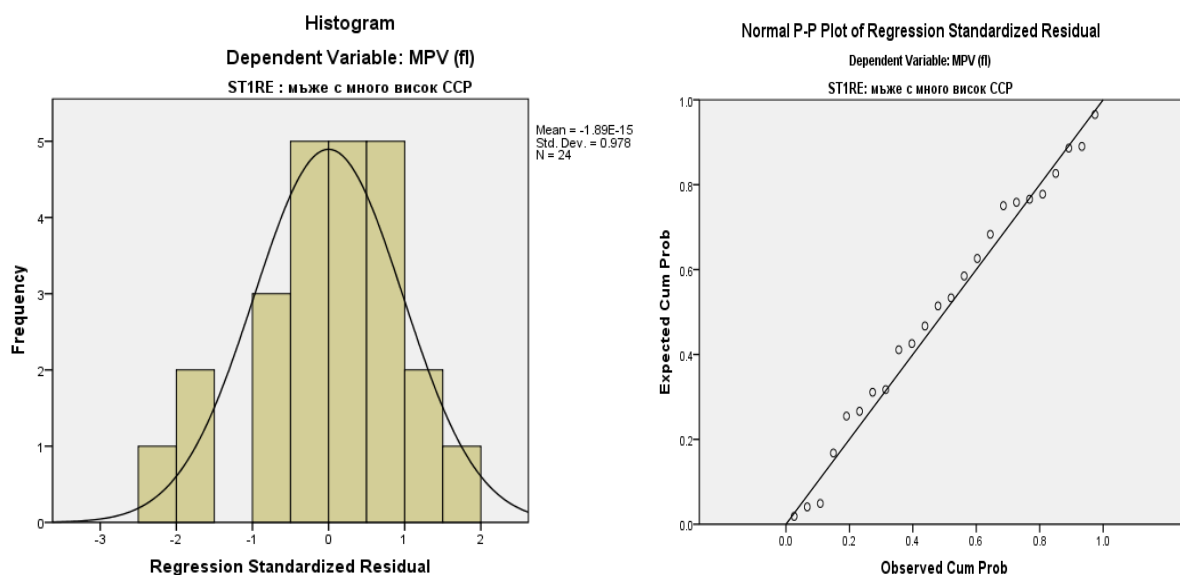
Контролна група		OPG (pmol/l)	Ранг – посока на корелация	ADMA (μmol/l)	Ранг – посока на корелация
Hb (g/l)	Pearson Correlation	-0,231	0	-0,290	-1
	P value	0,093		0.033	
	Брой	54		54	
RBC 10¹²/L	Pearson Correlation	-0,157	0	-0,156	0
	P value	0,256		0.260	
	Брой	54		54	
HCT L/L	Pearson Correlation	-0.153	0	-0,220	0
	P value	0,270		0.110	
	Брой	54		54	
MCV fl	Pearson Correlation	0.050	0	-0,025	0
	P value	0,718		0.858	
	Брой	54		54	
MCH pg	Pearson Correlation	-0,100	0	-0.160	0
	P value	0,474		0.248	
	Брой	54		54	
MCHC g/l	Pearson Correlation	-0,261	-1	-0.268	-1
	P value	0,057		0.050	
	Брой	54		54	
RDW-CV%	Pearson Correlation	0,190	0	0,130	0
	P value	0,169		0,350	
	Брой	54		54	
Група с Т1Д		OPG (pmol/l)	Ранг – посока на корелация	ADMA (μmol/l)	Ранг – посока на корелация
Hb (g/l)	Pearson Correlation	-0,208	-1	0,002	0
	P value	0,027		0,982	
	Брой	113		114	
RBC 10¹²/L	Pearson Correlation	-0,158	0	0,007	0
	P value	0,096		0,943	
	Брой	113		114	
HCT L/L	Pearson Correlation	-0,153	0	0,045	0
	P value	0,103		0,631	
	Брой	113		114	
MCV fl	Pearson Correlation	0,024	0	0,077	0
	P value	0,797		0,417	
	Брой	113		114	
MCH pg	Pearson Correlation	-0,072	0	-0,050	0
	P value	0,445		0,597	
	Брой	113		114	
MCHC g/l	Pearson Correlation	-0,187	-1	-0,012	0
	P value	0,048		0,900	
	Брой	113		114	
RDW-CV%	Pearson Correlation	0,102	0	-0,132	0
	P value	0,284		0,160	
	Брой	113		114	
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).					
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).					

В таблица 47 са представени корелационни зависимости между OPG, ADMA и тромбоцитни показатели. При изследваните от контролната група се установява само една значима корелация между OPG и PCT и тя е положителна и слаба по сила: $r = 0,290$, $p = 0,056$.

При пациентите с Т1Д, ADMA взаимодейства сигнификантно с MPV, като корелацията е отрицателна и слаба по сила: $r = -0,188$, $p = 0,045$. Наблюдаваната корелация между OPG и PCT тук отново е положителна ($r = 0,166$, $p = 0,101$), но не е значима. При ADMA ($\mu\text{mol/l}$) като независима променлива е приложен линеен регресионен анализ със зависима променлива – MPV(fl). Регресионен модел със статистическа значимост се установи спрямо ST1RE при мъже с много висок ССР: $F = 6,666$, $p = 0,017$, при $a = 11,638$, $p = 0,000$ и $b = -1,616$, $p = 0,017$. Намереното уравнение за връзката между променливите е:

$$\text{MPV (fl)} = 11,638 - 1,616 \cdot \text{ADMA } (\mu\text{mol/l})$$

Стойността на adjusted R^2 е 0,198, което показва, че 19,8% от измененията в MPV при мъже с много висок ССР според ST1RE, могат да се обяснят от представения регресионен модел. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е голяма или по-голяма от типичната големина на ефекта. (фиг. 41)



Фигура 41. Стандартизирани графики на остатъчни членове

Таблица 47. Корелационните зависимости между OPG, ADMA и тромбоцитни показатели

Контролна група		OPG (pmol/l)	Ранг – посока на корелация	ADMA (µmol/l)	Ранг – посока на корелация
MPV fL	Pearson Correlation	0.005	0	-0,114	0
	P value	0,969		0.413	
	Брой	54		54	
PDW fL	Pearson Correlation	0.191	0	-0,046	0
	P value	0.214		0.765	
	Брой	54		54	
P-LCR %	Pearson Correlation	0,216	0	-0,054	0
	P value	0.159		0.726	
	Брой	54		54	
PCT %	Pearson Correlation	0.290	+1	0.164	0
	P value	0.056		0.287	
	Брой	54		54	
PLT x10⁹/L	Pearson Correlation	0,193	0	0,109	0
	P value	0.163		0.432	
	Брой	54		54	
Група с Т1Д		OPG (pmol/l)	Ранг – посока на корелация	ADMA (µmol/l)	Ранг – посока на корелация
MPV fL	Pearson Correlation	-0,078	0	-0,188	-1
	P value	0,411		0,045	
	Брой	113		114	
PDW fL	Pearson Correlation	0,078	0	-0,122	0
	P value	0,440		0,227	
	Брой	113		114	
P-LCR %	Pearson Correlation	0,064	0	-0,127	0
	P value	0,527		0,208	
	Брой	113		114	
PCT %	Pearson Correlation	0,166	0	-0,119	0
	P value	0,101		0,240	
	Брой	113		114	
PLT 10⁹/L	Pearson Correlation	0,102	0	-0,058	0
	P value	0,283		0,539	
	Брой	113		114	
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).					
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).					

6.3. Връзки със ST1RE, ESC от 2019 г. и Riskfactor3

С помощта на корелационния коефициент на Пирсън беше анализирана линейната връзка между изследваните хематологични показатели и ST1RE. В таблица 46 са представени корелационните коефициенти на променливи с отчетена значимост и такива с близки до сигнификантната: с Ly ($r = -0,153$, $p = 0,089$); Hb ($r = -0,142$, $p = 0,116$); RBC ($r = -0,224$, $p = 0,012$); PDW ($r = 0,190$, $p = 0,048$); P-LCR ($r = 0,154$, $p = 0,109$), MPV ($r = 0,138$, $p = 0,128$), PLT ($r = -0,129$, $p = 0,152$). Важно е да се отбележи, че по отношение на еритроцитните променливи намерените корелации са отрицателни. При тромбоцитните променливи от една страна се

регистрира обратна зависимост на ST1RE с броя на PLT, а от друга – пропорционална анизоцитоза на PLT. (табл. 48)

Таблица 48. Корелационните зависимости между ST1RE и избрани показатели от кръвната картина

		Lym 10⁹/L	RBC x10¹²/L	Hb g/l	MPV fL	PDW fL	P-LCR %	PLT x10⁹/L
ST1RE	Pearson Correlation	-0,153	-0,224*	-0,142	0,138	0,190	0,154	-0,129
N(124)	P value	0,089	0,012	0,116	0,128	0,048	0,109	0,152
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).								
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).								

В таблица 49 са представени корелационните коефициенти на връзки между хематоморфологичните показатели и ESC от 2019 г.: Ва ($r = -0,174$, $p = 0,053$); Hb ($r = -0,125$; $p = 0,167$); HCT ($r = -0,139$, $p = 0,124$); RBC ($r = -0,138$, $p = 0,126$); MPV ($r = 0,107$, $p = 0,236$). Намерените корелации с Hb, RBC и HCT тук не са значими, но по аналогия със ST1RE отново са с обратна посока. Предполага се, че при по-голям брой изследвани вероятно ще бъдат статистически значими. При тромбоцитните променливи тук е включен и MPV.

Таблица 49. Корелации между ESC от 2019 г. и избрани показатели от кръвната картина

		Ва x10⁹/L	RBC x10¹²/L	Hb g/L	HCT L/L	MPV fL
ESC от 2019 г.	Pearson Correlation	-0,174	-0,125	-0,139	-0,138	0,107
N (124)	P value	0,053	0,167	0,124	0,126	0,236
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).						
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)						

С помощта на корелационния коефициент на Пирсън беше измерена и оценката на линейната връзка между анализираниите хематологични показатели и предложения модел RiskFactor3. В таблица 50 са представени корелационните коефициенти на редица променливи с отчетена значимост или близка до сигнификантната: WBC ($r = 0,200$, $p = 0,026$); Neu $r = 0,194$, $p = 0,031$), Мо ($r = 0,162$, $p = 0,073$); Hb ($r = -0,265$, $p = 0,003$); HCT ($r = -0,145$, $p = 0,108$); MCV ($r = -0,212$, $p = 0,018$); MCH ($r = -0,268$, $p = 0,003$); MCHC ($r = -0,197$, $p = 0,028$); RDW ($r = 0,138$, $p = 0,126$); PCT ($r = 0,228$, $p = 0,017$); PLT ($r = 0,190$, $p = 0,035$). При левкоцитните променливи се установява пропорционална левкоцитоза с увеличаване броя на РФ, дефинирани като групи 0, 1, 2 и 3 според RiskFactor3.

Таблица 50. Корелации между RiskFactor3 и избрани хематологични показатели

		WBC 10 ⁹ /L	Ba 10 ⁹ /L	Mo 10 ⁹ /L	Hb g/l	HCT L/L	MCV fl	MCH pg	MCHC g/l	RDW- CV%	PCT %	PLT x10 ⁹ /L
RF3	Pearson Correlation	0,200	0,194	0,162	- 0,265	- 0,145	- 0,212	- 0,268	- 0,197	0,138	0,228	0,190
N (124)	P value	0,026	0,031	0,073	0,003	0,108	0,018	0,003	0,028	0,126	0,017	0,035
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).												
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)												

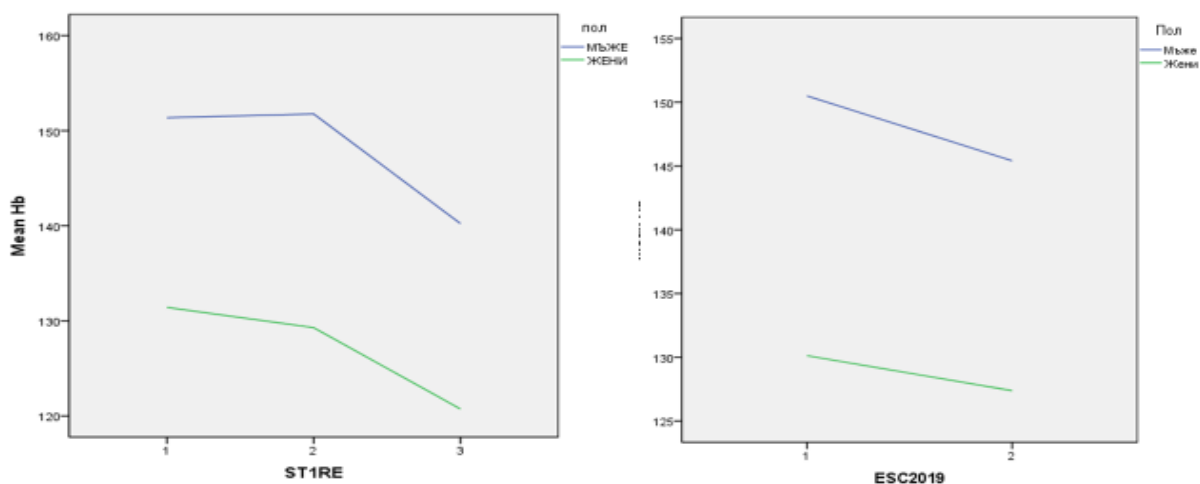
6.4. Анемия и ССР при лица с дългогодишен Т1Д

В таблица 51 е представено разпределение на участниците в изследването в зависимост от наличието или не на анемия. В групата на Т1Д 20,7% от жените имат анемия и 16,7% от мъжете, а в групата на контролите: 15,4% от жените и 9,1% от мъжете имат анемия. Прави впечатление, че докато делът на жените в двете изследвани групи е сходен с превес при Т1Д, то при мъжете същият е почти двоен. (табл. 41)

Таблица 51. Анемия при мъже и жени от контролна и клинична група

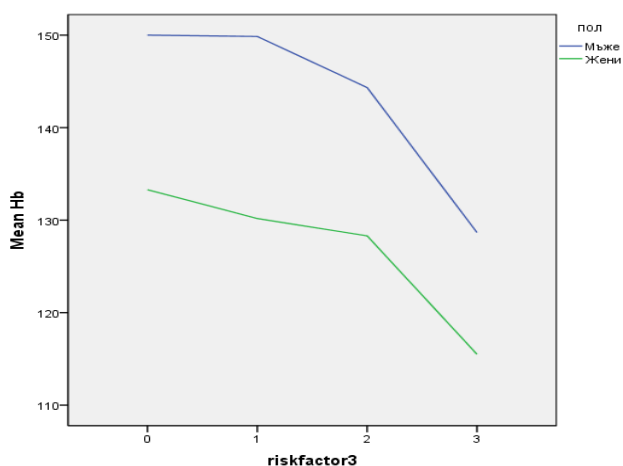
		Брой	Дял %
Анемия Жени с Т1Д	Да	12	20,7
	Не	46	79,3
	Общо	58	100
Анемия Здрави жени	Да	4	15,4
	Не	22	84,6
	Общо	26	100
Анемия Мъже с Т1Д	Да	11	16,7
	Не	55	83,3
	Общо	66	100
Анемия Здрави мъже	Да	3	9,1
	Не	30	90,9
	Общо	33	100

На фигура 42 са представени линейни графики със средноаритметичните нива на Hb при мъже и жени с Т1Д в зависимост от категорията на ССР, дефинирана според ST1RE и ESC от 2019 г. (фиг. 42).



Фигура 42. Тенденция за анемия (средна концентрация на Hb g/l) при мъже и жени според ST1RE и ESC от 2019 г.

На фигура 43 е представена линейна графика на средноаритметичните стойности на Hb (g/l) при мъже и жени с Т1Д в зависимост от групата на RiskFactor3. Установената тенденция за анемия тук е най-демонстративна. (фиг. 43)



Фигура 44. Тенденция за анемия (средна концентрация на Hb g/l) при мъже и жени според Riskfactor3

В таблица 49 са представени средноаритметичните нива на Hb (g/l) при пациенти с дългогодишен Т1Д в зависимост от категорията на ССР, оценен по моделите на ST1RE и ESC от 2019 г. Намерено е статистически значимо различие в средните нива на Hb след приложение на еднофакторен дисперсионен анализ при ST1RE за мъже: $F = 5,50$, $p = 0,006$. В групата на мъжете с нисък ССР средноаритметичната стойност за Hb е $151,37 \pm 11,092$ g/l; с умерен ССР – $151,76 \pm 13,989$ g/l, и с висок ССР – $140,23 \pm 14,825$ g/l. След приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey), тази разлика остана сигнификантна между мъжете с нисък и изследваните с висок ССР (MD = 11,138 g/l, $p = 0,023$) и между мъжете с умерен и тези с висок ССР (MD =

11.531 g/l, $p = 0,014$). При жените регистрираното различие не достигна статистическа значимост: 131,41 ±16,306 g/l за жени с нисък ССР; 129,29 ±12,869 g/l за жени с умерен риск и 120,73 ±15,059 g/l за жени с висок риск ($F = 2,48$, $p = 0,093$). След приложение на t-тест за независими извадки на Стюдънт не се установи статистическо различие в средните нива на Hb между така съпоставените групи според ESC от 2019 г. при мъже ($t = 1,354$, $p = 0,181$) и жени ($t = 0,594$, $p = 0,555$). (табл. 52)

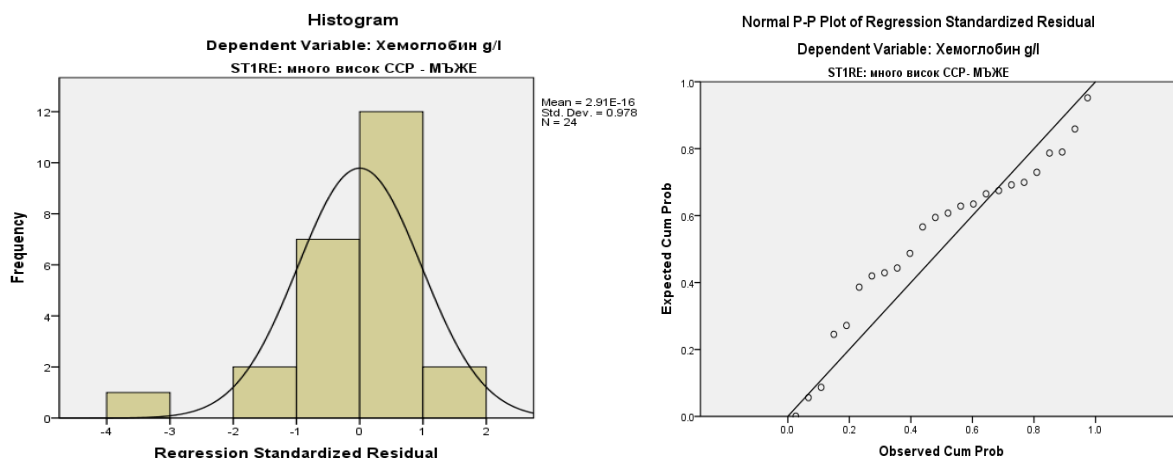
Таблица 52. Средноаритметични стойности за Hb(g/l) при мъже и жени според ST1RE и ESC от 2019 г.

	Нисък ССР Hb (g/l)	(Умерено) висок ССР Hb (g/l)	(Много) висок ССР Hb (g/l)	F / t	P value
ST1RE мъже	151,37 ± 11,092	151,76 ± 13,989	140,23 ± 14,825	5,50	0,006
ST1RE жени	131,41 ± 16.306	129,29 ± 12,869	120,73 ± 15,059	2,48	0,093
ESC 2019 г. мъже	/	150.50 ± 10.359	145,41 ± 16.008	1,354	0,181
ESC 2019 г. жени	/	130.13 ± 16.141	127,38 ± 15.563	0.594	0,555

При Riskfactor3 е приложен еднофакторен дисперсионен анализ, който отново демонстрира наблюдаваната тенденция за анемия при лицата с Т1Д. Статистически значимо различие се установи при мъжете: 148,25 ±12,209 g/l за група 0, 150,74 ±14,047 g/l за група 1, 144,33 ±14,493 g/l за група 2 и 128,67 ±10,786 g/l за група 3 ($F = 2,792$, $p = 0,048$). След приложение на постхок тест на Туки тази разлика се оказва значима между мъжете от група 1 и група 3 ($MD = 22,075$, $p = 0,052$). При жените се отчитат следните резултати за Hb: 134,60 ±10,213 g/l за група 0, 130,04 ±15,392 g/l за група 1, 127,63 ±16,067 g/l за група 2 и 115,50 ±15,437 g/l за група 3 ($F = 1,811$, $p = 0,156$).

С цел да се установи линейната комбинация между серумните нива на OPG и стойността на Hb при различните категории ССР според ST1RE е приложен линеен регресионен анализ. Регресионен модел със статистическа значимост се установи при мъжете с висок ССР според ST1RE: $F = 7,409$, $p = 0,012$. Регресионната константа $a = 11,673$, $p = 0,000$ и регресионният коефициент $b = -0,41$, $p = 0,012$ са също статистически значими. Намереното уравнение за връзката между променливите е: **Hb (g/l) = 11,673–0,041.OPG (pmol/l)**

Стойността на adjusted R^2 е 0,218, което показва, че 21,8% от измененията в Hb концентрация при мъже с висок ССР според ST1RE могат да се обяснят от представения регресионен модел. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е голяма или по-голяма от типичната големина на ефекта. (фиг. 44)

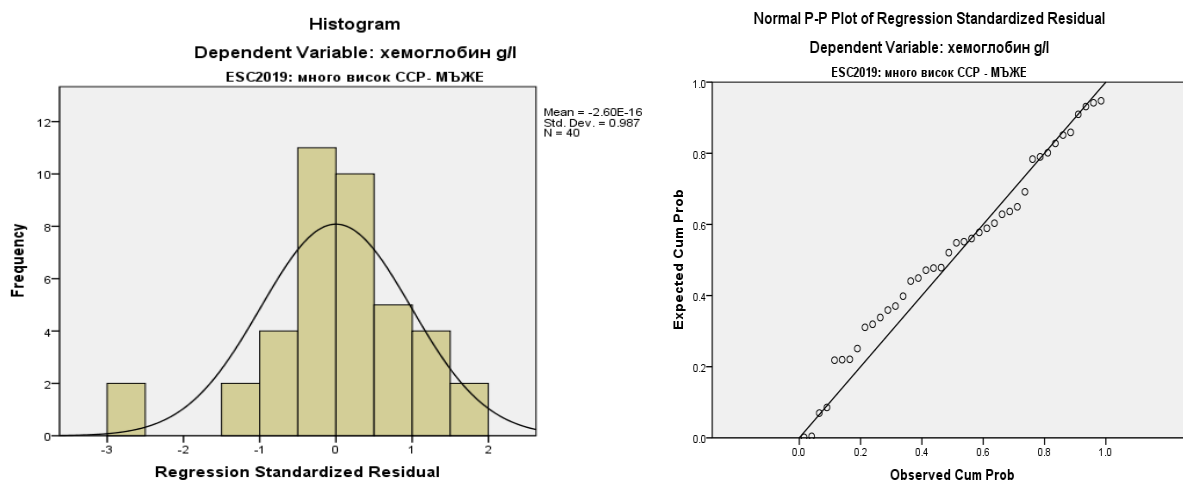


Фигура 44. Стандартизирани графики на остатъчни членове при STIRE

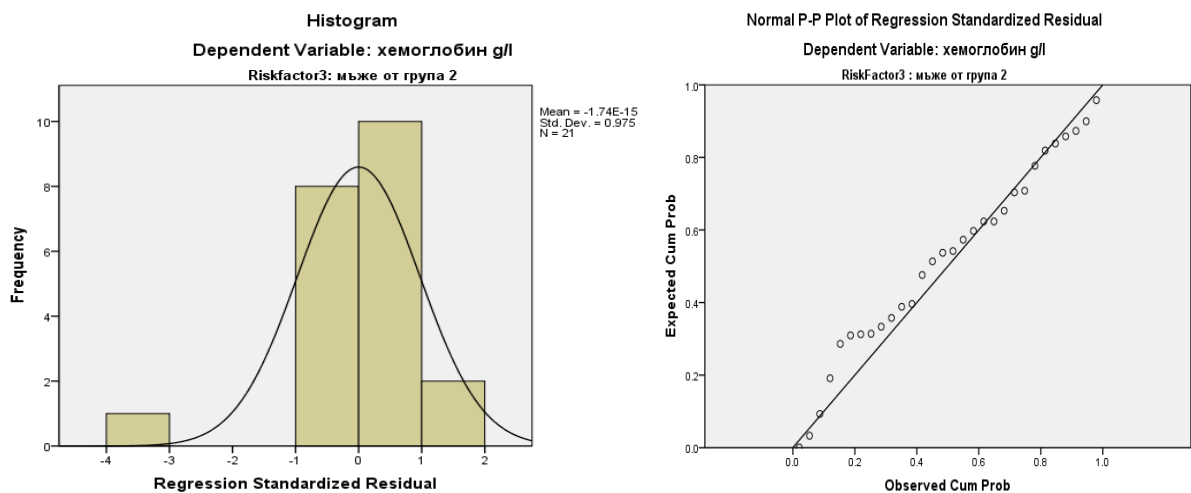
С цел да се установи линейната комбинация между серумните нива на OPG и стойността на Hb при различните категории ССР според ESC от 2019 г. е приложен линеен регресионен анализ. Модел със статистическа значимост се установи отново при мъжете с много висок ССР: $F = 7,213$, $p = 0,011$ при $a = 9,861$, $p = 0,000$ и $b = -0,031$, $p = 0,011$. Намереното уравнение за връзката между променливите е: $Hb (g/l) = 9,861 - 0,031 \cdot OPG (pmol/l)$.

Стойността на adjusted R^2 е 0,137, което показва, че 13,7% от измененията в Hb концентрация при мъже с много висок ССР според ESC 2019 г. могат да се обяснят от представения регресионен модел. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е средна или типична големина на ефекта. (фиг. 45)

Регресионен модел със статистическа значимост спрямо Riskfactor3 се установи при мъжете от група 2: $F = 7,141$, $p = 0,015$ при $a = 12,381$, $p = 0,000$ и $b = -0,047$, $p = 0,015$. Намереното уравнение за връзката между променливите е: $Hb (g/l) = 12,381 - 0,047 \cdot OPG (pmol/l)$



Фигура 45. Стандартизирани графики на остатъчни членове при ESC от 2019 г.



Фигура 46. Стандартизирани графики на остатъчни членове при RiskFactor3

Стойността на adjusted R² е 0,235, което показва, че 23,5% от измененията в Hb (g/l) при мъже от група 2 според Riskfactor3 могат да се обяснят от представения регресионен модел. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е голяма или по-голяма от типичната големина на ефекта. (фиг. 46)

С цел да се установи линейната комбинация между серумните нива на ADMA и стойността на Hb при различните категории ССР също е приложен линеен регресионен анализ, но не се установиха регресионни модели със статистическа значимост.

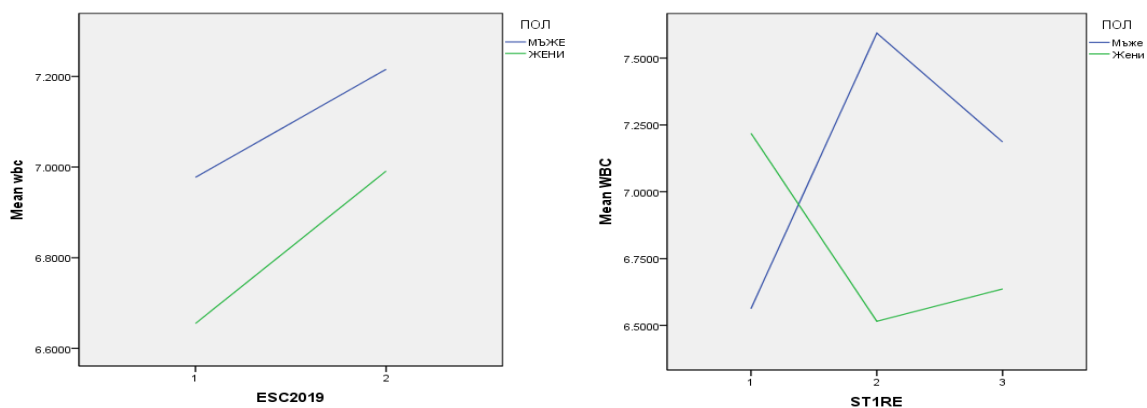
6.5. Левкоцитоза и ССР при пациенти с дългогодишен Т1Д

В таблица 53 са представени средноаритметичните стойности за WBC при мъже и жени в зависимост от категорията на ССР според ST1RE и ESC от 2019 г. Не се установи статистически значима разлика между така съпоставените групи. При ST1RE тя е F = 1,550, p = 0,220 за мъже и F = 0,785 p = 0,461 за жени. При ESC от 2019 г. – t = -0,484, p = 0,157 за мъже и t = -0,582, p = 0,412 за жени. (табл. 53)

Таблица 53. Средноаритметични стойности за WBC при мъже и жени според ST1RE и ESC 2019 г.

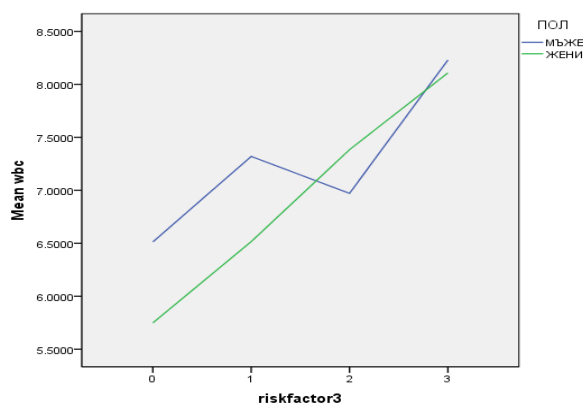
	Нисък ССР: WBC 10 ⁹ /L	(Умерено) висок ССР: WBC 10 ⁹ /L	(Много) висок ССР: WBC 10 ⁹ /L	F / t	P value
ST1RE мъже	6,562 ± 2,065	7,593 ± 1,683	7,186 ± 11,834	1,550	0,220
ST1RE жени	7,219 ± 2,249	6,516 ± 1,832	6,637 ± 1,379	0,785	0,461
ESC от 2019 г. мъже	/	6,977 ± 2,142	7,216 ± 1,745	-0,484	0,157
ESC2019 жени	/	6,655 ± 1,694	6,991 ± 2,058	-0,582	0,412

На фигура 47 са представени линейни графики на средноаритметичните стойности на WBC при мъже и жени с Т1Д в зависимост от категорията на ССР според ST1RE и ESC 2019 г. (фиг. 47)



Фигура 47. Средноаритметични стойности на WBC при мъже и жени с Т1Д според ESC от 2019 г. и ST1RE

При Riskfactor3 е приложен еднофакторен дисперсионен анализ, който демонстрира тенденция за левкоцитоза при пациенти с Т1Д с увеличаване броя на РФ, дефинирани като групи. С близка до сигнификантна значимост разлика се отчете при жените и тя е $F = 2,224$, $p = 0,096$. При мъжете не се установи значимо различие – $F = 0,790$, $p = 0,504$. (фиг. 48)



Фигура 48. Средноаритметични стойности за WBC при мъже и жени с Т1Д според Riskfactor3

Средноаритметични стойности за WBC при мъже и жени с Т1Д в зависимост от дефинирана група според Riskfactor3 са следните: $6,513 \pm 1,778 \cdot 10^9/L$ за група 0; $7,319 \pm 1,969 \cdot 10^9/L$ за група 1; $6,97 \pm 1,77 \cdot 10^9/L$ за група 2 и $8,23 \pm 2,14 \cdot 10^9/L$ за група 3 при мъже и $5,748 \pm 0,944 \cdot 10^9/L$ за група 0; $6,515 \pm 1,797 \cdot 10^9/L$ за група 1; $7,384 \pm 2,189 \cdot 10^9/L$ за група 2 и $8,108 \pm 1,847 \cdot 10^9/L$ за група 3 при жени.

6.6. Връзки с ADNC и Lep

В таблица 52 са представени корелационни зависимости между ADNC, Lep и левкоцити. При контролите се установиха отрицателни и средни по сила корелации между ADNC и: WBC ($r = -0,309$, $p = 0,023$); Mo ($r = -0,301$, $p = 0,027$). Следващата зависимост при ADNC е с Lu, като корелационният коефициент тук е $r = -0,330$, $p = 0,015$. Изброените корелации са с ранг -2. При

пациентите с дългогодишен Т1Д се установи промяна в корелационните зависимости и съответно в ранговете, като тук се регистрираха и нови корелации между Lер и: WBC ($r = 0,177$, $p = 0,068$); Мо ($r = 0,260$, $p = 0,007$) и Ly ($r = 0,0180$, $p = 0,063$). Установи се и отрицателна асоциация между WBC и ADNC, която е средна по сила ($r = -0,248$, $p = 0,009$). Намериха са корелационни зависимости между ADNC и: Neu с ранг -1 ($r = -0,187$, $p = 0,049$); Мо с ранг -1 ($r = -0,247$, $p = 0,009$); Ly с ранг -1 ($r = -0,199$, $p = 0,036$). Между останалите променливи не се отчетоха сигнификантни корелационни зависимости. (табл. 54)

Таблица 54. Корелационните зависимости между ADNC, Lер и левкоцити

Контролна група		ADNC µg/ml	Ранг – посока на корелация	Lер ng/ml	Ранг – посока на корелация
WBC 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,309*		0,097	
	P value	0,023	- 2	0,498	0
	Брой	54		51	
Neu 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,222		0,095	
	P value	0,107	0	0,506	0
	Брой	54		51	
Ео 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,151		0,101	
	P value	0,276	0	0,483	0
	Брой	54		51	
Ва 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	0,012		0,040	
	P value	0,931	0	0,782	0
	Брой	54		51	
Мо 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,301*		0,049	
	P value	0,027	- 2	0,733	0
	Брой	54		51	
Ly 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,330*		0,049	
	P value	0,015	- 2	0,735	0
	Брой	54		51	
Група с Т1Д		ADNC µg/ml	Ранг – посока на корелация	Lер ng/ml	Ранг – посока на корелация
WBC 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,248**		0,177	
	P value	0,009	- 1	0,068	+ 1
	Брой	111		108	
Neu 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,187*		0,121	
	P value	0,049	- 1	0,213	0
	Брой	111		108	
Ео 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,068		-0,032	
	P value	0,479	0	0,741	0
	Брой	111		108	
Ва 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,072		-0,018	
	P value	0,454	0	0,856	0
	Брой	111		108	
Мо 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,247**		0,260**	
	P value	0,009	- 1	0,007	+ 1
	Брой	111		108	
Ly 10 ⁹ /L	Pearson Correlation	-0,199*		0,180	
	P value	0,036	- 1	0,063	+1
	Брой	111		108	

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

В таблица 55 са представени корелациите между еритроцитните показатели и изследваните адипокини. При контролните случаи се установяват три значими корелации между ADNC и: Hb, RBC и HCT. И трите корелации са с ранг -2, отрицателни и средни по сила на взаимодействие ($r = -0,463$, $p = 0,000$ с Hb, $r = -0,302$, $p = 0,026$ с RBC и $r = -0,513$, $p = 0,000$ с HCT. При останалите променливи не се регистрират сигнификантни корелации. При лицата с Т1Д се установяват редица корелационни зависимости между адипокините и анализираниите тук променливи. Корелациите между ADNC са с: Hb – $r = -0,423$, $p = 0,000$; с RBC $r = -0,270$, $p = 0,004$; с HCT – $r = -0,381$, $p = 0,000$; с MCV – $r = -0,262$, $p = 0,005$; с MCH – $r = -0,349$, $p = 0,000$; с MCHC – $r = -0,301$, $p = 0,001$ и с RDW_CV $r = 0,352$, $p = 0,000$. Последният показател е единствената положителна корелация, установена при взаимодействието на еритроцитните показатели с ADNC. При Lep всички установени сигнификантни взаимодействия отново са отрицателни. Понижаването на нивата на еритроцитните показатели се асоциира с повишаване на серумното ниво на Lep. Съответните корелации между Lep са с: Hb – $r = -0,355$, $p = 0,000$; с RBC- $r = -0,257$, $p = 0,007$; с HCT – $r = -0,325$, $p = 0,001$; с MCHC – $r = -0,278$, $p = 0,004$ и с MCH – $r = -0,181$, $p = 0,061$. Последната корелационна зависимост е при 90% достоверност на резултатите. (табл. 55)

Таблица 55. Корелационни зависимости между ADNC, Лер и еритроцитни показатели

Контролна група		ADNC µg/ml	Ранг – посока на корелация	Лер ng/ml	Ранг – посока на корелация
Hb g/L	Pearson Correlation	-0,463**		-0,178	
	P value	0,000	-2	0,212	0
	Брой	54		51	
RBC 10¹²/L	Pearson Correlation	-0,302*		-0,222	
	P value	0,026	-2	0,117	0
	Брой	54		51	
HCT L/L	Pearson Correlation	-0,513**		-0,144	
	P value	0,000	-2	0,313	0
	Брой	54		51	
MCV fl	Pearson Correlation	-0,165		0,116	
	P value	0,233	0	0,418	0
	Брой	54		51	
MCH pg	Pearson Correlation	-0,127		-0,074	
	P value	0,360	0	0,606	0
	Брой	54		51	
MCHC g/L	Pearson Correlation	-0,013		-0,131	
	P value	0,924	0	0,361	0
	Брой	54		51	
RDW_CV %	Pearson Correlation	0,152		-0,149	
	P value	0,273	0	0,297	0
	Брой	54		51	
Група с Т1Д		ADNC µg/ml	Ранг – посока на корелация	Лер ng/ml	Ранг – посока на корелация
Hb g/L	Pearson Correlation	-0,423**		-0,355**	
	P value	0,000	-2	0,000	-2
	Брой	111		108	
RBC 10¹²/L	Pearson Correlation	-0,270**		-0,257**	
	P value	0,004	-1	0,007	-1
	Брой	111		108	
HCT L/L	Pearson Correlation	-0,381**		-0,325**	
	P value	0,000	-2	0,001	-2
	Брой	111		108	
MCV fl	Pearson Correlation	-0,262**		-0,056	
	P value	0,005	-1	0,566	0
	Брой	111		108	
MCH pg	Pearson Correlation	-0,349**		-0,181	
	P value	0,000	-2	0,061	-1
	Брой	111		108	
MCHC g/L	Pearson Correlation	-0,301**		-0,278**	
	P value	0,001	-2	0,004	-1
	Брой	111		108	
RDW_CV %	Pearson Correlation	0,352**		0,153	
	P value	0,000	+2	0,114	0
		111		108	

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

В таблица 56 са представени корелационни зависимости между анализираниите адипокини и тромбоцитните показатели. При изследваните от контролната група не се установиха значими корелационни връзки между нито една от променливите. При пациентите с Т1Д се отчитат две корелационни връзки, слаби по сила и прави по посока: между Lер и PCT - $r = 0,251$, $p = 0,014$; Lер и PLT, $r = 0,165$, $p = 0,088$.(табл.56)

Таблица 56. Корелационни зависимости между ADNC, Lер и тромбоцитни показатели

Контролна група	ADNC µg/ml	Ранг – посока на корелация	Lер ng/ml	Ранг – посока на корелация
MPV fL	Pearson Correlation		0,118	
	P value	0	0,411	0
	Брой		51	
PDW fL	Pearson Correlation		0,045	
	P value	0	0,780	0
	Брой		41	
P-LCR %	Pearson Correlation		0,074	
	P value	0	0,646	0
	Брой		41	
PCT %	Pearson Correlation		0,229	
	P value	0	0,150	0
	Брой		41	
PLT x10 ⁹ /L	Pearson Correlation		0,112	
	P value	0	0,433	0
	Брой		51	
Група с Т1Д	ADNC µg/ml	Ранг – посока на корелация	Lер ng/ml	Ранг – посока на корелация
MPV fL	Pearson Correlation		0,061	
	P value	0	0,528	0
	Брой		108	
PDW fL	Pearson Correlation		0,047	
	P value	0	0,654	0
	Брой		95	
P-LCR %	Pearson Correlation		0,049	
	P value	0	0,640	0
	Брой		95	
PCT %	Pearson Correlation		0,251*	
	P value	0	0,014	+1
	Брой		95	
PLT x10 ⁹ /L	Pearson Correlation		0,165	
	P value	0	0,088	+1
	Брой		108	
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).				
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).				

6.6.1. ADNC – асоциация с анемия и левкоцитоза

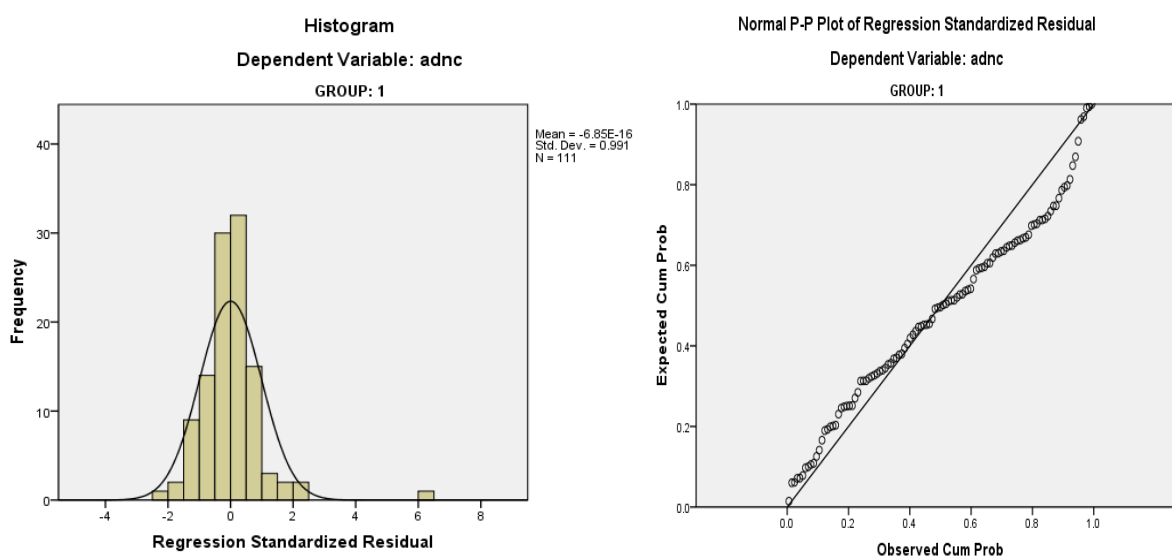
С цел да се установи линейна комбинация между серумните нива на ADNC и хематологичните показатели е приложен множествен линеен регресионен анализ. От

корелационния анализ на левкоцитните показатели се установи значима отрицателна зависимост между WBC и средните нива на ADNC в двете изследвани групи. От друга страна, ADNC категорично потвърди наблюдаваната тенденция при лицата с Т1Д за анемия – микроцитна, хипохромна с данни за анизоцитоза: отчитат се отрицателни корелационни връзки с всички еритроцитни индекси. Следователно отчетени ниски серумни нива на ADNC се асоциират с левкоцитоза и анемия. Ето защо е конструиран модел на множествена линейна регресия с независими променливи – WBC и Hb (g/l). Комбинацията от независимите променливи за прогнозата на серумните нива на ADNC е статистически значима и при двете изследвани групи: $F = 15,561$, $p = 0,000$ при лица с Т1Д и $F = 9,511$, $p = 0,000$ при здрави индивиди. Регресионните константи ($a = 54.599$, $p = 0,000$ при Т1Д и $a = 73,133$, $p = 0,000$ при контроли) и регресионните коефициенти ($b_{Hb} = -0,230$, $b_{WBC} = -1.175$ при Т1Д и $b_{Hb} = -0,358$, $p = 0,000$; $b_{WBC} = -1,849$, $p = 0,014$ при контроли) са също статистически значими. Намерените уравнения за връзката между променливите са:

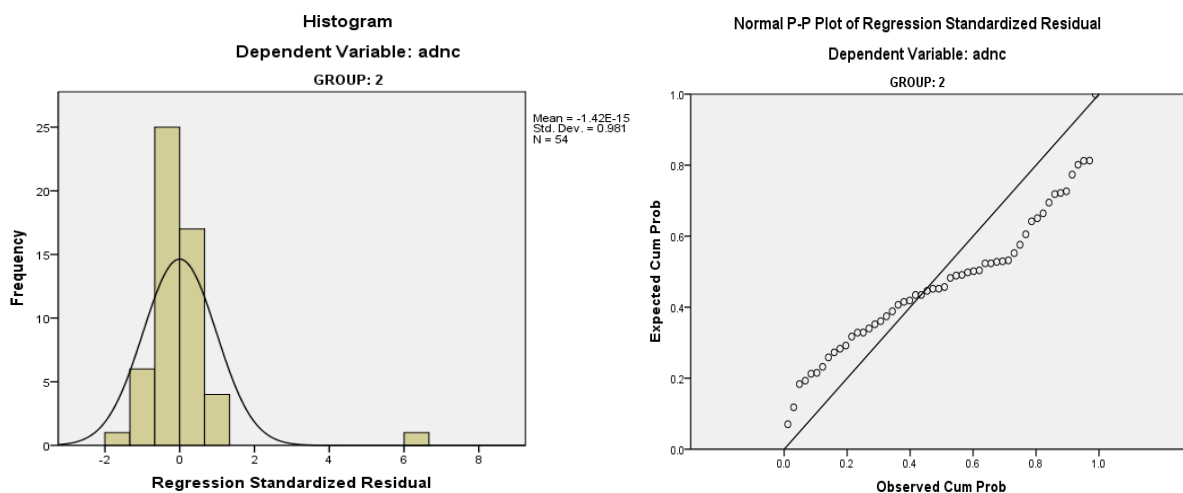
$$\text{ADNC } (\mu\text{g/ml}) = 54.599 - 0,230 \cdot \text{Hb(g/l)} - 1,175 \cdot \text{WBC}(10^9/\text{L}) \text{ при пациенти с Т1Д}$$

$$\text{ADNC } (\mu\text{g/ml}) = 73,133 - 0,358 \cdot \text{Hb(g/l)} - 1,849 \cdot \text{WBC}(10^9/\text{L}) \text{ при здрави индивиди}$$

Стойността на adjusted R^2 е 0,209 за Т1Д и 0,243 за контролна група. Следователно при лицата с Т1Д – 21%, и при здравите индивиди – 24% от измененията в серумните нива на ADNC могат да се обяснят от представените регресионни модели. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е голяма или по-голяма от типичната големина на ефекта. За проверка на ключовата предпоставка на множествения регресионен анализ за хомогенност на дисперсията са представени стандартизирани графики за остатъчни членове. (фиг. 49,50)



Фигура 49. Стандартизирани графики за остатъчни членове при лица с дългогодишен Т1Д



Фигура 50. Стандартизирани графики за остатъчни членове при контроли

Последващ регресионен анализ за установяване на линейна комбинация от променливите Hb (g/l) и WBC ($10^9/L$) за прогноза на серумните нива на ADNC ($\mu g/ml$) в зависимост от категорията на ССР според ST1RE показва статистическа значимост при мъже с умерен риск и жени с нисък ръст: $F = 11,289$, $p = 0,001$ и $F = 6,108$, $p = 0,007$. Намерените коефициенти на детерминация са съответно $adjusted R^2 = 0,548$ и $adjusted R^2 = 0,290$.

При ESC от 2019 г. посочената линейна комбинация от променливи за прогноза на серумните нива на ADNC при мъже с висок риск е $F = 3,618$, $p = 0,052$, а при мъже с много висок риск е $F = 3,151$, $p = 0,055$. За жени статистическа значимост има при изследваните с много висок риск: $F = 3,887$, $p = 0,030$. Намерените коефициенти на детерминация са съответно $adjusted R^2 = 0,235$, $adjusted R^2 = 0,102$ и $adjusted R^2 = 0,132$.

При Riskfactor3 така конструиран регресионен модел със статистическа значимост се отчита при мъже от група 1 ($F = 4,883$, $p = 0,016$) и при жени от група 0 ($F = 14,690$, $p = 0,064$) и 2 ($F = 4,846$, $p = 0,025$). Намерените коефициенти на детерминация са съответно $adjusted R^2 = 0,217$, $adjusted R^2 = 0,873$ и $adjusted R^2 = 0,325$.

6.6.2. Lер – асоциация с анемия, левкоцитоза и тромбоцитоза

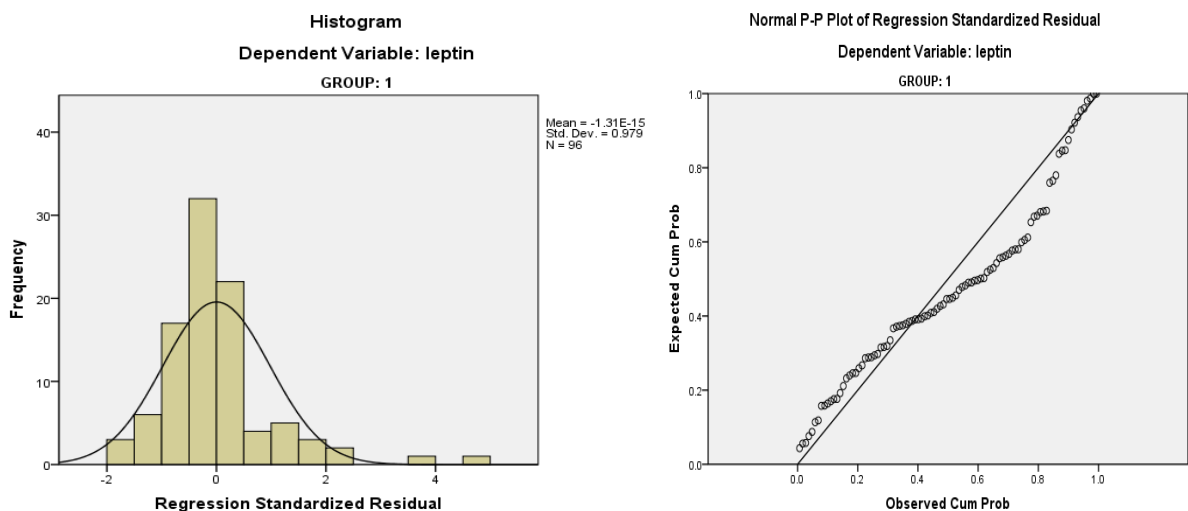
От корелационния анализ на хематоморфологичите показатели се установиха редица сигнификантни връзки със средните нива на Lер в двете изследвани групи. Високите серумни нива на Lер, от една страна, се асоциират с тенденция за микроцитна, хипохромна анемия по аналогия на установените връзки с ADNC, а от друга страна – с левкоцитоза. Конструиран е модел на множествена линейна регресия с независими променливи – WBC, Hb, PCT и PLT. Комбинацията от независимите променливи за прогнозата серумните нива на Lер е статистически значима при лицата с T1Д: $F = 6,151$, $p = 0,000$ спрямо $F = 1,058$, $p = 0,391$ при контроли. Регресионната константа ($a = 17,157$, $p = 0,010$) и регресионните коефициенти (b_{Hb}

= -0,122, $p = 0,001$, $b_{wbc} = 0,852$, $p = 0,014$, $b_{PLT} = -0,043$, $p = 0,059$) са също статистически значими. Регресионният коефициент $b_{PCT} = 38,047$, $p = 0,131$ е статистически незначим и затова не е включен в намереното уравнение за връзката между променливите:

$$\text{Lep(ng/ml)} = 17,157 - 0,122 \cdot \text{Hb (g/l)} + 0,852 \cdot \text{WBC (10}^9/\text{L)} - 0,043 \cdot \text{PLT (10}^9/\text{L)}$$

Стойността на adjusted R^2 е 0,178. Следователно при лицата с Т1Д 17,8% от измененията в серумните нива на Lep могат да се обяснят от представения регресионен модел. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е средна или типична големина на ефекта.

За проверка на ключовата предпоставка на множествения регресионен анализ за хомогенност на дисперсията е представена стандартизирана графика за остатъчни членове. Остатъчният член е с нормално разпределение и предпоставката за хомогенност на дисперсията не е нарушена – „дебелата“ линия лежи близо до тънкия диагонал. (фиг. 51)



Фигура 51. Стандартизирани графики за остатъчни членове при лица с Т1Д

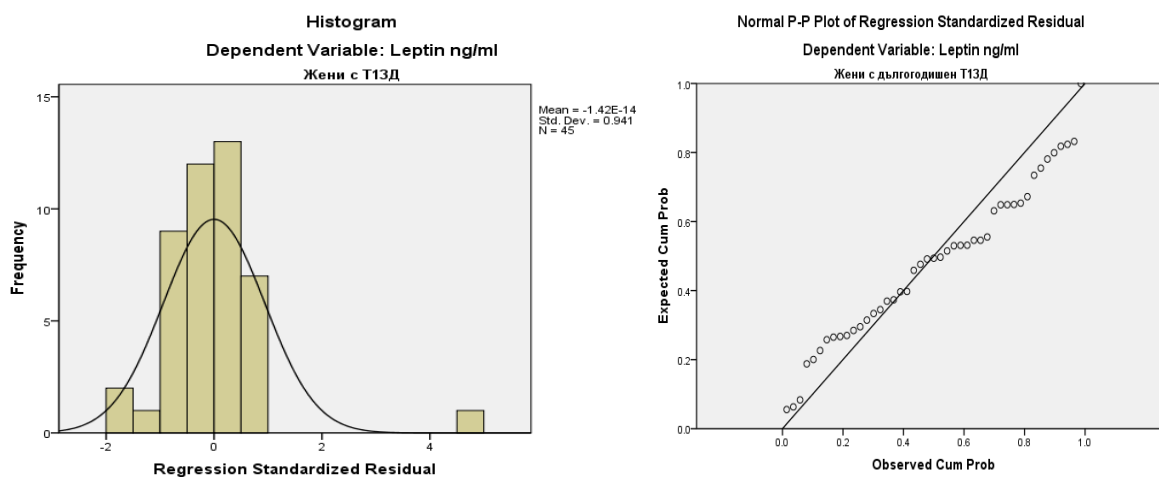
Последващ регресионен анализ за установяване на линейна комбинация от променливите Hb концентрация, общ брой на WBC и PLT за прогноза на серумните нива на Lep в зависимост от категорията на ССР според ST1RE показва статистическа значимост при мъже с висок риск и жени с умерен риск: $F = 2,875$, $p = 0,062$ и $F = 4,934$, $p = 0,009$. Намерените коефициенти на детерминация са съответно adjusted $R^2 = 0,197$ и adjusted $R^2 = 0,321$.

При ESC от 2019 г. посочената линейна комбинация от променливи за прогноза на серумните нива на Lep показва статистическа значимост при мъже и жени с много висок риск ($F = 3,871$, $p = 0,017$, $F = 3,148$, $p = 0,038$). Намерените коефициенти на детерминация са съответно adjusted $R^2 = 0,189$, adjusted $R^2 = 0,148$. При RiskFactor3 не се установи комбинация със статистическа значимост.

От изследваните четири биомаркера, Lep се асоциира най-силно с тромбоцитните индекси при лицата с дългогодишен Т1Д. Комбинацията от MPV, PDW, PCT, P-LCR и PLT за прогнозата на серумните нива на Lep е статистически значима при жени с Т1Д: $F = 3,877$, $p = 0,006$. Регресионната константа $a = 133,856$, $p = 0,010$ и регресионните коефициенти $b_{MPV} = -2,923$, $p = 0,006$, $b_{PDW} = 1,383$, $p = 0,026$, $b_{PCT} = 2,369$, $p = 0,023$, $b_{PLT} = -2,224$, $p = 0,032$ също са статистически значими с изключение на b_{P-LCR} . Намереното уравнение за връзката между променливите е:

$$\text{Lep (ng/ml)} = 133,856 - 2,923 \cdot \text{MPV(fL)} + 1,383 \cdot \text{PDW(fL)} + 2,369 \cdot \text{PCT\%} - 2,224 \cdot \text{PLT} \cdot 10^9/\text{L}$$

Стойността на $\text{adjusted } R^2$ е 0,246, което показва, че 24,6% от измененията в лептиновата концентрация при жени могат да се обяснят от представения регресионен модел. Съгласно Коен (Cohen, 1988) това е голяма или по-голяма от типичната големина на ефекта. (фиг. 52)



Фигура 52. Стандартизирани графики за остатъчни членове при лица с Т1Д

Регресионен модел със статистическа значимост се отчита при зависима променлива Lep (ng/ml) и независими променливи – MPV, PDW, PCT, P-LCR, PLT, спрямо ESC от 2019 г. при жени с много висок ССР ($F = 3,464$, $p = 0,016$). Стойността на $\text{adjusted } R^2$ е 0,284.

VI. ДИСКУСИЯ

1. Оценка на ССР според насоките на ESC от 2019 г. и ST1RE при лица с дългогодишен Т1Д

Стратификацията на риска от ССЗ при пациенти с Т1Д има важно клинично значение, което предполага различни терапевтични стратегии. Калкулаторите за оценка на ССР използват математически уравнения, в които залягат определени комбинации от фактори. При изчисляване на ССР за общата популация, ЗД е представен като дихотомна променлива (да/не) и следователно поставя пациентите с Т1Д винаги в по-висока категория на риска. [10] ADA препоръчва прилагането на алгоритми, които отчитат специфични за Т1Д рискови фактори и служат като инструмент за оценка на риска от ССЗ. [28]

Настоящото интердисциплинарно проучване е първото проведено в България, което оценява риска от ССЗ според критериите на специфични скали – ST1RE и ESC от 2019 г. при лица с дългогодишен Т1Д без регистрирано предходно или придружаващо ССЗ.

В проучването се установи, че 61,3% от изследваните 124 пациенти с Т1Д попадат в категорията на умерен до висок ССР според калкулатора ST1RE. Предвид отчетената средната давност на диабета от $25,3 \pm 8,224$ години всички пациенти са определени като високорискови (30,6% с висок ССР и 69,4% с много висок ССР) съгласно критериите на ESC от 2019 г. Следователно намерената честота на висок ССР при лица с дългогодишен Т1Д е в съответствие с установената от редица изследователи. [49,58,118,158,169,206,232]

При разглеждане на рисковите групи според половата принадлежност се установи значима разлика само при ST1RE - $\chi^2 = 5,943$, $p = 0,051$. Подгруповият анализ показва, че мъжете с Т1Д имат значимо по-висок изчислен ССР спрямо жените: 71,2% от мъжете спрямо 50% от жените имат умерен към висок риск. В противовес на нашите резултати, една част от проучванията, които се срещат в литературата, не откриват междуполови различия при стратифициране риска за лицата с Т1Д [58], а според други по-висок ССР е докладван при жените. Според данни на метаанализ от 2015 година, включващ 214 114 лица, жените с Т1Д имат приблизително 40% по-висок риск от обща смъртност и два пъти по-висок риск от фатални и нефатални съдови събития спрямо мъжете с Т1Д. [112]

През 2021 година Colom C. и сътр. публикуват резултати от епидемиологични проучвания, които показват, че честотата на ССЗ е много по-висока при жените с Т1Д. Относителният риск от ССЗ при жените, коригиран спрямо възрастта, е 4 до 10 пъти по-висок от този при мъжете. [58] Възможно обяснение за наблюдаваните междуполови различия в изследваната от нас кохорта спрямо описаните в литературата данни са характерни

популационни особености на извадката, разлики в географското разпределение, социален статус и методологични характеристики на анализирани показатели.

2. Прогностична стойност на ADMA за оценка на ССР при Т1Д

2.1. ADMA – възрастово и полово обусловени разлики

В настоящото проучване не се констатира статистически значима междугрупова разлика в серумните нива на ADMA, каквато се цитира в повечето литературни източници в полза на лицата с дългогодишен Т1Д. Установената от нас разлика между половете и в двете изследвани групи е несигнификатна, но правят впечатление отчетените по-високи стойности при жените: $0,54 \pm 0,24 \mu\text{mol/l}$, $0,52 \pm 0,27 \mu\text{mol/l}$ при Т1Д спрямо $0,61 \pm 0,14 \mu\text{mol/l}$ vs $0,54 \pm 0,21 \mu\text{mol/l}$ при контроли. В изследването на Денева Т. и сътр. (2011) са изведени референтни граници на ADMA в плазма чрез ELISA метод сред 150 здрави лица на възраст 18–65 г. [67] В съответствие с получените от нас резултати изследователите не откриват значими междуполови различия. Резултати от проучване на Fadhel В. и сътр. (2014) демонстрират по-високи серумни нива за ADMA при здрави мъже спрямо жени, а от друга страна – описват значимо повишаване при жените след 50-годишна възраст. [78] Като обяснение за този факт се считат различия в хормоналния статус и начало на менопауза при жените. Предвид средната възраст на изследваната от нас кохорта – 46 ± 10 години, т.е. близка до 50 години, потвърждаваме тезата на Fadhel В. и сътр. (2014), Horowitz J. и сътр. (2007) за вероятно повишаване на биомаркера при жените в тази възрастова група.

Статистическата обработка на данните показва значима отрицателна корелация между възрастта и серумните нива на ADMA, но само в групата на контролите ($r = -0,329$, $p = 0,015$). Тази зависимост е в съответствие с наблюдавана от други автори. [78,254] При случаите с Т1Д не установихме значима корелация между изследваните променливи, каквато е описана от Ersoy В. и сътр. [76] При съпоставка на пациентите спрямо медианата на давността на диабета (24 години) резултатите от нашето проучване демонстрираха по-ниски серумни нива на ADMA при лицата с по-голяма продължителност на заболяването ($0,497 \pm 0,239 \mu\text{mol/l}$ спрямо $0,561 \pm 0,271 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,184$). В унисон с нашите резултати, Ersoy В. и сътр. [76], Marcovecchio М. и сътр. [166] докладват по-ниски серумни нива на ADMA за пациенти с Т1Д при по-голяма продължителност на диабета и с напредване на възрастта. Huemer М. и сътр. [110] предполагат, че по-ниските нива на ADMA при деца и юноши с Т1Д са ранен индикатор за нарушена защита срещу оксидативен стрес. От друга страна, данни от предишни проучвания съобщават за успоредно повишаване в серумните концентрации на ADMA спрямо давността на диабета. Според Ersoy В. и сътр. [78] повишаването на ADMA е защитен

механизъм както по отношение развитието на субклинична атеросклероза, така и с цел запазване на миокарданата функция. В допълнение, проучвания при възрастни индивиди без диабет демонстрират, че отчетените по-високи нива на ADMA се асоциират с диастолна дисфункция и сърдечно-съдов рисков профил. [209]

2.2. ADMA – връзки със специфични за T1Д инструменти за оценка на ССР

В настоящото интердисциплинарно проучване за първи път в световен мащаб се оцени връзката на изследвания биомаркер ADMA със специфични инструменти за оценка на ССР при лица с дългогодишен T1Д. В изследването на Маркова Ал. и съавт. (2021) е анализирана ролята на ADMA и връзката ѝ с калкулатори за ССР, но при пациенти с T2Д. [10] Изследователите не откриват зависимост на биомаркера с нито един от използваните калкулатори (UKPDS Risk engine, ADVANCE Risk Engine, SCORE и Framingham risk engine). [10]

С помощта на еднофакторен дисперсионен анализ установихме значима разлика при 90% достоверност на резултатите за средните нива на ADMA само между пациенти с умерен и тези с висок изчислен ССР според ST1RE ($0,44 \pm 0,21 \mu\text{mol/l}$ vs $0,57 \pm 0,28 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,078$). Резултатите, получени в нашето проучване, са близки до посочените в литературата за пациенти с висок ССР, но не и идентични, което би могло да се обясни с големината и характеристиките на анализираната кохорта пациенти с T1Д и използвания метод за анализ. Необходимо е дългосрочно проследяване на пациентите, за да се направят по-надеждни наблюдения относно нивата на ADMA с увеличаване риска от ССЗ при T1Д. Според данни на метаанализи повишените нива на ADMA се асоциират с повишен риск от ССЗ и са независим предиктор за сърдечно-съдова смъртност при високорискови пациенти. [119,281,294] Ето защо, в унисон с изказаната хипотеза, считаме, че паралелното измерване на серумните нива на ADMA би могло да подобри стратификацията на ССР при пациенти с T1Д като високорискова популация.

2.3. ADMA – връзки с HbA1C, CRP, AlbU и RiskFactor3

В настоящото проучване се анализираха зависимостите между серумните нива на ADMA и включените променливи в предложения модел Riskfactor3 (HbA1C, CRP и AlbU). Не установихме значима отрицателна връзка между ADMA и HbA1C, каквато е докладвана от редица изследователи при индивиди с T1Д. [76,103,110,166,254] От друга страна, е важно да се отбележи, че отчетохме понижаване в средните нива на ADMA при случаите с лош гликемичен контрол (HbA1C >7%): $0,6064 \pm 0,2467 \mu\text{mol/l}$ спрямо $0,5168 \pm 0,2568 \mu\text{mol/l}$. Механизмите, чрез които високите нива на глюкоза понижават концентрация на ADMA в

кръвта, не са напълно изяснени. Резултатите от нашето проучване демонстрираха лош гликемичен контрол (HbA1C >7%) при 84,6% от пациентите с Т1Д. Според повечето изследователи хроничната хипергликемия води до понижаване в плазмените нива на ADMA чрез механизми на хиперфилтрация и ускорен бъбречен клирънс. Алтернативна хипотеза предлага обяснение в потискането на синтеза на метиларгинина или увеличаване на метаболизма в черния дроб от DDAH. [254] Има сведения, че интензивната инсулинова терапия при млади пациенти с Т1Д редуцира плазмената концентрация на ADMA чрез модулиране активността на DDAH. [254] В обобщение, резултатите от нашето проучване подкрепят от части хипотезата, че намаленото инактивиране на NOS от ADMA действа като важен механизъм за увреждане на ендотел-зависимата релаксация в артериите, изложени на високи нива на глюкоза.

При обработката на данните в настоящото проучване като най-значима находка при ADMA се очерта констатираната връзка между серумните нива на биомаркера и стойността на AlbU при лица с Т1Д. Намерената корелационна зависимост между ADMA и AlbU е положителна и средна по сила: $r = 0,371$, $p = 0,000$. Наблюдава се и пропорционална тенденция за увеличаване в серумните нива на ADMA спрямо стойността на AlbU (под 30 mg/l; от 30 до 300 mg/l и над 300 mg/l): $F = 9,193$, $p = 0,000$. Резултатите от приложения регресионен анализ потвърдиха независимото влияние на AlbU върху серумните нива на ADMA при лицата с дългогодишен Т1Д. В комбинация с измерване на HbA1C% се определи, че AlbU прогнозира 15% от стойността на ADMA при изследваните пациенти. Следователно констатираната от нас зависимост потвърждава установената от редица изследователи връзка на метиларгинина с AlbU – рутинен маркер за оценка на ДБЗ. [149,244,291,307]

В изследваната кохорта пациенти с дългогодишен Т1Д наличие на микроалбуминурия се отчете при 20,2%, а макроалбуминурия – при 6,5% от пациентите с Т1Д. Според проучване, базирано на данни от Националния шведски регистър за диабетно болни (SNDR), HbA1C и AlbU са най-важните предиктори за смъртност и ССЗ при Т1Д. [100] Лошият гликемичен контрол се асоциира с 2% по-висок риск от смъртност (HR 1.02; 95%CI: 1.017-1.023), а микро- и макроалбуминурията – с 2 до 4 пъти по-висок ССР и смъртност при Т1Д. [100] Лошият гликемичен контрол е основен фактор в развитието и прогресията на ДБЗ. Подобни резултати споделят и изследователи от FinnDiane (2018), DCCT/EDIC (2016) и EDC (2018).

Диабетната нефропатия се определя като водеща причина за краен стадий на бъбречно заболяване и е най-силният предиктор за смъртност при диабет [27,149,291] При патологични условия ADMA стимулира развитието на оксидативен стрес и така изпълнява ключова роля в иницирането и развитието на ДБЗ. [189] Протеинурията (AlbU) е традиционен маркер за

оценка на прогресията на бъбречно увреждане при ЗД. Експериментални и клинични проучвания докладват, че повишените плазмени нива на ADMA корелират със степента на протеинурията. [189] Нашите резултати потвърдиха, че ADMA е значимо повишена при пациенти с микро- и макроалбуминурия спрямо изследваните с нормоалбуминурия. Ето затова ние препоръчваме имплементирането на ADMA в клинично-лабораторната практика и паралелното ѝ определяне с рутинни маркери (AlbU, uACR) за оценка наличието на ДБЗ.

По отношение на предложения модел RiskFactor3 и дефинираните от него групи, статистическа обработка на данните показва очаквана тенденция за пропорционално увеличаване в серумните нива на ADMA. Намерената междугрупова разлика е несигнификантна, което би могло да се обясни с наличието само на една значима връзка между ADMA и включените променливи в RiskFactor3 – описаната с AlbU. Установи се логична сигнификантна корелация, но при 90% достоверност на резултатите между серумните нива на ADMA и Riskfactor3 ($r = 0,159$, $p = 0,092$).

При разпределение на изследваните пациентите с дългогодишен Т1Д според групите на RiskFactor3 се констатира най-голям дял за група 1 (47,58%), следван от група 2 (34,68%), група 0 (10,48%) и група 3 (7,26%). Следователно преобладаващата част от лицата с Т1Д имат само един РФ от включените в предложения модел, който отдаваме на лошия гликемичен контрол при близо 90% от случаите. Процентният дял на пациенти с AlbU над 30 mg/l и тези със CRP над 3 mg/l е сравним (около 30%), което обяснява и наличието на два РФ при близо 35% от случаите. Наличие на три РФ имат най-малък процент от случаите и логично съответства на получените резултати в изследваната кохорта.

2.4. ADMA – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3

ROC анализът демонстрира, че ADMA като самостоятелен маркер няма достатъчно добра диагностична ефективност в отдиференциране на пациенти с нисък и умерен ССР спрямо изследваните с много висок ССР съгласно критериите на утвърдени модели като ST1RE и ESC от 2019 г. С оглед на тази незадоволителна надеждност не са изведени cut-off стойности. Достатъчна диагностична ефективност (65,3%) на ADMA се установява само при жени по отношение на предложения модел RiskFactor3. Изведената прагова стойност на ADMA за отдиференциране на групи 0 и 1 от 2 и 3 при жени е 0,535 $\mu\text{mol/l}$ с чувствителност 72,2% и специфичност 63,2%.

Спецификата на наблюдаваната полова разлика при Riskfactor3 добавя към натрупващите се доказателства за по-неблагоприятно въздействие на хипергликемията върху риска от ССЗ при жените, отколкото при мъжете. [113] Предишни проучвания съобщават за

по-високи нива на коронарна артериална калцификация и други показатели на ЕД, както и по-обширни атеросклеротични лезии, свързани с хипергликемия при жени, отколкото при мъже с Т1Д. Според Nuxley и съавт. (2015) жените имат като цяло по-високо кумулативно излагане на хипергликемия през целия си живот поради по-лош гликемичен контрол в сравнение с мъжете. [113] Предишни проучвания на лица с Т1Д показват значими полови разлики в контрола на плазмената глюкоза и HbA1C; млади момчета и жени е по-вероятно да са в постоянен лош гликемичен контрол, отколкото млади момчета и мъже. Половото несъответствие в гликемичния контрол се обяснява с нарушаване на инсулиновата чувствителност по време на пубертета и повишена склонност към хранителни разстройства и недостатъчно дозиране с инсулин при жени, страдащи от Т1Д. [113]

Алтернативна хипотеза обяснява повишен ССР при жени с Т1Д със смущения в хипоталамо-хипофизарно-яйчниковата ос: късна възраст на менархе, менструални нарушения и преждевременна менопауза. В своето проучване, Колева Д. и съавт. (2017) анализират резултати от плазмени нива на ADMA при 24 жени с МС на възраст 16-39 години, 38 жени с PCOS на възраст 16-35 години и 24 съответни по възраст клинично здрави жени. [8] Изследователите отчитат съпоставими плазмени нива на ADMA при жените от клиничните групи и сигнификантно по-високи в сравнение с тези при здравите контроли. По-високите стойности на ADMA при изследваните жени с МС и PCOS са индикатор за повишен ССР. [8]

Резултатите в настоящото проучване потвърждават частично данните от литературата, които представят ADMA като биомаркер за оценка на ССР при ЗД. Установена е връзка между повишени серумни нива на ADMA и сърдечно-съдови РФ при Т1Д като AlbU и лош гликемичен контрол. Въпреки това липсата на достатъчна диагностична ефективност на биомаркера спрямо специфични инструменти за оценка на ССР при Т1Д определя необходимост от целенасочени изследвания с по-голям брой пациенти.

3. Прогностична стойност на OPG за оценка на ССР при Т1Д

3.1. OPG – възрастово и полово обусловени разлики

В настоящото проучване се констатира статистически значима полова разлика в концентрацията на OPG, каквато се отчита в повечето литературни източници. В двете изследвани групи се установиха по-високи средни нива за OPG при жени спрямо мъже: $5,7261 \pm 1,8323$ pmol/l vs $5,3417 \pm 1,996$ pmol/l при лица с Т1Д и $5,0555 \pm 1,6451$ pmol/l vs $6,1632 \pm 2,3772$ pmol/l при случаите от контролната група, $p < 0,05$. Според редица изследователи половата разлика е по-изявена преди настъпване на менопауза за жените. След 50-годишна възраст серумните нива за OPG при мъже и жени са описани като сходни поради естрогенов дефицит

при жените и установеното му влияние върху синтеза на OPG. От друга страна, тестостеронът има инхибиращо действие, с което отчасти може да се обяснят по-ниските нива на OPG при млади мъже в сравнение с жени в пременопауза, както и отрицателната връзка между OPG и тестостерон при по-възрастните мъже. [33,129,223] В нашето проучване средната възраст при мъже и жени е по-ниска от 50 години и следователно предполага полова разлика, каквато намираме.

Резултати от настоящото проучване потвърждават цитираната отрицателна връзка между възрастта и серумните нива на OPG при мъже. Констатираната от нас корелация при мъжете от контролната група е отрицателна и голяма по сила: $r = -0,565$, $p = 0,001$. От друга страна, потвърждаваме част от данните в литературата, че възрастта и давността на ЗД са значими положителни детерминанти за серумните нива на OPG при пациентите с Т1Д. [25,74,219] В редица проучвания е установено, че концентрациите на OPG нарастват с възрастта. [98,129] Механизмите, отговорни за връзката между OPG и възрастта не са напълно изяснени, но се предполагат промени в костния метаболизъм с напредване на възрастта, както и промени, свързани с глюкозната хомеостаза и съдовата физиология.

Влиянието на давността на ЗД като независима променлива върху концентрацията на OPG е отчетено по-високо (5%) спрямо това на възрастта (3%) при изследваната от нас кохорта пациенти ($p = 0,05$). По данни на метаанализ от 2020 г. резултатите за връзката между давността на заболяването и серумните нива на OPG са противоречиви: в едни случаи тя е положителна, а в други не се отчита такава. [55] В проучването на Бояджиева М. и сътр. (2013 г.) не е регистрирана аналогична зависимост с давността на Т2Д. Изследователите установяват сравними серумни нива на OPG между мъже с новооткрит и изследвани с известен Т2Д. [2] Всичко това налага необходимостта от допълнителни изследвания в тази посока.

3.2. OPG – връзки с ADMA

При обработката на данните в настоящото проучване се констатира значима положителна корелация между стойностите на OPG и ADMA в двете изследвани групи ($p < 0,05$). Нараства броят на проучванията, които изследват зависимостта между двата биомаркера. [54,176,266,289] Tsioufis С. и сътр. (2011) установяват посочената корелационна връзка при пациенти без ЗД и с есенциална хипертония. Според изследователите ADMA като променлива в линейна комбинация с AlbU оказва независимо влияние върху серумните нива на OPG и прогнозира 11,7% от вариациите в концентрацията му. [266] Механизмите, които са предложени да обяснят тази връзка, са следните: повишени нива на OPG в отговор на ADMA – медирана съдова дисрегулация дори преди развитието на хипертония; повишено образуване на колаген и крайни продукти на напреднало гликиране и не на последно място –

въздействие на двата биомаркера върху активността на eNOS. ADMA и OPG се класифицират като маркери за ЕД. Augoulea и сътр. (2012) изследват връзката между серумните нива на OPG и ендотел-зависимата артериална дилатация при пациенти с новооткрит Т1Д. [31] Изследователите установяват повишени стойности на OPG, сигнификантно асоциирани с маркери за ЕД. [31] Необходими са допълнителни проучвания за установяване на синергичното действие на ADMA и OPG върху васкулатурата и респективно развитие на ССЗ при ЗД.

3.3. OPG – връзки със специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР

В настоящото интердисциплинарно проучване се оцени връзката на изследвания биомаркер OPG с утвърдени скали за оценка на ССР при лица с дългогодишен Т1Д за първи път в световен мащаб. Наблюдава се пропорционална тенденция за увеличаване на серумните нива на OPG спрямо категорията на ССР според ST1RE и ESC от 2019 г., която обаче не достигна статистическа значимост. При полово диференциране значима разлика се регистрира в средните нива на биомаркера между мъжете с нисък и тези с висок ССР ($4,99 \pm 1,229$ pmol/l vs 5.914 ± 1.218 pmol/l, $p = 0,041$) и между мъжете с умерен (4.89 ± 0.858 pmol/l) и изследваните с висок ССР ($p = 0,012$). Регистрираната корелация между серумните нива на OPG и ST1RE е значима и с права посока ($r = 0,183$, $p = 0,053$). Между OPG и ESC от 2019 г. не се установи значима асоциация. Следователно резултатите от настоящото проучване потвърждават връзката на OPG с риска от развитие на ССЗ при ЗД по отношение стратификацията на риска според ST1RE. Като обяснение за отчетената по-голяма връзка на OPG със ST1RE спрямо ESC от 2019 г. отдаваме на намерените корелационни зависимости между биомаркера и редица променливи от калкулатора за оценка на ССР – ST1RE (с пол, възраст, давност на диабета, AlbU, гликемичен контрол). Потвърждаваме изказаната хипотеза на Боянов М. и сътр., според която калкулаторите на риска присвояват тежести на различни РФ (степен на преноса). [3] При ESC от 2019 г. отделните РФ не получават различна тежест, не се оценяват количествено и предполагат известна субективност.

Възможността да се определи категорията на ССР въз основа серумните нива на протеина би могла да осигури огромна полза при стратифицирането на риска, централизиране на ресурсите и елиминиране необходимостта от допълнителни изследвания при голям сегмент от пациенти. Browner и сътр. [42] и Olesen и сътр. [188] са едни от първите изследователи, които демонстрират връзката между серумните нива на OPG и прогресията на диабетните усложнения. Gordin и сътр. [94] определят биомаркера като независим предиктор на ССУ при ЗД. Многократно впоследствие е описана връзката между тежестта на атеросклеротичните плаки, на КАБ и серумните нива на OPG. [36] Редица изследователи анализират OPG –

асоциираните механизми за развитие на ССЗ, както и прогностичната роля на биомаркера за ССС при ЗД. [276,31,265,276] Пациенти с Т1Д и Т2Д, като високорискови популации, показват повишени стойности за ОРГ спрямо здрави контроли. [55,265] Последните са докладвани като значимо по-високи при лица, които са преживели ССС. Важно е да се отбележи, че в отговор на интензивно инсулиново лечение (6 месеца), серумните нива на ОРГ са докладвани, че намаляват значимо. [276] Противоречиви са данните в литературата и за влиянието на статиновото лечение върху циркулиращия ОРГ при пациенти с много висок ССР – в едни случаи го понижава, в други повишава и дори се наблюдава различен ефект при различните препарати. [37] Изследваните пациенти с новооткрит Т2Д от Бояджиева М. и сътр. (2013) показват сходни резултати за серумен ОРГ, независимо от наличието или липсата на известна КАБ. Пациентите с доказана КАБ провеждат стандартна статинова терапия, която би могла да повлияе на ОРГ-нива и да е възможна причина за липсата на различия спрямо групата без КАБ. [41]

По литературни данни ОРГ се асоциира с голям брой сърдечно-съдови РФ: възраст, тютюнопушене, хипертония, инсулинова резистентност, затлъстяване, ЗД, бъбречно увреждане. Връзката между ОРГ и ССЗ остава значима дори и след прецизното контролиране на изброените зависими РФ, което предполага допълнително въздействие на други фактори. [265] Raaz-Schrauder D. et al (2017) изследват 414 индивиди с умерено висок ССР, оценен според критериите на Framingham Risk Score и ESC и установяват сигнификантна корелация между плазмените нива на ОРГ и редица атерогенни цитокини. [216] Ролята на ОРГ в развитието на диабетната макроангиопатия не е напълно изяснена. Въпреки че биомаркерът се асоциира с развитие на ССЗ, все още е под въпрос източникът на експресия. Бояджиева М. и съавт. (2013) констатира наличието на значима връзка между серумните нива на ОРГ и каротидната ІМТ при мъже с новооткрит Т2Д, което им дава основание да предположат, че съдовите промени участват в регулацията на протеина или той е важна регулаторна молекула в развитието на съдова дисфункция рано в хода на диабетната еволюция. [41]

Интересно е да се отбележи, че установихме значими разлики между серумните нива на ОРГ в зависимост от категориите на ССР само при мъжете. Това ни дава основание да предположим, че регулацията на остеопротегериновия синтез при мъже и жени с дългогодишен Т1Д се различава при наличие на ССЗ. От друга страна, възможно обяснение би бил недостатъчният брой пациенти като представителна извадка в настоящото проучване, който отчитаме като лимитиращ фактор.

3.4. OPG – връзки с HbA1C, CRP, AlbU и с RiskFactor3

В настоящото проучване се констатира значима положителна корелация между серумните нива на OPG и предложения модел RiskFactor3. След приложение на еднофакторен дисперсионен анализ, сигнификантна разлика, но при 90% достоверност на резултатите, потвърди пропорционалната тенденция за увеличаване в стойностите на OPG: в група 0, средното ниво на OPG е $4,972 \pm 0,489$ pmol/l; в група 1, то е $5,433 \pm 1,51$ pmol/l; в група 2 е $5,51 \pm 1,69$ pmol/l; в група 3 – $6,76 \pm 1,35$ pmol/l, $F = 2,466$, $p = 0,066$. При последващо полово диференциране значима разлика при 90% достоверност на резултатите се установи само между мъжете от група 1 и група 3 ($5,113 \pm 1,039$ pmol/l vs $6,823 \pm 0,567$ pmol/l, $p = 0,074$). При жените предполагаме, че при по-голям брой изследвани отчетената разлика ще достигне статистическа значимост.

При парциално анализиране на взаимодействията между серумните нива на OPG с всяка от променливите, включени в RiskFactor3, се регистрира значима връзка с AlbU ($r = 0,218$, $p = 0,021$). В противовес на предходни проучвания не установихме значими положителни корелации между серумните нива на OPG и HbA1C%. [55,80,199] и CRP. [37] Важно е да се отбележи, че в групата на пациентите с Т1Д се отчитат по-високи стойности на OPG при HbA1C над 7% (спрямо тези с HbA1C под 7%) и CRP над 3 mg/l (спрямо тези с CRP под 3 mg/l), които обаче не са статистически значими. При изследване на по-голям брой пациенти наблюдаваните различия вероятно ще достигнат статистическа значимост.

При лицата с дългогодишен Т1Д констатирахме сигнификантна разлика в серумните нива на OPG между изследваните с AlbU под 30 mg/l и AlbU над 300 mg/l ($MD = 1,53$ pmol/l, $p = 0,032$) и при 90% достоверност на резултатите – между пациентите с AlbU от 30 до 300 mg/l и AlbU над 300 mg/l ($MD = 1,45$ pmol/l, $p = 0,080$). Резултатите от линейния регресионен анализ демонстрираха независимо влияние на променлива AlbU за прогнозиране концентрацията на OPG при лицата с дългогодишен Т1Д, която се равнява на 4%. В групата на контролите аналогична асоциация не се регистрира. Този факт ни дава още веднъж основание да потвърдим тезата за разлики в нивата на OPG при физиологични и патофизиологични условия.

Резултатите от настоящото проучване потвърдиха констатираната в литературата връзка на OPG с AlbU при ЗД. ДБЗ е основно микроваскуларно усложнение при ЗД, установено при над 40% от пациентите с голяма давност на диабета. [72] ДБЗ се диагностицира в рутинната клинично-лабораторна практика посредством оценката на албуминурия ($uACR$, $uAER$) и $eGFR$. В проучването на Perez de Cirza C. и сътр. (2015) са представени хипотези от редица изследователи за положителната асоциация на OPG с ДБЗ при Т1Д. [201] Комбинацията от

ДБЗ и лош гликемичен контрол, какъвто установихме в преобладаващата част от изследваната кохорта пациенти, се счита за основна предпоставка за развитие на ССЗ. За период от близо 10 години Gordin D. и сътр. (2013) проследяват 1939 възрастни индивиди с Т1Д и дефинират OPG като независим предиктор на СУ. [94] Изследователите докладват за 2,7 пъти по-висок ССР при пациенти с наличие на макроалбуминурия (cox regression 2,70 (1,67-4,37), $p < 0,001$). [94] Според Jorsal A. и сътр. (2008) плазменият OPG е независим предиктор за обща и сърдечно-съдова смъртност при пациенти с нефропатия. [121] Изследователите подкрепят хипотезата за акумулиране на OPG в артериалната стена, водещо до генерализирани съдови промени и калцифициране при лица с дългогодишен Т1Д. [121] Grauslund J. и сътр. (2010) установяват сигнификантна разлика в плазмените нива на OPG между пациенти с макро-, микроалбуминурия и изследвани с нормоалбуминурия при средна давност на Т1Д – 43 години. [96] По-късно Elsamahy M. et al (2015), Wang Sh. et al (2013), Fekih O. et al. (2016) отново демонстрират сигнификантно по-високи резултати за OPG при AlbU над 30 mg/24h спрямо AlbU под 30 mg/24 h. [74,80,282] В обобщение, резултатите от нашето проучване подкрепят хипотезата, че в условия на лош гликемичен контрол OPG се асоциира положително с AlbU и респективно с развитието на СУ при лица с дългогодишен Т1Д.

3.5. OPG – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3

Резултатите от приложения ROC анализ спрямо утвърдените скали за оценка на ССР при Т1Д демонстрираха, че OPG има добра прогностична стойност (приблизително 70%) за мъже и жени спрямо ST1RE. Изведените прагови стойности на OPG за мъже и жени при отдиференциране на нисък към умерено висок от тези с много висок ССР според ST1RE са следните: 5,075 pmol/l с чувствителност 70,8% и специфичност 55,9% за мъже и 5,355 pmol/l за жени с чувствителност 66,7% и специфичност 60%. При ESC 2019 г. маркерът има добра прогностична стойност само за жени – приблизително 65%. Изведената прагова стойност на OPG при отдиференциране на висок от много висок ССР е 5,025 pmol/l с чувствителност 70% и специфичност 60%. По отношение на ST1RE, ROC анализът елиминира коментираните по-горе различия от корелационен анализ – тук резултатите са значими и за двата пола. От друга страна е важно да се акцентира върху приложения критерий – висок ССР, който според нас предполага по-добра предиктивна стойност на маркера при високорисковите пациенти.

В заключение нашите открития потвърждават, че OPG е потенциален биомаркер за оценка на ССР при лица с дългогодишен Т1Д. Препоръчваме допълнителни изследвания с по-голям брой пациенти и изясняване на патофизиологичните механизми в контекста на ССЗ при Т1Д. Имплиментирането на OPG в рутинната клинично-лабораторна практика е полезно за по-добро стратифициране на ССР и адекватно лечение.

4. Прогностична стойност на ADNC за оценка на ССР при Т1Д

4.1. ADNC – възрастово и полово обусловени разлики

Резултатите от настоящото проучване са в съответствие с част от данните в литературата, които докладват междуполови различия в серумни/плазмени нива на ADNC. При жените от двете изследвани групи се отчитат сигнификантно по-високи резултати на адипокина в сравнение с тези при мъжете: $14,964 \pm 16,998 \mu\text{g/ml}$ за жени спрямо $6,781 \pm 2,415 \mu\text{g/ml}$ за мъже от контролна група и $18,394 \pm 12,551 \mu\text{g/ml}$ за жени спрямо $11,237 \pm 5,667 \mu\text{g/ml}$ за мъже от групата на Т1Д, $p < 0,05$. Половата разлика се обяснява с различия в хормоналния статус и телесното разпределение на мазнините. [240,260] В проучването на Kaza M. и сътр., (2022) при деца и юноши с Т1Д не се установява полова разлика. [126] Lausten-Thomsen U. и сътр.(2015) изследват общо 1193 здрави датски ученици без затлъстяване (730 момичета, 463 момчета) на възраст 6-18 години с цел извеждане на педиатричните референтни стойности и не констатира значима разлика между половете. [143] Някои автори предполагат, че повишаването в концентрацията на андрогените по време на пубертета при мъжете е във възрастовия период, от който нивата започват да се различават. Съобщава се и за пропорционално увеличаване на половата разлика с напредване на възрастта. [144] Куо S. и сътр. (2011) анализират резултати от проучвания при 4852 здрави възрастни (между 18 и 59 години) и отхвърлят хипотезата за полови различия, повлияни от телесното разпределение на мазнините и ИТМ. Според изследователите докладвани полови промени в плазмените нива на ADNC са резултат от метаболитни нарушения. [139]

Важно е да се отбележи, че в настоящото изпитване серумните нива на ADNC при мъжете и жените с дългогодишен Т1Д са статистически значимо по-високи от тези при контролите ($p < 0,05$). Констатираната разлика е потвърдена от редица проучвания и метаанализи. [193,303,211,240] Потвърждаваме хипотезата за т.нар. „адипонектинов парадокс“. Синтезът на ADNC като противовъзпалителен фактор е потиснат при затлъстяване, МС, Т2Д и ССЗ. От друга страна, циркулиращите нива на хормона се повишават при имуномедиирани заболявания като Т1Д, което предполага провъзпалително действие и участие в имунитета. [139,303] Механизмите, отговорни за значимо повишаване в концентрацията на ADNC при пациенти с Т1Д, все още не са напълно изяснени.

Мъжете с по-голяма продължителност на заболяването показаха по-високи нива на хормона ($12,327 \pm 5,662 \mu\text{g/ml}$) спрямо изследваните с давност под 24 години – $9,625 \pm 5,394 \mu\text{g/ml}$. Нямаме обяснение за незначимите различия спрямо медианата на давността на Т1Д при жените. Възможна причина е недостатъчен брой изследвани като представителна извадка на

лица с дългогодишен Т1Д, полово обусловени особености или аналитични характеристики на използвания реагентен кит.

Резултатите от настоящото проучване не потвърдиха констатираната от редица изследователи положителна връзка между серумните нива на ADNC и възрастта на пациентите. [143,144] По отношение давността на диабета установихме положителна зависимост, каквато се цитира в литературата [126,144,163], но само при мъжете с дългогодишен Т1Д ($p < 0,05$). Според Lindstrom T. и сътр. (2006) давността на заболяването е най-силният предиктор за концентрацията на ADNC, последвана от възрастта независимо от промените в ИТМ при лица с Т1Д. [148] Според изследователите наблюдаваната асоциация се дължи на възрастово-обусловени хормонални промени, които регулират секрецията на ADNC. От друга страна, има данни, че остатъчната β -клетъчна функция на панкреаса, оценена с количествено определяне на С-пептид, корелира отрицателно с ADNC-нива. [148] С напредване продължителността на диабета ендогенният синтез на инсулин налага повишено интензивно лечение с екзогенно внесен инсулин, който повишава експресията на ADNC-ген в 3T3-L1 адипоцитите. [300] При Т1Д екзогенен инсулин се инжектира субкутанно и вероятно потенцира секрецията на ADNC от този тъкан и създава условия за периферна хиперинсулинемия. Такъв механизъм би обяснил защо традиционната отрицателна връзка между ИТМ, обиколката на талията или нивата на инсулин и циркулиращия ADNC не е намерен при участниците с Т1Д в редица проучвания. Следователно можем да предположим, че високите нива на ADNC при пациенти с Т1Д без данни за микро- и макроангиопатии вероятно се дължат на локалния ефект на екзогенно внесен инсулин върху освобождаването на ADNC от подкожната мастна тъкан. Тази хипотеза обаче трябва да бъде подкрепена от допълнителни проучвания.

В настоящото проучване установихме значима отрицателна зависимост между серумните нива на ADNC и ИТМ при лицата с Т1Д, каквато е описана от редица изследователи ($r = -0,466$, $p = 0,000$ за мъже и $r = -0,241$, $p = 0,080$ за жени). В контролната група описаната корелационна връзка загуби сигнификантността си.

4.2. ADNC – връзки с ADMA

Интересна положителна корелационна връзка в групата на контролите мъже наблюдавахме между серумните нива на ADNC и ADMA, $r = 0,430$, $p = 0,020$. В съответствие с други изследователи, Колева Д. и сътр. (2016) обединяват двете променливи като маркери за ЕД в контекста на атеросклеротичен процес. [134] ADNC активира eNOS и респективно синтеза на вазодилатора NO, а ADMA е едноклетъчен инхибитор на eNOS. Paduszyńska Al. и сътр. (2020) установяват отрицателна зависимост между серумните нива на ADMA и ADNC

при пациентите със затлъстяване и средна възраст от 53 години [194], Namee E. и сътр. (2014) – при деца с обезитет, и Neilman K. и сътр. (2009) – при деца с Т1Д. [101,103] Eleuterio N. и сътр. (2022) изследват връзката между ADMA и ADNC при бременни с прееклампсия. [73] Изследователите разпределят пациентките в група 1 (с високи серумни нива на ADMA) и група 2 (с ниски серумни нива на ADMA) и констатира значимо по-високи стойности на ADNC в първата група. По-високите концентрации на ADMA вероятно интерферират физиологичното активиране на eNOS от ADNC. Следователно биологичният механизъм зад това откритие все още е неизвестен, което ограничава задълбочената дискусия от наша страна. Не намираме данни в литературата за наблюдаваната зависимост при здрави индивиди.

4.3. ADNC – връзки със специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР

В настоящото интердисциплинарно проучване се оцени връзката на изследвания биомаркер ADNC със специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР: ST1RE и ESC от 2019 г., както и с предложения модел RiskFactor3. Значима корелационна зависимост се наблюдава само между серумните нива на адипокина и RiskFactor3, $\rho = -0,23$, $p = 0,015$. Отрицателният знак на връзката се запази и при отчетените връзки на ADNC с ESC от 2019 г. и ST1RE, но не достигна статистическа значимост.

След приложение на еднофакторен дисперсионен анализ не се установиха статистически значими различия в серумните нива на ADNC при мъже и жени от различните категории на ССР. Прави впечатление, че медианата за резултатите на ADNC при пациенти с умерено висок ССР е по-висока от регистрираната при изследваните с много висок ССР според насоките на ESC от 2019 г. и калкулатора ST1RE, т.е. отчита се понижение в концентрациите на хормона. Установените резултати дотук са в съответствие с демонстрираната тенденция от много изследователи за пропорционално понижаване в серумните нива на ADNC с повишаване на риска от ССЗ. От друга страна, медианите за ADNC при мъже и жени с нисък ССР са по-ниски спрямо отчетените при лица с умерено висок ССР според ST1RE. Следователно резултатите от настоящото изпитване не ни позволяват да направим категоричен извод за серумните нива на ADNC спрямо насоките на ESC от 2019 г. и категорията на ССР според калкулатора ST1RE.

Противоречиви са данните в литературата по отношение на връзката между ADNC и кардиометаболитните характеристики при лица с Т1Д. Според Menzaghi Cl. и сътр. (2018) повишените нива на ADNC са независим предиктор за обща и сърдечно-съдова смъртност при възрастни индивиди с Т1Д. Malecha-Jedreaszek A. и сътр. (2012), Sheriff D. и сътр. (2017) докладват по-високи серумни нива на ADNC при пациенти с хронични усложнения спрямо лица без СУ. [163,239] Метаанализ на ранни проучвания [170] предполага, че парадоксалната връзка между увеличаване на ADNC и повишената смъртност се наблюдава само при наличие на

ССЗ. Подобни независими асоциации са докладвани по-късно при асимптоматични възрастни лица от общата популация и при пациенти, засегнати от няколко заболявания, включително КАБ, периферни артериални заболявания, ХБЗ и рак. Наскоро е докладвано, че нивата на ADNC предсказват сърдечно-съдовата смъртност по полово специфичен начин, като парадоксалният ефект се наблюдава при мъже, но не и при жени. [170] Подобен полов диморфизъм е описан и за асоциациите между ADNC и ХБЗ и увеличаване на каротидната ИМТ. [170,205] Други автори потвърждават хипотезата, че намалената серумна концентрация на ADNC се асоциира с повишен риск от КАБ дори и при Т1Д, независимо от конвенционалните РФ, маркери за възпаление и инсулинова резистентност. [60,156] Le Caire T. и сътр. (2015) докладват по-ниски стойности на ADNC при пациенти с Т1Д и налични микроваскуларни усложнения. [144] Според Menzaghi Сl. И сътр. (2018) парадигмата за благоприятната роля на ADNC върху метаболитни, възпалителни и атеросклерозни процеси е изведена най-вече след пионерски проучвания, проведени върху клетъчни и животински модели [84,231], в които основните констатации са съвместими с резултати от ранни малки проучвания при хора. [170] Въпреки това, когато се разглеждат големи епидемиологични и генетични проучвания, става очевидно, макар и напълно неочаквано, че високият серумен ADNC приоритетно е маркер за инсулинова чувствителност и глюкозна хомеостаза и е неутрален по отношение на ССР, сърдечно-съдова смъртност и общата смъртност. [38,108,170]

4.4. ADNC – връзки с HbA1C, CRP, AlbU и с RiskFactor3

Статистическата обработка на данните показва, че стойностите на ADNC при мъже и жени в зависимост от групата, дефинирана от предложения модел RiskFactor3, са без значими разлики. Наблюдавахме пропорционална тенденция за намаляване в концентрациите на ADNC с увеличаване броя на РФ, дефинирани като групи според RiskFactor3. При жените, за разлика от мъжете, наблюдаваната тенденция е по-категорична, но отново не достигна статистическа значимост.

При парциално анализиране на резултатите спрямо отделните РФ (HbA1C, CRP и AlbU), значима разлика в стойностите на ADNC се отчете при жените спрямо CRP под и над 3 mg/l ($21,500 \pm 14,012 \mu\text{g/ml}$ и $12,054 \pm 5,184 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,01$). При мъжете с увеличаване стойността на CRP отново се отбелязва намаляване в серумните нива на ADNC, но не достига статистическа значимост. След приложение на корелационен анализ при пациентите с Т1Д, връзката между ADNC и CRP не достигна статистическа значимост, каквато е докладвана в голям брой проучвания. Важно е да се отбележи, че при жените с Т1Д регистрираната корелация между променливите е отрицателна ($r = -0,224$, $p = 0,107$), а при мъжете –

положителна ($r = 0,181$, $p = 0,177$). В групата на контролите не се отчита сигнификантна корелационна връзка.

CRP е един от най-чувствителните възпалителни маркери. В експериментални и епидемиологични проучвания е установена положителна връзка на CRP с развитието на атеросклеротичния процес и ССЗ. Yuan G. и сътр. (2007) за първи път докладват, че CRP потиска експресията на адипонектиновия ген и секрецията на хормона от 3T3-L1 адипоцитите. [300] Някои изследователи установяват по-голям ефект на наблюдаваната реципрочна връзка при жени спрямо мъже и го обясняват с по-високия процент телесни мазнини при жените. Putri E. и сътр. (2021) и Abraham A. и сътр. (2017) оценяват провъзпалителен статус, свързан с метаболитен контрол и инсулиновата резистентност при възрастни индивиди с Т1Д. [16,215] Изследователите потвърждават обратнопропорционалната зависимост между ADNC и CRP, както и с провъзпалителни цитокини (TNF- α и IL-6), и акцентират върху честотата на MC при пациенти с Т1Д, която е подобна на установената в общата популация. Пациентите с MC имат увеличена коремна мастна тъкан, а висцералните адипоцити имат интензивна секреторна активност и се считат за еквивалентни на ендокринните органи. Наличието на MC при млади индивиди с Т1Д се асоциира с повишена инсулинова резистентност и провъзпалително състояние. Това води до преждевременно повишаване на глобалния ССР. [24]

Провъзпалителното състояние, свързано с MC при пациенти с Т1Д, допълнително влошава гликемичния контрол, повишава необходимата дневна доза инсулин и е тясно свързано с развитието на хронични диабетни усложнения. В обобщение, отрицателна корелация между ADNC и CRP е в полза на хипотезата за противовъзпалително и антиатерогенно действие на хормона – единственият адипоцитокин, който повишава медираното от инсулин усвояване на глюкоза.

По отношение на гликемичния контрол в настоящото проучване не се установиха значими разлики в средните нива на ADNC за мъже и жени с HbA1C над 7% спрямо изследваните с HbA1C под 7%. Резултатите от корелационния анализ на двете променливи също не достигнаха сигнификантна значимост. В настоящото проучване констатирахме незначимо понижаване в стойностите на ADNC при пациенти с HbA1C над 7% спрямо изследваните с HbA1C под 7% ($13,963 \pm 5,226 \mu\text{g/ml}$ спрямо $10,916 \pm 5,677 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,216$ за мъже и $19,323 \pm 5,456 \mu\text{g/ml}$ спрямо $18,232 \pm 3,444 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,823$ за жени). Според Pilacinski S. и сътр.(2016) „хиперадипонектинемията“ се асоциира с хронична хипергликемия при лица с Т1Д. [208] Гликозилирането на лизинови остатъци в колагенния домен на ADNC е важен механизъм на посттранслационна модификация. [125] Положителна връзка между HbA1C и ADNC при Т1Д е отбелязана предимно при деца или възрастни без регистрирани усложнения,

но не във всички изследвания. [208] Освен това има сведения, че връзката между ADNC и HbA1C би могла да бъде маскирана от развитието на ДБЗ. [144] От друга страна, различни напречни проучвания са документирали отрицателна връзка на ADNC със затлъстяване, хипертония, дислипидемия, нивата на плазмената глюкоза на гладно и инсулиновата резистентност, които са известни РФ за последващо развитие на Т2Д. [193,303]

В настоящото проучване не са открити статистически значими разлики в нивата на ADNC спрямо степента на AlbU при пациентите с Т1Д. Важно е да се отбележи, че независимо от този факт се наблюдава очаквана според повечето литературни източници обратнопропорционална зависимост между ADNC и AlbU. Докладвано е, че адипокинът се увеличава с прогресията на AlbU при пациенти с Т1Д, което е в съответствие с описана хиперадипонектинемия при пациенти с ХБЗ. [167,193,204,248] Високите плазмени концентрации на ADNC намаляват след бъбречна трансплантация [167,286]. В проучвания на пациенти с Т2Д е констатирано парадоксално намаляване на нивата на ADNC с успоредно прогресиране на AlbU. [193] Пациентите с протеинурия са имали повишена инсулинова резистентност в сравнение с пациентите без протеинурия и това обяснява понижаването в серумните нива на адипокина при пациенти с Т2Д и протеинурия. [193]

ADNC е адипокин, който е докладван, че има ренопротективни ефекти чрез AMPK-активирани пътища и така предотвратява микро- и макроалбуминурията. Съобщава се, че връзката между циркулиращия ADNC и AlbU показва двуфазен модел. Съществува отрицателна връзка в случай на нормоалбуминурия, вероятно отразяваща повишения бъбречен клирънс заедно с ренопротективните ефекти на адипокина, и положителна връзка с макроалбуминурия, показваща противодействието на повишения синтез на ADNC като компенсаторен отговор на бъбречно увреждане. [53]

В настоящото проучване особен интерес предизвика фактът, че се констатира много силна зависимост между серумните нива на ADNC и AlbU при контролите жени, но не и в групата с Т1Д. След приложение на линеен регресионен анализ установихме, че AlbU определя 58,6% от измененията в концентрацията на ADNC при здравите жени. Следователно изхождайки от хипотезата, че ADNC има ренопротективни свойства, намерената положителна зависимост би следвало да е физиологичен отговор за предотвратяване на по-нататъшно бъбречно увреждане при контролите. При лицата с дългогодишен Т1Д хипотезата за повишени серумни нива на ADNC поради намален бъбречен клирънс не се подкрепя от нашето проучване. Повишените серумни нива на ADNC при изследваните пациенти се оказаха независими от бъбречната функция, оценена със степента на AlbU. Следователно са

необходими допълнителни клинични проучвания, за да се потвърди нефропротективната роля на ADNC при пациенти със ЗД.

4.5. ADNC – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3

В настоящото изпитване ROC анализът демонстрира, че ADNC като самостоятелен маркер няма достатъчно добра диагностична ефективност в отдиференциране на пациенти с нисък към умерено висок от пациенти с много висок ССР съгласно критериите на специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР – ST1RE и ESC от 2019 г. С оглед на тази незадоволителна надеждност на маркера не са изведени cut-off стойности. Следователно нашите открития не подкрепят причинно-следствената връзка между ADNC и риска от ССЗ при пациенти с дългогодишен Т1Д. В подкрепа на нашите открития са и направените изводи от мащабно проучване тип Менделова рандомизация за оценка на връзката между серумния ADNC и риска от ССЗ. Използвани са данни от консорциуми за проучване на целия геном (CARDIoGRAM – 22 233 случая на ССЗ и 64 762 контроли и CARDIoGRAMplusC4D Metabochip – 63 746 случая на ССЗ и 130 681 контроли) с подробно фенотипизиране на КАБ, ОМИ или и двете. Изследователите не подкрепят защитната роля на ADNC при ССЗ и показват, че връзката между генетично повишените нива на ADNC и по-ниския ССР се обуславя главно от хоризонтална плейотропия. [38]

5. Прогностична стойност на Lер за оценка на ССР при Т1Д

5.1. Lер – възрастово и полово обусловени разлики

Настоящото проучване изследва влиянието на ИТМ, възрастта, пола и давността на диабета върху серумните нива на Lер. Очаквана положителна корелационна зависимост между серумните нива на Lер и ИТМ се констатира в двете изследвани групи: $r = 0,667$, $p = 0,000$ за мъже с Т1Д и $r = 0,635$, $p = 0,000$ за жени с Т1Д; $r = 0,806$, $p = 0,000$ за здрави мъже и $r = 0,762$, $p = 0,000$ за здрави жени. Намерената корелационна връзка потвърждава установената от редица изследователи, както и значението на ИТМ при извеждане на референтни стойности.

Резултатите от статистическата обработка демонстрираха и междуполова разлика в серумните нива на Lер, която е добре установена от редица изследователи. [48,117,221] Жените в двете изследвани групи имат по-високи средни стойности за Lер: $6,1908 \pm 4,045$ ng/ml спрямо $3,0815 \pm 1,998$ ng/ml при контроли и $8,211 \pm 6,679$ ng/ml спрямо $2,863 \pm 2,948$ ng/ml при лица с Т1Д. Предполага се, че по-високите нива на Lер при жените включват различния модел на телесно разпределяне на мазнини и/или ролята на половите хормони. [117] Доказано е, че след менопауза жените имат по-ниски серумни концентрации на Lер, отколкото по време на

фертилния период. [48,221] Също така е установено, че адипоцитите, изолирани от мастната тъкан от женски донори, отделят значимо по-високи количества Лер в културелна среда, отколкото тези от мъжете. [48,117,221] Проучвания *in vitro* показват, че естрадиолът повишава освобождаването на Лер при инкубиране на проби от мастна тъкан на женски, но не и мъжки донори. [117] Други изследователи докладват, че приложението на естроген при жени в менопауза няма ефект върху циркулиращия Лер и изключват тезата, че естрогените са отговорни за различията между половете. [117] Възможно е и половият диморфизъм в концентрациите на Лер да е свързан с мъжкия пол и да се дължи на андрогени. Няколко напречни проучвания съобщават, че при мъжете тестостеронът е отрицателно свързан със серумния Лер, независимо от ИТМ. В *in vitro* проучвания Wabitsch M. и сътр. (2017) и Funcke V. и сътр. (2014) доказват директен дългосрочен инхибиторен ефект на тестостерона върху производството на Лер от човешки адипоцити в културелна среда. [85,279]

Пациентите с дългогодишен Т1Д показаха по-високи стойности за Лер в сравнение с контролите. Този факт е в съответствие с резултатите на редица изследователи. Интересно е да се отбележи, че при жените по-високи стойности за Лер се регистрират при давност на диабета под 24 години ($9,976 \pm 8,799$ ng/ml) спрямо изследваните с давност над 24 години ($7,0525 \pm 4,625$ ng/ml, $p = 0,050$), а при мъжете наблюдаваната тенденция е обратна ($3,4685 \pm 3,443$ ng/ml при давност над 24 години спрямо $1,926 \pm 1,618$ ng/ml при давност под 24 години, $p = 0,048$).

Значима корелационна зависимост се регистрира между серумните нива на Лер и възрастта на мъжете в двете изследвани групи: $p = 0,034$ за мъже с Т1Д и $p = 0,027$ при здрави мъже. Следователно наблюдаваната тенденция за увеличаване концентрацията на Лер при здрави мъже с напредване на възрастта се запазва и при патологични условия – наличие на Т1Д. Добре известен факт е, че стареенето засяга телесния състав с намаляване на общата мускулна маса и увеличаване на мастните депа. Предполага се, че тези явления са свързани с промени в нивата на серумния Лер и/или неговия синтез. Въз основа на предишни проучвания, които съобщават, че концентрацията на Лер е намалена, непроменена или дори увеличена при стареене, връзката между възрастта и Лер все още не е ясна. В предишни проучвания е доказано, че нивата на Лер се повишават при възрастни до много стари мъже и остават непроменени при млади жени и жени след менопауза. [117] Причината за тези противоречиви резултати не е разбрана. Вероятно обяснение е променливостта в експерименталния дизайн, различни възрасти и/или ИТМ на субектите на изследването, статистически анализ или фактът, че често връзката възраст–Лер не е основният фокус на повечето от проучванията.

В заключение резултатите от настоящото изпитване подкрепят хипотезата, че серумните нива на Lер са полово- и ИТМ-зависими и се увеличават при мъже с напредване на възрастта, а при жени остават непроменени. По отношение давността на диабета средните нива на Lер при мъжете се променят закономерно с възрастта им. При жените се отчита значимо понижение, което вероятно е израз на патофизиологични механизми.

5.2. Lер – връзки с OPG

В настоящото проучване се констатира значима положителна корелация между серумните нива на Lер и OPG при мъжете с дългогодишен Т1Д. При жените с Т1Д и при контролите не се установи сигнификантна зависимост между посочените променливи. Първото предположение, че Lер може да регулира костната резорбция, е на Holloway и сътр. [222], които доказват Lер-обусловено инхибиране на остеоκластогенезата в културелни среди от човешки мононуклеарни клетки на периферна кръв. Други изследователи установяват, че Lер повишава синтеза на OPG и намалява нивата на RANKL в стромалните клетки на човешки костен мозък. [222] Следователно констатираната положителна корелация между OPG и Lер съответства на изказаната хипотеза. Като обяснение за наблюдаваната зависимост само при мъже предлагаме теорията за полово-обусловена хормонална регулация. Инхибиращото влияние на тестостерона върху Lер и OPG едновременно предполага закономерни промени в серумите нива на маркерите. При жените описаното влияние на естрогените върху концентрацията на Lер е противоречиво, върху концентрацията на OPG се счита за положително и съответно не предполага подобна зависимост между двата маркера.

5.3. Lер – връзки със специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР

В настоящото проучване се оцени прогностичната стойност на биомаркера Lер спрямо категорията на ССР, изчислен с помощта на калкулатора ST1RE и според насоките на ESC от 2019 г. Резултатите от приложени корелационен анализ показаха значима положителна асоциация на Lер със ST1RE ($\rho = 0,549$, $p = 0,000$), както и с ESC от 2019 г. ($\rho = 0,361$, $p = 0,006$), но само при мъжете с дългогодишен Т1Д. Еднофакторният дисперсионен анализ потвърди намерените зависимости и доказа сигнификантни междугрупови разлики в серумните нива на Lер при мъжете спрямо ST1RE ($p = 0,002$), както и спрямо ESC от 2019 г. ($p = 0,053$). При жените сигнификантна разлика в серумните нива на Lер установихме между подгрупите с висок и много висок ССР според критериите на ESC от 2019 г. ($p = 0,043$). Следователно колкото по-висок е ССР при пациентите с дългогодишен Т1Д, толкова по-високи стойности за Lер се отчитат.

Последните проучвания сочат, че при физиологични условия Lep е важен фактор в регулирането на енергийния баланс, но при патологично обусловена хиперлептинемия адипокинът се асоциира с прогресията на ССЗ. [179] Този ефект вероятно е медиран от различни атерогенни ефекти на Lep, включително неговия ефект върху кръвното налягане, тромбоцитната агрегация, нестабилност на плаката и възпалителния съдов отговор. Счита се, че високите нива на Lep са свързани с артериална ригидност, по-нисък индекс на циркулаторната функция и е установено, че участват в патогенезата на атеросклеротичния процес. [179]

Azar S. и сътр.(2002) съобщават, че нивата на Lep са ниски при новодиагностицирани пациенти с Т1Д и се повишават след започване на инсулинотерапия, независимо от промените в телесното тегло. [32] Възможно е това се дължи на стимулиращия ефект на инсулина върху производството на Lep. Пациентите с интензифицирана инсулинотерапия имат по-високи нива на Lep от пациентите с конвенционална инсулинотерапия. В проучването на Atwa H. и сътр. (2018) е изследвана връзката между адипокини (Lep и ADNC) с каротидната ИМТ при деца и юноши с Т1Д. [30] Изследователите установяват положителна корелация между Lep и каротидната ИМТ и правят заключение, че адипокинът може да служи като неинвазивен надежден маркер за ЕД и субклинична атеросклероза при деца и юноши с Т1Д. Описаната връзка между Lep и ИМТ е потвърдена и при възрастни индивиди. [62]

5.4. Lep – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с Riskfactor3

Анализирахме и връзката на маркера с предложения модел RiskFactor3. Стойността на рангова корелация Спирмън ро между серумните нива на Lep и RiskFactor3 при мъжете отново е с права посока, но е значима при 90% достоверност на резултатите: $\rho = 0,23$, $p = 0,084$ между Lep и RiskFactor3. При жените се установи сигнификантна значимост при 95% достоверност на резултатите: $\rho = 0,437$, $p = 0,001$. Еднофакторният дисперсионен анализ демонстрира сигнификантни разлики в серумните нива на Lep при мъже и жени от различните групи според RiskFactor3 ($p < 0,05$).

При последващо парциално анализиране на РФ установихме, че серумните нива на Lep корелират със стойността на AlbU при лицата с дългогодишен Т1Д ($p < 0,05$). Наблюдаваната зависимост е потвърдена от редица изследователи, които докладват, че серумният Lep е значимо по-висок при пациенти с микро- и макроалбуминурия в сравнение с контролите и нормоалбуминуричните пациенти със ЗД. [109,297]. Според Топу А. и сътр.(2022) серумният Lep е независим РФ за развитие на ДБЗ. По отношение на Т1Д данните в литературата са ограничени. [261]

Резултатите от статистическата обработка показаха сигнификантна положителна връзка между серумните нива на Lер и CRP, каквато е докладвана от редица изследователи. У нас посочената корелационната зависимост е установена в проучването на Латева М. и сътр. (2015) при деца в предучилищна възраст с абдоминално затлъстяване. [9] В настоящото изпитване установихме, че 23,8% от измененията в серумната концентрация на Lер могат да се обяснят с промени в стойностите на AlbU и CRP при жените с дългогодишен Т1Д, а при здравите жени – 29,4%. При мъжете с Т1Д, независимо влияние върху серумните нива на Lер се оказа че има само AlbU – 11,9%.

Корелацията на CRP с Lер предполага връзка между активирането на ендотела и хроничното възпаление. CRP се дефинира като силен предиктор на ССЗ. [24] Счита се, че Т1Д създава проинфламаторна среда, в която концентрацията на цитокини, произведени от макрофагите, мастната тъкан и ендотела се индуцира от хипергликемия. [51] Lер, от своя страна, стимулира производството на различни цитокини, включително IL-6. Тъй като LEPR медира вътреклетъчното сигнализиране със специфичност, подобна на IL-6-тип рецепторите, Lер може да регулира производството на CRP не само чрез IL-6, но и чрез LEPR. Алтернативно обяснение е, че затлъстяването повишава производството както на Lер, така и на цитокин, регулиращ синтеза на CRP без причинно-следствена връзка между Lер и CRP. Въпреки това са необходими допълнителни изследвания, за да се определят вътреклетъчните механизми, чрез които Lер регулира производството на CRP. Освен това ролята на CRP в развитието на лептиновата резистентност също е предложена, но следва да бъде допълнително анализирана. [51] Идентифицираните различия между половете по отношение на връзката между тези маркери в настоящото проучване налага нуждата от допълнителни изследвания.

5.5. Lер – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3

В настоящото проучване е установено, че серумният Lер се повишава от два до три пъти при мъже с висок ССР според ST1RE. Мъже и жени с много висок ССР показват почти два пъти по-високи стойности за Lер от изследваните с висок ССР според насоките на ESC от 2019 г. Тези констатации потвърждават хипотезата, че „хиперлептинемията“ се асоциира с повишен ССР. По данни на метаанализ, обобщаващ резултати от 7580 участници, серумните нива на Lер са положително и значимо свързани с риска от повишена артериална ригидност (коэффициент на DOR 1,04; $p < 0,01$). [62] Според заключението на друг метаанализ с 1904 произволно избрани възрастни, включени в мултиетническото проучване на атеросклерозата (MESA), най-високият тертил на резултатите за Lер е статистически значимо свързан с 4% (1–7%) по-голяма прогресия на САС за средно 7 години. [274] Друг доклад съобщава, че

серумните концентрации на Lер се асоциират с неблагоприятно сърдечно ремоделиране при пациенти с КАБ. [79]

При логаритмичен регресионен анализ установихме, че ако концентрацията на Lер се увеличи с 1 ng/ml, то шансът пациентът да попадне в категория на висок ССР според ST1RE се увеличава с 1,7 пъти за мъжете (95% CI 1,17-2,45). При ESC от 2019 г. шансът пациентът да попадне от категория висок към много висок ССР е съответно 1,404 пъти при мъжете (95% CI 0,971-2,029). При жените резултатите не достигнаха аналогична сигнификантна значимост ($p = 0,081$) Предполагаме, че причина за тази разлика е ограниченият брой изследвани в представителната извадка пациенти с Т1Д или популационни характеристики и особености.

След приложение на ROC анализ може да се обобщи, че Lер има по-добра прогностична стойност при отдиференцирането на мъже с висок ССР спрямо ST1RE (приблизително 80%) и ESC от 2019 г. (приблизително 70%). Изведените прагови стойности са съответно 2,28 ng/ml и 1,38 ng/ml. Разликата в праговите стойности потвърждава описаното по-горе недобро съответствие между скалите за оценка на ССР при Т1Д. При жените Lер има достатъчна диагностична точност при разграничаване на висок от много висок ССР само спрямо ESC от 2019 г. (приблизително 60%) при отрязваща стойност 5,475 ng/ml.

Всяко увеличение в концентрацията на Lер с 1 ng/ml води до увеличение на шанса пациентът да има ≥ 2 рискови фактора ($HbA1C \geq 7\%$, $CRP \geq 3$ mg/l или $AlbU \geq 30$ mg/l) с 1,21 пъти при жените (95% CI 1,05-1,4). ROC анализът демонстрира, че при жените Lер има достатъчна диагностична точност при разграничаване на групи 0 и 1 от групи 2 и 3 на RiskFactor3 (приблизително 70%) с отрязваща стойност от 5,815 ng/ml. При мъжете не се отчете аналогична сигнификантна значимост.

В обобщение от анализираниите четири биомаркери с най-добра прогностична стойност спрямо утвърдени скали за оценка на ССР при Т1Д се оказа Lер. Диагностичната надеждност на маркера при мъжете е по-добра от регистрираната при жените.

6. Хематоморфологични промени и ССР при Т1Д

6.1. Тенденция за анемия при лица с дългогодишен Т1Д

Обработката на данните показва, че средните нива на Hb, HCT, RBC, MCV и MCH са по-ниски при пациентите с Т1Д спрямо отчетените при здравите индивиди. Единствено RDW_CV% е по-висок при болните спрямо контролите. Въпреки че намерените разлики не достигнаха статистическа значимост, бихме могли да направим извод за наблюдавана тенденция на микроцитна, хипохромна анемия с данни за анизоцитоза при лицата с дългогодишен Т1Д, която се задълбочава при лош гликемичен контрол. Отчетохме значимо

по-ниски стойности за MCV и MCH при пациенти с HbA1C% над 7%. Следователно потвърждаваме тезата на голяма част от проучванията, които се срещат в литературата. [19,89,97]

В настоящото проучване установихме почти два пъти по-голям дял на мъже с анемия от групата на T1Д (16,7%) спрямо изследваните от контролната група (9,1%). При T1Д дялът на жени с анемия отново е намерен по-голям от този при контролите, но резултатите са по-близки (20,7 при T1Д спрямо 15,4% при контроли). Анемията е често срещано и недостатъчно разпознато усложнение при пациенти с T1Д. Един на всеки пет (~20%) индивиди с T1Д има нива на Hb под референтни граници. [19,89] Пациентите със ЗД и анемия имат повишен риск от неблагоприятни последици на диабетна ретинопатия, невропатия, нефропатия и ССЗ. [89] Най-обсъждана причина за анемия при ЗД е намаленото производство на еритропоетин от клетките на кортикалния интерстициум, което може да влоши микроваскуларните усложнения. Други причини са системно възпаление, потискане на освобождаването на еритропоетин, медикаменти, бъбречно увреждане, променен метаболизъм на желязото и хронична хипергликемия. [26,89]

Анемията при T1Д се асоциира предимно с автоимунни причини като автоимунен гастрит и пернициозна анемия. [226] Пациентите с автоимунен гастрит често са диагностицирани с желязодефицитна анемия (микроцитна, хипохромна), която може да предшества пернициозна анемия или/и двете да съществуват едновременно. Желязодефицитна анемия се наблюдава при 20-40% от пациентите с автоимунен гастрит, докато пернициозната анемия може да бъде идентифицирана при 15–25% от пациентите. [226] Намалена киселинност на стомаха или хипо/ахлорхидрия при автоимунен гастрит, поради разрушаване на H+/K+АТР-аза-съдържащи париетални клетки, намаляват наличността на желязо за абсорбция и водят до развитие на желязодефицитна анемия. [226] Пернициозната анемия, която се счита за краен стадий на автоимунен гастрит, е следствие от променена абсорбция на витамин В12. В настоящото проучване отчетохме значимо по-високи стойности за MCH и MCV при лицата с давност на диабета над 24 г., което определя тенденция за макроцитоза и е в съответствие с описаните причини за задълбочаване на анемията при лица с дългогодишен T1Д.

Колкото по-висок е ССР според ST1RE и ESC от 2019 г., толкова по-ниска е концентрацията на Hb при лицата с дългогодишен T1Д. При ST1RE отчетохме и статистически значима разлика в Hb концентрация при мъже. Колкото по-голям е броят на РФ (HbA1C >7%, AlbU >30 mg/l и/или CRP >3 mg/l), толкова по-категорична е тенденцията за анемия. Тези констатации са в съответствие с установените при ЗД от редица изследователи. У нас връзката

между наличието на анемия и ССЗ е добре проучена от Димова М. и сътр. (2019) и Georgieva Zh. и сътр. (2012). [6,88] Рискът от анемия при пациенти с диабет се оценява на два до три пъти по-висок от този при пациенти без диабет. [226] Първите доказателства сочат, че случаите на анемия при ЗД обикновено се асоциират с наличие на бъбречно заболяване. [226] Рискът от развитие на анемия при пациенти със ЗД, свързан с ДБЗ, е по-голям, отколкото при пациенти с бъбречно заболяване по други причини. [226] Въпреки това ранната поява на анемия при пациенти без бъбречно заболяване предполага наличието на други причини при тези пациенти. [155] Пациентите с лош гликемичен контрол са изложени на по-висок риск от развиваща се анемия в сравнение с пациенти с добър гликемичен контрол и рискът допълнително нараства с начало на бъбречно заболяване. [20,226]. Следователно скринингът, бързото диагностициране и коригиране на анемията са от решаващо значение за подобряване на клиничните резултати и качеството на живот при пациентите с Т1Д.

6.2. Тенденция за левкоцитоза при лица с дългогодишен Т1Д

Статистическата обработка на резултатите показва значимо по-високи стойности за WBC, Neu и Eo при лицата с дългогодишен Т1Д спрямо случаите от контролната група ($p < 0,05$). Тази констатация е в съответствие с установената от редица изследователи тенденция на левкоцитоза при ЗД. [18,89] Левкоцитозата е един от основните компоненти на възпалителния процес, който допринася за атеросклеротична прогресия и ССЗ. [89] Доказано е, че хематологичните промени значимо повишават вискозитета на кръвта, което се отразява неблагоприятно върху микроциркулацията и води до микро- и макроангиопатия. [89] Пациентите с Т1Д имат по-висок абсолютен брой Neu, което според редица изследователи се асоциира с повишен риск от съдови заболявания. [89] Прекомерната продукция на Neu от костния мозък и участие на маргиналните клетки (от пристенен пул) в циркулационния резервоар обяснява увеличаването на циркулиращите гранулоцити с последваща секреция на провъзпалителни цитокини и адхезионни молекули. В условия на лош гликемичен контрол, какъвто установихме при близо 90% от изследваната кохорта пациенти с Т1Д, ангиотензинът и цитокините се счита, че стимулират образуването на моно- и полиморфонуклеари. [89] В противовес на описаните наблюдения, в проучването на Harsunen M. и сътр. (2013) са изследвани новодиагностицирани възрастни с Т1Д, при които се отчита по-нисък общ брой на WBC, Neu, Ba, Mo и Lu в сравнение с контролните субекти. [102] Според изследователите левкоцитните промени не са следствие от хронична хипергликемия, а предполагат пряко участие на вродения имунитет в патогенезата на Т1Д още преди развитието му с нарушена „левкоцитна хомеостаза“. Не отчетохме сигнификантни разлики за Ba, Mo и Lu между изследваните групи в настоящото проучване.

Наблюдаваната тенденция за левкоцитоза при лицата с Т1Д не се запазва по отношение давността на диабета, което е в противовес на констатациите от едни автори и в съответствие с други. [89,175] Според Adane T. и сътр.(2021) редукция в общия брой на поломофорфонуклеарни WBC се обяснява с функционални промени в клетките. [18] Освен това екстремното производство на цитокини може да доведе до неподходящо активиране, увреждане на тъканите и увеличаване уязвимостта към патогенни микроорганизми. Следователно повишената реакция на Neu при ЗД може да се разглежда като част от диабетната патофизиология.

6.3. Промени в тромбоцитен брой и тромбоцитни индекси при лица с Т1Д

Настоящото проучване демонстрира значимо по-висок брой на PLT и тромбоцитни индекси при пациентите с Т1Д, отколкото при контролите. Само при P-LCR не се установи междугрупова сигнификантна разлика, но отново средните нива са по-високи при лицата с Т1Д. PLT и PCT са значимо по-високи при пациенти с лош гликемичен контрол. Тази констатация е в съответствие с установена от редица изследователи. [18,66,187,269] Установено е, че PLT при ЗД имат повишени изходни нива на активиране, както и повишени реакции на активиране и агрегиране, предизвикани от различни стимули. Променена морфология и функция на PLT се съобщава при пациенти със ЗД. [18] Съществува силна връзка между тромбоцитната дисфункция и тромбоцитната хиперактивност, както при Т1Д, така и при Т2Д. [18,66,187,269] PLT имат нерегулирани сигнални пътища, които водят до повишена тенденция за активиране и агрегиране в отговор на даден стимул. [18] Хиперреактивен фенотип на PLT може да бъде причина за неадекватен отговор при пациенти със ЗД към антиагреганти в сравнение с пациентите без ЗД. [18] Поради микрохеморагии в атероматозните плаки костният мозък получава сигнал да освободи резервни и незрели гигантски PLT. Проучване на Eibl и сътр. показва, че пациенти със ЗД имат по-голяма експресия на маркери за активиране на PLT в сравнение с контролна група без диабет, съответстваща на възрастта. [71]

В настоящото проучване установихме, че спрямо медианата на давността на диабета (24 години), тромбоцитните индекси (MPV, PLC-R) се повишават значимо, но се отчита понижаване в общия брой на PLT. MPV отразява средния размер и функция на PLT. PLC-R е индекс за отношението между PLT и големи клетки и е обратнопропорционален на PLT и пряко свързан с PDW и MPV. PLC-R% се повишава при реактивна тромбоцитоза и се понижава при тромбоцитопения. Последната е друга хематологична аномалия, наблюдавана при ЗД с напредване продължителността на диабета и се асоциира с риск от поява на хематоми или кръвене по време на инсулинови инжекции. [89] По отношение на PLT резултатите от нашето

проучване и наличните в литературата са противоречиви, което налага допълни изследвания в тази област.

Хиперреактивността на PLT при лицата с дългогодишен Т1Д е значима находка в настоящото проучване. Скорошни изследвания установиха, че MPV е силен и независим предиктор за ССУ при ЗД. [131,241] Счита се, че колкото по-висок е MPV, толкова по-вероятно е образуването на тромби и увреждането на съдовия ендотел. MPV корелира положително с адхезията и агрегацията на PLT. По-големите PLT са по-активни поради повишено съдържание на протромботични фактори, като тромбоксан А2, тромбоксан В2, тромбоцитен фактор 4, серотонин и тромбоцитен растежен фактор (PDGF). MPV отразява реактивността на PLT, по-млади и физиологично по-активни, с по-голям протромбогенен потенциал в сравнение с малките зрели PLT. Според последните проучвания MPV е обещаващ биомаркер за стратификация на риска и прогресия на ССЗ. Метаанализ на проучвания тип случай-контрола и напречно сечение показаха, че високият MPV се асоциира положително с честотата и с ангиографската тежест на КАБ. [241]

При мъжете с Т1Д констатирахме значимо по-високи стойности за MPV спрямо здравите мъже. Интересна находка, която установихме, е, че рискът при жените от контролната група да имат MPV над 10% е близо два пъти по висок от мъжете – OR = 1,905 (95% CI: 0,600-6,049), а в групата на лицата с Т1Д се регистрира обратна тенденция. Последната би била отправна точка за поставяне на хипотезата, че мъжете с Т1Д реагират с повишаване на нивата на MPV над 10%, а жените показват противоположна тенденция спрямо контролните случаи. Следователно мъжете с дългогодишен Т1Д показват по-висока активност на PLT и респективно имат по-висок ССР.

Тромбоцитният размер се диференцира по време на мегакариоцитопоезата и тромбоцитопоезата и невинаги корелира положително с тяхната възраст. Няколко проучвания докладват, че MPV корелира негативно с възрастта на PLT. [162] Това вероятно е следствие от компенсаторно ускореното тромбоцитно консумиране с цел поддържане на постоянна функционална активност на тромбоцитната маса. [162] В подкрепа на изказаната хипотеза ние също установихме обратна зависимост между MPV, P-LCR, PDW и тромбоцитния брой, както и между PLT и давността на диабета и възрастта на пациентите с Т1Д. Следователно бихме могли да предположим, че с напредване на възрастта и давността на диабета, дялът на реактивните PLT при Т1Д се увеличава. По-високият изчислен ССР според ST1RE корелира значимо с относителния дял на тромбоцитна анизоцитоза (PDW).

В настоящото проучване идентифицирахме значимо по-високи стойности за всички тромбоцитни показатели (MPV, PLC-R и PLT) при жени спрямо мъже с Т1Д. Изключение

правят резултатите за PDW, които са по-високи при мъжете ($p < 0,05$). В контролната група отново отчетохме превес при жените за средните нива на променливите, но намерените различия не достигнаха сигнификантна значимост с изключение на PCT. Статистическа обработка на данните в нашето изпитване демонстрира и значимо по-високи стойности за PCT и PLT при мъже и жени с Т1Д спрямо мъже и жени от контролната група ($p < 0,05$).

Констатираните полови различия са в съответствие с установените от други изследователи. [23] В проучването на Ali U. и сътр. (2019) са анализирани 2376 проби за пълна кръвна картина на хематологичен анализатор Sysmex XN-10 с оглед извеждане на полово зависими референтни интервали. [23] Изследователите докладват по-високи стойности за MPV, PLC-R и PCT при жените, а за PDW не откриват статистически значима разлика по отношение на пола. Противно на нашите резултати за PDW, част от изследователите също не откриват значими разлики в стойностите за PDW при мъже и жени. [15,39,164] Вероятно обяснение са вариации в преданалитичния етап (метод на венепункция, разлики във времето между вземане на кръв и анализ на пробата, транспорт и съхранение на пробата и т.н.), хетерогенност на изследваните кохорти по възраст и етническа принадлежност, различно съотношение мъже и жени.

Тромбоцитните показатели (PLT, MPV, PDW, P-LCR, PCT) не изискват специализирано хемостазиологично оборудване. Те се определят с автоматични хематологични броячи и са изведени от резултатите за пълна кръвна картина, което определя тяхната рентабилност в клинично-диагностичен план. Потенциалните диагностични приложения на тромбоцитните индекси се разшириха извън пределите на диференциална диагноза на тромбоцитни нарушения. Вариации в PLT, MPV, PDW, PLC-R и PCT са свързани с ССЗ, автоимунни и възпалителни заболявания. Ето защо извеждането на референтни стойности в зависимост от пола определя нуждата от допълнителни многоцентрови и мултиетнически проспективни проучвания, за да се потвърди използването им в рутинната клинично-лабораторна практика.

6.4. Зависимости между ADMA, OPG и хематоморфологичните показатели

В настоящото проучване изследвахме връзката между ADMA, OPG и хематоморфологичните показатели. При лицата от контролната група установихме значима отрицателна корелация между серумните нива на посочените биомаркери и средните нива на Hb и MCHC ($p < 0,05$). При патологични условия (Т1Д) тези зависимости се запазиха само по отношение на OPG. В допълнение анализирахме влиянието на OPG като променлива върху концентрацията на Hb при пациентите с Т1Д от различни категории ССР според ST1RE и ESC от 2019 г. Констатирахме, че 21,8% от измененията в стойността на Hb, но само при мъже с много висок ССР, според ST1RE могат да се обяснят с повишаване в серумните нива

на OPG, а според ESC от 2019 г. – 13,7%. При мъжете от група 2 според Riskfactor3 23,5% от измененията в Hb концентрация могат да се обяснят по аналогичен начин. Следователно увеличението в серумните нива на ADMA и OPG предполага развитието на анемия, като мъжете са по-уязвими от жените с Т1Д. Тази тенденция се потвърждава и при анализиране на корелационните зависимости между еритроцитните променливи и утвърдените скали за оценка на ССР при Т1Д (ST1RE и ESC от 2019 г.), както и с предложения модел RiskFactor3.

Резултатите от корелационния анализ между тромбоцитните показатели и серумните нива на биомаркерите (ADMA и OPG) демонстрираха интересна отрицателна зависимост между MPV и ADMA ($r = -0,188$, $p = 0,045$). В допълнение установихме, че 19,8% от измененията в MPV при мъже с много висок ССР според ST1RE могат да се обяснят с вариации в серумните нива на ADMA. Не намерихме идентична асоциация в проучената от нас литература. В проучването на Gawrys J. и сътр., 2020 г. е определена концентрацията на интратромбоцитна ADMA и е оценена връзката ѝ с активиране и агрегация на PLT при ЗД. [98] Изследователите считат, че патофизиологията на променената функция на PLT в отговор на увреждане на глюкозния метаболизъм следва да бъде детайлно проучена с оглед отчетената висока резистентност към антитромботичната терапия. Gawrys J. и сътр. не отчитат корелация между плазмените нива на ADMA и интратромбоцитната ADMA, но установяват по-висока средна концентрация на последната при пациенти със ЗД спрямо контроли. Интратромбоцитната ADMA корелира с повишена активност на PLT, оценена с АДФ-индуцираната агрегация. [98]

6.5. Зависимости между ADNC, Lер и хематоморфологичните показатели

Статистическа обработка на резултатите от настоящото изпитване демонстрира отрицателна корелационна зависимост между серумните нива на ADNC и редица левкоцитни променливи. Ранни проучвания съобщават, че ADNC е отрицателен регулатор на хематопоезата и имунната функция. [61] ADNC е идентифициран като растежен фактор за хемопоеични стволови клетки, а серумните нива на ADNC се свързват обратно пропорционално с риска от хронична лимфоцитна левкемия, остра миелоидна левкемия, миелодиспластичен синдром и мултиплен миелом. [61] ADNC се синтезира от Lum, а неговите рецептори, AdipoR1 и AdipoR2, се експресират от прекурсорни клетки в костния мозък. Счита се, че ADNC упражнява инхибиращ ефект върху образуването на гранулоцитно-макрофагов колония-стимулиращ фактор. Нашите резултати потвърдиха значима отрицателна връзка между серумните нива на ADNC и общия брой WBC, Neu, Мо и Ly ($p < 0,05$) при здрави индивиди и при пациенти с дългогодишен Т1Д. Следователно функционалната роля на ADNC

като отрицателен регулатор върху левкопоезата (противовъзпалителен ефект) се запазва и при патофизиологични условия.

В настоящото проучване констатирахме значими корелационни връзки между левкоцитните променливи (общ брой WBC, Мо и Ly) и серумните нива на Lер, но само в групата на Т1Д ($p < 0,05$). За разлика от ADNC, при Lер установените корелации са положителни и потвърждават провъзпалителния ефект на хормона. Според редица изследователи Lер участва в механизмите на левкоцитоза при ЗД и последващо развитие на микро- и макроангиопатии. LEPRs са открити в Neu, Мо и Ly. [130] Експресия на LEPRs се установява и в имунни клетки, с което се обяснява и участието на Lер във вродения и придобития имунитет. [50] Lер модулира неутрофилното активиране, моноцитно-макрофагиалната продукция на цитокини и потенцира цитотоксичността на НК-клетките. От друга страна, хормонът стимулира В-клетъчната пролиферация и редуцира Т- и В-клетъчната апоптоза или обобщено, Lер оказва проинфламаторно въздействие върху имунната система. [50] Ограничен е броят на проучванията, които изследват насочено връзката на Lер с WBC при Т1Д.

За разлика от противоположните зависимости, които установихме при ADNC и Lер спрямо WBC в настоящото изпитване, връзката с еритроцитните променливи е отрицателна и при двата биомаркера. Констатирахме, че колкото по-високи са серумните нива на адипокините, толкова по-голяма е тенденцията за микроцитна, хипохромна анемия с наличие на анизоцитоза при лицата с дългогодишен Т1Д. Следователно отрицателната регулаторна роля на ADNC върху левкопоезата се запазва и върху еритропоезата. Особено внимание заслужава фактът, че при здравите индивиди серумните нива на ADNC се асоциират отрицателно само с RBC, Hb и HCT, докато с Lер не се отчита нито една значима корелация. Предвид описаните наблюдения за желязодефицитна анемия при ЗД и морфологичната ѝ класификация на микроцитна, хипохромна анемия, предполагаме участие на адипокините в развитието ѝ.

Констатирахме, че 21% от измененията в серумните нива на ADNC при лицата с Т1Д и респективно 24% при здравите индивиди могат да се обяснят с вариации в Hb концентрация и WBC. Последващ регресионен анализ в зависимост от категорията на ССР според ST1RE демонстрира, че промените в серумните нива на ADNC прогнозира 54,8% от вариациите в Hb и WBC при мъже с умерено висок риск и 29% при жени с нисък риск. Според насоките на ESC от 2019 г. установихме значимост на регресионния модел за мъже с висок (23,5%) и много висок риск (10,2%) и жени с много висок риск (13,2%). Следователно резултатите за серумни

нива на ADNC кореспондират с описаната тенденция за анемия и левкоцитоза при лица с дългогодишен Т1Д, като отново по-уязвими се оказват мъжете спрямо жените.

Не установихме значими корелационни зависимости между серумните нива на ADNC и тромбоцитните показатели, но отчетохме положителна връзка между Lер (ng/ml) и: PCT и PLT ($p < 0,05$). Класифициран като цитокин, Lер допълва проинфламаторния си ефект посредством въздействие върху функцията на PLT и респективно упражняване на протромбогенен ефект. При *in vitro* и *ex vivo* проучвания се установява, че Lер потенцира АДФ-стимулираната тромбоцитна агрегация. [162] Тази зависимост е в консенсус с наличните литературни данни за вероятна Lер-медирана тромбоцитоза с хиперреактивност и последваща тромбогенеза. Описаните механизми са инициирани от свързването на Lер с ObRb, експресирани в тромбоцитната мембрана като начален етап и активиране на JAK/Stat сигнална система като втори посредник. [162]

В настоящото изпитване констатирахме, че 24,6% от измененията в Lер концентрация при жени могат да се обяснят с промени в тромбоцитните показатели (MPV, PDW, PCT и PLT), а при мъжете не се отчете статистическа значимост. При жени с много висок ССР според ESC от 2019 г. отчетеното влияние се равнява на 28,4%. По отношение на Т1Д литературните данни са инсуфициентни. Не намираме обяснение за липсата на статистическа значимост при мъже. Този факт налага нуждата за допълнителни изследвания в по-големи кохорти, които да анализират прецизно наблюдаваната тенденция.

В настоящото проучване отчетохме, че 17,8% от промените в: Hb (g/l), WBC и PLT прогнозира изменения в серумните нива на Lер при пациенти с Т1Д и обратно. По-нататъшна обработка на данните спрямо ST1RE демонстрира статистическа значимост на регресионния модел при мъже с много висок ССР като отчетеното влияние е 19,7%, а при жени с нисък ССР – 32,1%. По отношение на ESC от 2019 г. съответно – 18,9% за мъже и 14,8% за жени с много висок ССР.

В обобщение, докато регулаторната роля на ADNC върху хематопоезата се констатира при физиологични и патофизиологични условия в настоящото изпитване, то при Lер се коментира основно при пациентите с Т1Д. Този факт предполага патологично-обусловени механизми на Lер върху хематопоезата и налага нуждата от допълнителни изследвания.

VII. ИЗВОДИ

1. При пациентите с Т1Д се установява значима положителна корелация между стойността на AlbU и серумните нива на **ADMA**. В комбинация с определяне на HbA1C, AlbU прогнозира 15% от концентрацията на **ADMA** при изследваните лица с Т1Д.
2. **ADMA** като самостоятелен биомаркер няма достатъчно добра диагностична ефективност в отдиференциране на пациенти с много висок ССР съгласно критериите на утвърдени модели като ST1RE и ESC от 2019 г.
3. **OPG** има добра прогностична стойност (приблизително 70%) за мъже и жени спрямо ST1RE при отдиференциране на лица с висок ССР. При ESC от 2019 г. **OPG** има добра прогностична стойност при отдиференциране на жени с много висок ССР – приблизително 65%. Прагови стойности на **OPG** $\geq 5,075$ pmol/l за мъже и $\geq 5,355$ pmol/l за жени спрямо ST1RE и $\geq 5,025$ pmol/l за жени спрямо ESC от 2019 г. насочват към много висок ССР и налагат неотложни превантивни мерки.
4. Възрастта на пациентите, давността на диабета и наличието на микро/макроалбуминурия са значими положителни детерминанти за серумните нива на **OPG** при лица с дългогодишен Т1Д.
5. **ADNC** като самостоятелен биомаркер няма достатъчно добра диагностична ефективност в отдиференциране на пациенти с много висок ССР съгласно критериите на специфични за Т1Д инструменти за оценка на ССР – ST1RE и ESC от 2019 г.
6. При жени с Т1Д се установява отрицателна корелационна връзка между **ADNC** и CRP, а при здравите жени – 58,6% от дисперсията в измерените концентрации на AlbU се асоциират с дисперсия в резултатите за **ADNC**.
7. При мъжете от двете изследвани групи се наблюдава тенденция за увеличаване на концентрацията на **Lep** с напредване на възрастта. При мъжете с Т1Д, независимо положително влияние върху серумните нива на **Lep** има и стойността на AlbU – 11,9%.
8. При жените значими положителни детерминанти за серумните нива на **Lep** са AlbU и CRP. Посочените променливи прогнозират 23,8% от измененията в серумната концентрация на **Lep** при жени с дългогодишен Т1Д и 29,4% при здрави жени.
9. **Lep** има много добра диагностична ефективност при отдиференциране на мъже с много висок ССР спрямо ST1RE (приблизително 80%) и ESC от 2019 г. (приблизително 70%). Изведените прагови стойности са съответно $\geq 2,28$ ng/ml и $\geq 1,38$ ng/ml. Всяко увеличение на концентрацията на **Lep** с 1 ng/ml води до увеличение на шанса при мъжете да попаднат в категория на много висок ССР с 1,7 пъти според ST1RE и с 1,404 пъти спрямо ESC от

2019 г. При жените **Lep** има достатъчна диагностична ефективност спрямо ESC от 2019 г. (приблизително 60%) при прагова стойност $\geq 5,475$ ng/ml.

10. При лицата с дългогодишен Т1Д се наблюдава положителна асоциация между серумните нива на **OPG**, **ADNC**, **Lep** и тенденция за микроцитна, хипохромна анемия. По отношение на левкоцитните променливи адипокините оказват противоположно действие: **ADNC** е отрицател регулатор, а **Lep** – положителен.
11. При мъжете с дългогодишен Т1Д и изчислен много висок ССР, според утвърдени модели ST1RE и ESC от 2019 г., рискът от развитие на анемия е по-голям от този при жените с Т1Д.
12. Значима находка в настоящото проучване е хиперреактивността на PLT при лицата с дългогодишен Т1Д, която кореспондира със серумните нива на **Lep** и **ADMA**.

VIII. ПРИНОСИ

1. Приноси с оригинален характер

- 1.1. За първи път в България се оцени прогностична стойност на ADMA, OPG, ADNC и Lер спрямо специфични инструменти за оценка на ССЗ: ST1RE и ESC от 2019 г. при лица с дългогодишен Т1Д.
- 1.2. За първи път в България се оцени прогностична стойност на ADMA, OPG, ADNC, Lер и показателите от кръвната картина спрямо конструиран модел – комбинация от утвърдени в клиничната практика РФ за развитие на ССЗ при ЗД (RiskFactor3: HbA1C $\geq 7\%$, CRP ≥ 3 mg/l и AlbU ≥ 30 mg/l).
- 1.3. За първи път в България се оцени влиянието на хаматоморфологични показатели върху серумните нива на ADMA, OPG, ADNC и Lер и връзката им със ST1RE и ESC от 2019 г. при лица с дългогодишен Т1Д.
- 1.4. За първи път в България се анализираха хематологични промени при лица с Т1Д с голяма давност и незадоволителен контрол.

2. Приноси с теоретичен и научно-приложен характер

- 2.1. Потвърдено е значението на OPG като прогностичен фактор, влияещ на риска от ССЗ при лица с дългогодишен Т1Д.
- 2.2. Потвърдено е значението на Lер като прогностичен фактор, влияещ на риска от ССЗ при лица с дългогодишен Т1Д.
- 2.3. Потвърдено е значението на AlbU като независима променлива върху серумните нива на ADMA, OPG, ADNC и Lер.
- 2.4. Потвърдено е значението на ИТМ и CRP върху серумните нива на адипокините.
- 2.5. Потвърдена е регулаторната на роля на адипокините върху хематопоезата при лица с дългогодишен Т1Д и здрави контроли.
- 2.6. Потвърдена е нуждата от извеждане на полово-зависими референтни стойности за тромбоцитните индекси (MPV, PLC-R, PDW, PCT) и имплементирането им в рутинната клинично-лабораторна практика.

IX. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Бончева М. Повишени концентрации на ADMA в серум или урина са рисков фактор и предиктор на ендотелна дисфункция. MEDINFO. 2013, 1:50-54.
2. Бояджиева М., Христовоз К. Остеопротегерин при диабетици – клинично значение, връзка с гликемичния контрол и възпалителни маркери. Ендокринология. 2006,11 (3): 141-148.
3. Боянов М., Ал-Тамими, Маркова Ал., Бакалов Д. Изчислен сърдечно-съдов (СС) риск при пациенти с тип 2 захарен диабет на перорално лечение с висок или много висок СС-риск според указанията на Европейското дружество по кардиология (ESC) от 2019 година. Ендокринология. 2021, 26 (2): 105-118.
4. Георгиева Ж. и сътр., Биомаркери при сърдечно-съдови заболявания. От патогенезата до прогнозата., Арбилис, София, България. 2016,11-55.
5. Данни от регистъра на болните от захарен диабет в Република България. www.usbale.org
6. Димова М. Анемия и сърдечно-съдови промени. Варна, МУ-Варна. 2019, 224.
7. Колева Д., Обрецова М, Денева Т. Асиметричен диметил-аргинин - медиатор на ендотелна дисфункция и връзката му със синдроми на инсулинова резистентност. Endocrinologia. 2013,18:33-40.
8. Колева Д. Хормони на мастната тъкан, регулатори на апетита и телесното тегло и ендотелна функция при жени с инсулинова резистентност. Автореферат. МУ-Пловдив, 2017.
9. Латева М., Йотова В., Попова Р., Галчева С., Георгиева М., Червенков Т., Бочева Я. Адипонектин, маркери на метаболитен риск и абдоминално затлъстяване в предучилищна възраст. Варненски медицински форум. 2015; 4(2): 36-46.
10. Маркова Ал. Роля на биохимичните маркери и калкулатори за сърдечно-съдов риск при захарен диабет тип 2. Автореферат. МУ - София, 2021.
11. Николов П., Ендотелна дисфункция и коронарна болест, Пловдив, 2019.
12. Петрова Ю., Манолов В., Ангов Г., Петрова И., Василев В., Цачев К. Asymmetric dimethylarginine – рисков фактор и маркер за атеросклероза. Медицински преглед, 2016,52:4.
13. Раянова Г., Ганева С., Тодорова К., Луканов Цв., Гечева Св. Адипонектин, лептин и резистин при пациенти с метаболитен синдром, Ендокринология. 2015,20(3):134-138.
14. Чернева Ж., Господинова М., Денчев С., Чернева Р. Метаболитна памет и сърдечно-съдови усложнения при пациенти със захарен диабет. Сърдечно-съдови заболявания. 2018;49:1.
15. Abass A., Ismail I., Razazyahia, Ali E., Mohammed R., Mohammed S. Reference value of platelets count and indices in Sudanese using Sysmex KX-21. Int J Healthcare Sci. 2015,3:120–125.
16. Abraham A. et al. "Role of plasma adiponectin/C-reactive protein ratio in obesity and type 2 diabetes among African Americans." African Health Sciences. 2017,17(1): 99-107.
17. Achari A, Jain S. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. Int J Mol Sci. 2017,18(6):1321.
18. Adane T., Asrie F., Getaneh Z., Getawa S. White blood cells and platelet profiles of diabetic patients at University of Gondar specialized referral hospital: A comparative cross-sectional study. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2021, 35(6): e23808.
19. Adane T., Getawa, S. Anaemia and its associated factors among diabetes mellitus patients in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. Endocrinology, diabetes & metabolism. 2021,4(3):e00260.
20. Adejumo B et al. The incidence of anemia and the impact of poor glycemic control in type-2 diabetic patients with renal insufficiency. J Biol Agric Healthc 2013; 3(13):130–7.
21. Adeloje D, Chan K, Thorley N, et al. Global and regional estimates of the morbidity due to type I diabetes among children aged 0-4 years: a systematic review and analysis. J Glob Health. 2018,8(2):021101.
22. Adya R., Tan B. K., Randeва H. S. Differential effects of leptin and adiponectin in endothelial angiogenesis. J. Diabetes Res. 2015,1:12.
23. Ali U, Gibbs R, Knight G, Tsitsikas D. Sex-divided reference intervals for mean platelet volume, platelet large cell ratio and plateletcrit using the Sysmex XN-10 automated haematology analyzer in a UK population. Hematol Transfus Cell Ther. 2019,41(2):153-157.

24. Alkaabi J. et al. "Relationship between lipid profile, inflammatory and endothelial dysfunction biomarkers, and type 1 diabetes mellitus: a case-control study." *American Journal of Translational Research*. 2022,14(7): 4838.
25. ALKAÇ C. et al, "Osteoprotegerin as a marker of atherosclerosis in type 1 and type 2 diabetic patients," *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2015,45(6):19.
26. Allende R, de Entresotos L, Díez S. Anaemia of chronic diseases: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Med Clin*. 2021,156(5): 235–242.
27. Alpoim P, Sousa L, Mota A, Rios D, Dusse L. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in cardiovascular and renal disease. *Clin Chim Acta*. 2015,440:36-9.
28. American Diabetes Association Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021,44:125–150.
29. American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. *J Bone Miner Res*. 2000,15(12):2293-6.
30. Atwa H, Shora H, Elsayed A. Hormonal, Metabolic and Radiological Markers of Subclinical Atherosclerosis in Egyptian Children with Type 1 Diabetes. *Rep Endocr Disord*. 2018,2(1).
31. Augoulea A., Vrachnis N., Lambrinoukaki I. et al., "Osteoprotegerin as a marker of atherosclerosis in diabetic patients," *International Journal of Endocrinology*. 2013,6:182060.
32. Azar S, Zalloua P, Zantout M, Shahine C, Salti I. Leptin levels in patients with type 1 diabetes receiving intensive insulin therapy compared with those in patients receiving conventional insulin therapy. *J Endocrinol Invest*. 2002;25(8):724-6.
33. Baud'huin M., Duplomb L., Teletchea S. et al., "Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions," *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2013, 24(5): 401–409.
34. Bernardi S, Bossi F, Toffoli B, Fabris B. Roles and Clinical Applications of OPG and TRAIL as Biomarkers in Cardiovascular Disease. *Biomed Res Int*. 2016:1752854.
35. Biscetti F, Giovannini S, Straface G, Bertucci F, Angelini F, Porreca C, Landolfi R, Flex A. RANK/RANKL/OPG pathway: genetic association with history of ischemic stroke in Italian population. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20:4574–4580.
36. Bjerre M., "Osteoprotegerin (OPG) as a biomarker for diabetic cardiovascular complications," *SpringerPlus*. 2013,2:658
37. Bjerre M. et al, Serum osteoprotegerin as a long-term predictor for patients with stable coronary artery disease and its association with diabetes and statin treatment: A CLARICOR trial 10-year follow-up substudy, *Atherosclerosis*. 2020,301:8-14.
38. Borges M, Lawlor D, de Oliveira C, White J, Horta BL, Barros AJ. Role of adiponectin in coronary heart disease risk: a Mendelian randomization study. *Circ Res* 2016;119:491–49.
39. Botma J., Mogongoa L., Jaftha A., Janse van Rensburg W. Reference ranges for platelet indices using Sysmex XE-2100 blood analyser. *Med Technol SA*. 2012;26:17–21.
40. Bouras G. et al, Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? *Curr Top Med Chem*. 2013;13(2):180-200.
41. Boyadzhieva M., Hristozov K., Georgiev Sv., Yordanov R., Chervenkov T. High osteoprotegerin serum levels in newly-diagnosed type 2 diabetic males without known coronary artery disease. *Scripta Scientifica Medica*. 2013, 45(3): 65-68.
42. Browner W, Lui L, Cummings S. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):631-7.
43. Cardiovascular disease and risk management: Standarts of medical care in diabetes- 2020. *Diabetes care*. 2020, 43(1):111-134.
44. Cecilia C, Wang L, Michels A. The Missing Link for Cardiovascular Disease in Type 1 Diabetes Mellitus? Hyperglycemia-induced Cardiac Autoimmunity. An ACC expert analysis, 2019.
45. Cederholm J, Eeg-Olofsson K, Eliasson B, Zethelius B, Gudbjörnsdottir S, Swedish National Diabetes R. A new model for 5-year risk of cardiovascular disease in Type 1 diabetes; from the Swedish National Diabetes Register (NDR). *Diabet Med*. 2011; 28:1213–1220.

46. Ceriello A., Monnier L., Owens D. Glycaemic Variability in Diabetes: Clinical and Therapeutic Implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7:221–230.
47. Chaurasia B., Summers S., Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders, *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2015, 26(10): 538-550.
48. Cheng J. et al. Sex-and body mass index-specific reference intervals for serum leptin: a population based study in China. *Nutrition & metabolism.* 2022, 19(1):1-8.
49. Chillarón J., Flores Le-Roux J., Benaiges D., Pedro-Botet J. Type 1 Diabetes, Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk. *Metabolism.* 2014;63:181–187.
50. Chimen M. Immunomodulation by adipokines in type 1 diabetes, PhD. A thesis submitted to the university of Birmingham, 2012.
51. Chiu H. et al. The association of leptin and C-reactive protein with the cardiovascular risk factors and metabolic syndrome score in Taiwanese adults. *Cardiovascular diabetology.* 2012,11(1):1-9.
52. Chow E., Heller S. Pathophysiology of the Effects of Hypoglycemia on the Cardiovascular System. *Diabet. Hypoglycemia.* 2012;5:3–8.
53. Christou G., Kiortsis N. The role of adiponectin in renal physiology and development of albuminuria, *Journal of Endocrinology.* 2014,221(2):49-61.
54. Chrysis D., Efthymiadou Al., Mermigka Al., Kritikou D., Spiliotis B. Osteoprotegerin, RANKL, ADMA, and Fetuin-A serum levels in children with type I diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes.* 2017,18(4): 277-282.
55. Chun-Cui D., Chengcheng M., Hai-Qin T. Increased Circulating Osteoprotegerin Levels in Type 1 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-analysis Based on Observational Studies, *Immunological Investigations.* 2020,50(2-3):101-112.
56. Clancy P, Oliver L, Jayalath R, Buttner P, Golledge J. Assessment of a serum assay for quantification of abdominal aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2574–6.
57. Colom C. et al, Associations between Epicardial Adipose Tissue, Subclinical Atherosclerosis and High-Density Lipoprotein Composition in Type 1 Diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* 2018,17:156.
58. Colom C, Rull A, Sanchez-Quesada JL, Pérez A. Cardiovascular Disease in Type 1 Diabetes Mellitus: Epidemiology and Management of Cardiovascular Risk. *J Clin Med.* 2021,10(8):1798.
59. Corsonello A, Malara A, De Domenico D, Perticone F, Valenti A, Buemi M, Ientile R, Corica F. Identifying pathways involved in leptin-dependent aggregation of human platelets. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004, 28:979 –984.
60. Costacou T., et al. "The prospective association between adiponectin and coronary artery disease among individuals with type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study." *Diabetologia.* 2005,48(1): 41-48.
61. Crawford J. et al. Adiponectin is produced by lymphocytes and is a negative regulator of granulopoiesis. *Journal of leukocyte biology.* 2010, 88(4):807-811.
62. D'Elia L., Giaquinto, A., De Luca, F., Strazzullo, P., & Galletti, F. Relationship between circulating leptin levels and arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention.* 2020, 27(6):505-513.
63. Dabelea D. et al. "Effect of type 1 diabetes on the gender difference in coronary artery calcification: a role for insulin resistance? The Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) Study." *Diabetes.* 2003, 52(11): 2833-2839.
64. DCCT/EDIC Research Group. de Boer I.H., Sun W., Cleary P.A., Lachin J.M., Molitch M.E., Steffes M.W., Zinman B. Intensive Diabetes Therapy and Glomerular Filtration Rate in Type 1 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2011;365:2366–2376.
65. de Ferranti S, de Boer I, Fonseca V. et al. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2014, 37(10):2843-2863.
66. Demirtas L. et al, Association of hematological indices with diabetes, impaired glucose regulation and microvascular complications of diabetes. *International journal of clinical and experimental medicine.* 2015, 8(7): 11420.

67. Deneva-Koycheva T. et al, Plasma asymmetric dimethylarginine levels in healthy people. *Folia Medica*. 2011; 53(1): 28-33.
68. Diabetes and cardiovascular disease. Published by the International Diabetes Federation. International Diabetes Federation, 2016.
69. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Research Group. Risk factors for cardiovascular disease in type 1 diabetes. *DIABETES*. 2016;65:1370-9.
70. Dozio E. et al Comment on: Adipokines, hormonal parameters, and cardiovascular risk factors: similarities and differences between patients with erectile dysfunction of arteriogenic and nonarteriogenic origin. *J Sex Med*. 2013;10(2):613.
71. Eibl N. et al, Improved metabolic control decreases platelet activation markers in patients with type-2 diabetes. *European journal of clinical investigation*. 2004, 34(3):205-209.
72. Elbana M., Said N., Baraka A., Mousa M. Study The Association between Serum Osteoprotegerin and Diabetic Kidney Disease. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2022, 87(1):1297-1302.
73. Eleuterio M. et al. "Positive correlations between circulating adiponectin and MMP2 in preeclampsia pregnant." *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. 2015,5(2): 205-208.
74. Elsamahy M, Elhenawy Y, Nawar M. Plasma osteoprotegerin concentrations in type 1 diabetic patients with albuminuria. *J Diabetes Complications*. 2015,29(4):563-7.
75. Erkmén C., Tığ G., Uslu B. Nanomaterial-based sandwich-type electrochemical aptasensor platform for sensitive voltammetric determination of leptin. *Microchim Acta*. 2022, 189: 396.
76. Ersoy B, Eroğlu N, Çetin M, Onur E, Özkol M, Coşkun Ş. Asymmetric dimethylarginine levels and diabetes duration: Relationship with measures of subclinical atherosclerosis and cardiac function in children and adolescents with Type 1 diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. 2018,15(3):196-203.
77. Etsuro I, Kanako I, Teruki Y., Kazunari N., Satoshi W., Chapter Four - Early diagnosis with ultrasensitive ELISA, *Advances in Clinical Chemistry*, Elsevier. 2021,101:121-133.
78. Fadhel B. et al, Relationship between Serum Asymmetric Dimethyl L-arginine and Type1 Diabetes Mellitus. *Life Sci J*. 2014;11(12):846-852.
79. Farcaş D., Rusu A., Stoia A.,Vida-Simiti A.. Plasma leptin, but not resistin, TNF- α and adiponectin, is associated with echocardiographic parameters of cardiac remodeling in patients with coronary artery disease. *Cytokine*. 2018,103:46-49.
80. Fekih O, Triki H, Triki S, Neffati F, Chouchane S, Guediche M, Najjar M. Osteoprotegerin as a marker of cardiovascular risk in children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*. 2017,18(3):230-236.
81. Fellahi S. et al, Comparison of two techniques of adiponectin assay, ELISA and immunoturbidimetry: Should we move towards standardization?. *Diabetes & metabolism*. 2017,43(4):395-397.
82. Fogarty R et al, Relationship between DDAH gene variants and serum ADMA level in individuals with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2012,26(3):195-8.
83. Friedman J. Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nat Metab*. 2019,1(8):754–764.
84. Fujishima Y, Maeda N, Matsuda K, et al. Adiponectin association with T-cadherin protects against neointima proliferation and atherosclerosis. *FASEB J*. 2017,31:1571–158.
85. Funcke B. Monogenic forms of childhood obesity due to mutations in the leptin gene. *Molecular and cellular pediatrics*. 2014,1(1):1-8.
86. Galcheva S., V. Iotova, Y. Yotov, S. Bernasconi, M. Street. Circulating proinflammatory peptides related to abdominal adiposity and cardiometabolic risk factors in healthy prepubertal children. *European Journal of Endocrinology*. 2011,164: 553-58.
87. Ganjali S., Dallinga-Thie G.M., Simental-Mendía L.E., Banach M., Pirro M., Sahebkar A. HDL Functionality in Type 1 Diabetes. *Atherosclerosis*. 2017,267:99–109.
88. Georgieva Zh., Klisarova A. Effect of preductal in patients with cor anaemicum: assessment of myocardial perfusion. *Scripta Scientifica Medica*. 2012; 44(2): 69-72.
89. Getawa S., Adane T. Hematological abnormalities among adults with type 1 diabetes mellitus at the University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital. *SAGE open medicine*. 2022,10:20503121221094212.

90. Ghadge A, Khaire A. Leptin as a predictive marker for metabolic syndrome. *Cytokine*. 2019,121:154735.
91. Ghebremariam Y, Erlanson D, Yamada K, Cooke J. Development of a dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) assay for high-throughput chemical screening. *J Biomol Screen*. 2012;17(5):651-661.
92. Gijón-Conde T, Graciani A, Guallar-Castillón P, Aguilera MT, Rodríguez-Artalejo F, Banegas JR. Leptin Reference Values and Cutoffs for Identifying Cardiometabolic Abnormalities in the Spanish Population. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2015,68(8):672-9.
93. Gogitidze J, Hedrington M, Briscoe V, Tate D, Ertl A, Davis S. Effects of acute hypoglycemia on inflammatory and pro-atherothrombotic biomarkers in individuals with type 1 diabetes and healthy individuals. *Diabetes Care*. 2010,33(7):1529-35.
94. Gordin D, Soro-Paavonen A, Thomas MC, Harjutsalo V, Saraheimo M, Bjerre M, Forsblom C, Flyvbjerg A, Groop PH; FinnDiane Study Group. Osteoprotegerin is an independent predictor of vascular events in Finnish adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013,36(7):1827-33.
95. Goto M, Goto A, Morita A, et al. Low-molecular-weight adiponectin and high-molecular-weight adiponectin levels in relation to diabetes. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(2):401-407.
96. Grauslund J., Rasmussen L., Green A., Sjølie A., "Does osteoprotegerin relate to micro- and macrovascular complications in long-term type 1 diabetes?" *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 2010,70,(3):188–193.
97. Grossman C, Dovrish Z, Koren-Morag N, et al. Diabetes mellitus with normal renal function is associated with anaemia. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014,30(4): 291–296.
98. Gawryś J et al. Increased Intraplatelet ADMA Level May Promote Platelet Activation in Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:6938629.
99. Halberg N. et al, Systemic Fate of the Adipocyte-Derived Factor Adiponectin. *Diabetes* 1. 2009,58(9): 1961–1970.
100. Hallstrom S, Pivodic A, Rosengren A, Olafsdottir AF, Svensson AM, Lind M. Risk factors for atrial fibrillation in people with type 1 diabetes: an observational cohort study of 36,258 patients from the Swedish national DiabetesRegistry. *Diabetes Care*. 2019,42:1530-8.
101. Hameed E. et al. "Serum Asymmetric Dimethylarginine, and Adiponectin as Predictors of Atherosclerotic Risk among Obese Egyptian Children." *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2014,2(2): 209-214.
102. Harsunen H. Reduced blood leukocyte and neutrophil numbers in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Hormone and metabolic research*. 2013, 45(06):467-470.
103. Heilman K. et al, Elevated plasma adiponectin and decreased plasma homocysteine and asymmetric dimethylarginine in children with type 1 diabetes, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2009, 69 (1): 85-91.
104. Hippisley-Cox J, Coupland C, Brindle P. Development and validation of QRISK3 risk prediction algorithms to estimate future risk of cardiovascular disease: prospective cohort study. *BMJ Clin Res*. 2017,357:2099.
105. Hoffman P., Dye S., Huang H., Bauer A. Glycemic variability predicts inflammation in adolescents with type 1 diabetes. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2016, 29(10):1129-1133.
106. Holland W., Miller R., Wang Z. et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med*. 2011,17:55–63.
107. Horowitz J, Heresztyn T, An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: Methodological considerations, *Journal of Chromatography B*. 2007,851(1–2):42-50.
108. Howlader M. et al. "Adiponectin gene polymorphisms associated with diabetes mellitus: A descriptive review." *Heliyon*. 2021,7(8): e07851.
109. Huang J., Peng X., Dong K., Tao J., Yang, Y. The association between insulin resistance, leptin, and Resistin and diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus patients with different body mass indexes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2021,14:2357-2365.
110. Huemer M. et al, Low Levels of Asymmetric Dimethylarginine in Children with Diabetes Mellitus Type I Compared with Healthy Children. *The Journal of Pediatrics*. 2011, 158 (4): 602-606.
111. Hui W., Wei L. and Daniel T. Leptin in Thrombosis and Atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*. 2014,20:641-645.

112. Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ* 2006;332:73–78.
113. Huxley R, Peters S, Mishra G, Woodward M. Risk of all-cause mortality and vascular events in women versus men with type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2015;3(3):198–206.
114. İnce B., Sezgingtürk M., A high sensitive and cost-effective disposable biosensor for adiponectin determination in real human serum samples, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021,328.
115. International Diabetes Federation. *Diabetes atlas 10th edition*. 2021.
116. Iotova V., B. Toshkina, Y.Yotov, I. Stoeva, K.Petrova. V.Tzaneva. Adiponectin is reduced in 10-year-old children born small for gestational age (SGA). *Horm Research* 2006; 65 (4): PO2-596,173.
117. Isidori A. Leptin and aging: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weights. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000;85(5):1954-1962.
118. Jamiołkowska M. et al. Impact of Real-Time Continuous Glucose Monitoring Use on Glucose Variability and Endothelial Function in Adolescents with Type 1 Diabetes: New Technology—New Possibility to Decrease Cardiovascular Risk? *J. Diabetes Res*. 2016, 2016:4385312.
119. Jianfei Y., Yuxiang D., Huanhao M, Weifeng Zh, Jing Zh. Prognostic value of asymmetric dimethylarginine in patients with coronary artery disease: A meta-analysis, *Nitric Oxide*. 2021,109–110: 50-56.
120. Jing L. et al, Relationship between Serum Asymmetric Dimethylarginine Level and Microvascular Complications in Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *Hindawi BioMed Research International*. 2019, 2941861: 8.
121. Jorsal A, Tarnow L, Flyvbjerg A, Parving HH, Rossing P, Rasmussen LM. Plasma osteoprotegerin levels predict cardiovascular and all-cause mortality and deterioration of kidney function in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetologia*. 2008;51(11):2100-7.
122. Jorsal A. et al, Urinary adiponectin excretion rises with increasing albuminuria in type 1 diabetes, *Journal of Diabetes and its Complications*. 2013, 27(6): 604-608.
123. Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-h.ljunj../08dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *J Biol Chem*. 1970;245:5751–8.
124. Kalkman HO. An Explanation for the Adiponectin Paradox. *Pharmaceuticals*. 2021; 14(12):1266.
125. Karamifar H. et al. "Adiponectin is a good marker for metabolic state among type 1 diabetes mellitus patients." *Iranian journal of pediatrics*. 2013,23(3): 295.
126. Kaza M. et al. "The Effect of Metabolic Profile on Leptin, Adiponectin, and hs-CRP in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes." *Children*. 2022,9(8): 1162.
127. Khan M, Joseph F. Adipose tissue and adipokines: the association with and application of adipokines in obesity. *Scientifica (Cairo)*. 2014;2014:1-7.
128. Khoramipour K. et al. "Adiponectin: Structure, physiological functions, role in diseases, and effects of nutrition." *Nutrients*, 2021,13(4): 1180.
129. Khosla S., Arrighi, H., Melton, III, L. et al. Correlates of Osteoprotegerin Levels in Women and Men. *Osteoporos Int*. 2002, 13:394–399.
130. Kiernan, K., MacIver J. The role of the adipokine leptin in immune cell function in health and disease. *Frontiers in immunology*. 2021,11:622468.
131. Kim S. et al. "Mean platelet volume is closely associated with serum glucose level but not with arterial stiffness and carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015,100(9): 3502-3508.
132. Kita S, Shimomura I. Stimulation of exosome biogenesis by adiponectin, a circulating factor secreted from adipocytes. *J Biochem*. 2021;169(2):173-179.
133. Klein K. et al. Cardiovascular Disease, Mortality, and Retinal Microvascular Characteristics in Type 1 Diabetes: Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Arch. Intern. Med*. 2004,164:1917–1924.
134. Koleva D., Orbetzova M., Nikolova J., Deneva T. Pathophysiological Role of Adiponectin, Leptin and Asymmetric Dimethylarginine in the Process of Atherosclerosis. *Folia Medica*. 2016,58(4): 234-240.

135. Konya H, Miuchi M, Satani K, et al. Asymmetric dimethylarginine, a biomarker of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *World J Exp Med.* 2015, 5(2):110-119.
136. Korkmaz O. Assessment of the platelet parameters in children with type 1 diabetes mellitus. *J Endocrinol Metab.* 2019,8(6): 144–148.
137. Kristófi R et al. Cardiovascular and Renal Disease Burden in Type 1 Compared With Type 2 Diabetes: A Two-Country Nationwide Observational Study. *Diabetes Care.* 2021;44(5):1211-1218.
138. Krolewski A. et al. Magnitude and Determinants of Coronary Artery Disease in Juvenile-Onset, Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Am. J. Cardiol.* 1987, 59:750–755.
139. Kuo S., and Halpern M. "Lack of association between body mass index and plasma adiponectin levels in healthy adults." *International journal of obesity.* 2011,35(12): 1487-1494.
140. Kwaifa I, Bahari H, Yong Y, Noor S. Endothelial dysfunction in obesity-induced inflammation: Molecular mechanisms and clinical implications. *Biomolecules.* 2020,10:291.
141. Laing S, Swerdlow A, Slater S et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia.* 2003, 46: 760-765.
142. Larsen J, Brekke M, Sandvik L et al. Silent coronary atheromatosis in type 1 diabetic patients and its relation to long-term glycemic control. *Diabetes.* 2002; 51: 2637-2641.
143. Lausten-Thomsen U. et al. "Reference values for serum total adiponectin in healthy non-obese children and adolescents." *Clinica Chimica Acta.* 2015(450): 11-14.
144. Le Caire T., Palta. "Longitudinal analysis of adiponectin through 20-year type 1 diabetes duration." *Journal of diabetes research* 2015.2015: 730407.
145. Lee S et al. Cardiovascular disease and type 1 diabetes: prevalence, prediction and management in an ageing population. *Therapeutic advances in chronic disease.* 2015,6(6): 347–374.
146. Lespagnol E et al. Early Endothelial Dysfunction in Type 1 Diabetes Is Accompanied by an Impairment of Vascular Smooth Muscle Function: A Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020,11:203.
147. Lind M. et al. Glycemic Control and Excess Mortality in Type 1 Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2014,371:1972–1982.
148. Lindström T. et al. "Elevated circulating adiponectin in type 1 diabetes is associated with long diabetes duration." *Clinical endocrinology.* 2006,65(6):776-782.
149. Liu J et al., Relationship between Serum Asymmetric Dimethylarginine Level and Microvascular Complications in Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *BioMed Research International.* 2019,8:2941861.
150. Liu M, Liu F. Regulation of adiponectin multimerization, signaling and function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014,28(1):25-31.
151. Liu Y. et al. Association between serum leptin level and calcific aortic valve disease. *J. Am. Heart Assoc.* 2019,8:e012495.
152. Livingstone S. et al. Risk of Cardiovascular Disease and Total Mortality in Adults with Type 1 Diabetes: Scottish Registry Linkage Study. *PLoS Med.* 2012,9:e1001321.
153. Livingstone S. et al. Estimated Life Expectancy in a Scottish Cohort with Type 1 Diabetes, 2008–2010. *JAMA.* 2015;313:37–44.
154. Llauradó G. et al. Arterial Stiffness Is Highly Correlated with the Scores Obtained from the Steno Type 1 Risk Engine in Subjects with T1DM. *PLoS ONE.* 2019,14:e0220206.
155. Loutradis C. et al. Diabetes mellitus increases the prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease: a nested case-control study. *World J Nephrol.* 2016,5(4):358–66.
156. Maahs D. et al. Hypertension Prevalence, Awareness, Treatment, and Control in an Adult Type 1 Diabetes Population and a Comparable General Population. *Diabetes Care.* 2005,28:301–306.
157. Maahs M. et al. "Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification." *Circulation.* 2005,111(6): 747-753.
158. Mach F. et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: Lipid Modification to Reduce Cardiovascular Risk. *Eur. Heart J.* 2020,41:111–188.
159. Macis D. et al, A novel automated immunoassay platform to evaluate the association of adiponectin and leptin levels with breast cancer risk. *Cancers.* 2021,13(13): 3303.

160. Magalhães C et al. Leptin, hsCRP, TNF- α and IL-6 levels from normal aging to dementia: Relationship with cognitive and functional status. *J Clin Neurosci*. 2018,56:150-155.
161. Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm*. 2013;2013:1-12.
162. Malachowska B, Tomasik B, Szadkowska A, et al. Altered platelets' morphological parameters in children with type 1 diabetes – a case-control study. *BMC Endocr Disord*. 2015,15:17.
163. Malecha-Jędraszek, A. R. L. E. T. A., et al. "Serum adiponectin concentration in patients with type 1 diabetes." 2012.
164. Maluf C, Barreto S, Vidigal P. Standardization and reference intervals of platelet volume indices: Insight from the Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-BRASIL) Platelets. 2015,26:413–420.
165. Mangan S., Campenhout A., Rush C., and Golledge J., "Osteoprotegerin upregulates endothelial cell adhesion molecule response to tumor necrosis factor- α associated with induction of angiopoietin-2," *Cardiovascular Research*. 2007,76,(3):494–505.
166. Marcovecchio M., Widmer B., Turner C, Dunger, D., Dalton N., Asymmetric dimethylarginine in young people with Type 1 diabetes: a paradoxical association with HbA_{1c}. *Diabetic medicine*. 2011,28(6): 685-691.
167. Markaki A, Psylinakis E, Spyridaki A. Adiponectin and endstage renal disease. *Hormones (Athens)*. 2016,15(3):345-354.
168. McMahon M. et al. High plasma leptin levels confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus, and are associated with inflammatory oxidised lipids. *Ann. Rheum. Dis*. 2011,70:1619–1624.
169. Melin E. et al. Abdominal Obesity in Type 1 Diabetes Associated with Gender, Cardiovascular Risk Factors and Complications, and Difficulties Achieving Treatment Targets: A Cross Sectional Study at a Secondary Care Diabetes Clinic. *BMC Obes*. 2018,5:15.
170. Menzaghi Cl., Vincenzo Trischitta; The Adiponectin Paradox for All-Cause and Cardiovascular Mortality. *Diabetes*. 2018,67(1):12–22.
171. Mogelvang R, Haahr-Pedersen S, Bjerre M, Frystyk J, Iversen A, Galatius S, Flyvbjerg A, Jensen JS. Osteoprotegerin improves risk detection by traditional cardiovascular risk factors and hsCRP. *Heart*. 2013,99(2):106–110.
172. Mohamed Al., Nagwa S., Ahmed M. and Mayada M. An Overview Of Osteoprotegerin And Its Possible Relation To Diabetic Kidney Patients. *Nat. Volatiles & Essent. Oils*. 2022; 9(1): 729-735.
173. Montagnana M., Lippi G., Danese E., and Guidi G., "The role of osteoprotegerin in cardiovascular disease," *Annals of Medicine*. 2013, 45,(3):254–264.
174. Montazerifar F.; Bolouri, A.; Paghalea, R.S.; Mahani, M.K.; Karajibani, M. Obesity, serum resistin and leptin levels linked to coronary artery disease. *Arq. Bras. Cardiol*. 2016, 107:348–353.
175. Moradi S., Kerman J., Rohani F., Salari F. Association between diabetes complications and leukocyte counts in Iranian patients. *Journal of inflammation research*. 2012,5:7.
176. Morisawa T, Nakagomi A, Kohashi K, Kosugi M, Kusama Y, Atarashi H, Shimizu W. Osteoprotegerin is Associated With Endothelial Function and Predicts Early Carotid Atherosclerosis in Patients With Coronary Artery Disease. *Int Heart J*. 2015,56(6):605-12.
177. Münzberg H, Morrison C. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism*. 2015,64(1):13-23.
178. Nagy E., Varga-Fekete T., Puskas A. et al. High circulating osteoprotegerin levels are associated with non-zero blood groups. *BMC Cardiovasc Disord*. 2016,16:106.
179. Nalini D., Karthick R., Shirin V., Manohar G., Malathi R. Role of the adipocyte hormone leptin in cardiovascular diseases—a study from Chennai based Population. *Thrombosis journal*. 2015,13(1):1-7.
180. Naot D., Musson D., Cornish J. The Activity of Adiponectin in Bone. *Calcif Tissue Int*. 2017,100:486–499.
181. National Institute of Clinical Excellence (NICE). Cardiovascular disease: risk assessment and reduction, including lipid modification. NICE clinical guideline CG181. 2014. Available at: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg181> (Accessed 6 December 2018).
182. Naylor K, Rogers A, Fraser R, Hall V, Eastell R, Blumsohn A. Serum osteoprotegerin as a determinant of bone metabolism in a longitudinal study of human pregnancy and lactation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003, 88(11):5361-5.

183. Németh B, Ajtay Z, Hejjel L, Ferenci T, Ábrám Z, Murányi E, Kiss I. The issue of plasma asymmetric dimethylarginine reference range - A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017,12(5):e0177493.
184. Newman D. et al, Systematic Review on Urine Albumin Testing for Early Detection of Diabetic Complications. *Health Technol. Assess. Winch. Engl.*2005;9.
185. Nguyen T. Adiponectin: Role in Physiology and Pathophysiology. *Int J Prev Med*. 2020;11:136.
186. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y. Adiponectin and hypertension. *Am J Hypertens*. 2011;24(3):263-269.
187. Olana C., Seifu D., Menon C., Natesan G. Abnormal hematological indices and anthropometric parameters associated with type 2 Diabetes. *Int J Adv Res*. 2019, 10(11): e5296.
188. Olesen P., Ledet T., Rasmussen M. Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF- α . *Diabetologia*. 2005,48:561–568.
189. Oliva-Damaso E. et al, Asymmetric (ADMA) and Symmetric (SDMA) Dimethylarginines in Chronic Kidney Disease: A Clinical Approach. *Int J Mol Sci*. 2019;20 (15) :3668.
190. Orchard T. et al. Insulin Resistance-Related Factors, but Not Glycemia, Predict Coronary Artery Disease in Type 1 Diabetes: 10-Year Follow-up Data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*. 2003;26:1374–1379.
191. Orchard T., Secrest A., Miller R., Costacou T. In the Absence of Renal Disease, 20 Year Mortality Risk in Type 1 Diabetes Is Comparable to That of the General Population: A Report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia*. 2010;53:2312–2319.
192. Orchard T, Costacou T. Cardiovascular complications of type 1 diabetes: update on the renal link. *Acta Diabetol*. 2017,54(4):325-334.
193. Pabalan N. et al. "Association and biomarker potential of elevated serum adiponectin with nephropathy among type 1 and type 2 diabetics: A meta-analysis." *PloS one*. 2018,13(12): e0208905.
194. Padászyńska A. et al. "Cardioprotective properties of leptin in patients with excessive body mass." *Irish Journal of Medical Science (1971-)*. 2020,189(4): 1259-1265.
195. Pajunen P. et al. Angiographic severity and extent of coronary artery disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2000,86:1080-1085.
196. Palm F. et al, Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007, 293:3227-3245.
197. Pambianco G, Costacou T, Ellis D ,Becker DJ ,Klein R ,Orchard TJ. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *Diabetes*. 2006,55: 1463-1469.
198. Payne A., Tune D, Knudson D. Leptin-induced endothelial dysfunction: A target for therapeutic interventions. *Curr. Pharm. Des*. 2014,20:603–608.
199. Pérez de Ciriza C., Moreno M., Restituto P. et al., “Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification,”*Clinical Biochemistry*. 2014,47,(18): 272–278.
200. Pérez de Ciriza, A. Lawrie, N. Varo, Influence of pre-analytical and analytical factors on osteoprotegerin measurements, *Clinical Biochemistry*. 2014,47 (13–14):1279-1285.
201. Pérez de Ciriza C., Lawrie A., Varo N. Osteoprotegerin in Cardiometabolic Disorders. *International Journal of Endocrinology*. 2015, 564934.
202. Pérez-Pérez A. et al. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine & growth factor reviews*. 2017, 35:71-84.
203. Perkins B. et al, Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group. Risk factors for kidney disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2019, 42(5):883-890.
204. Perri A. et al, Adiponectin is expressed and secreted by renal tubular epithelial cells. *JNEPHROL*. 2013,6:1049-1054.
205. Persson J, Strawbridge RJ, McLeod O, et al.; IMPROVE Study Group. Sex-specific effects of adiponectin on carotid intima-media thickness and incident cardiovascular disease. *J Am Heart Assoc*. 2015,4:e001853.
206. Petrie JR, Sattar N. Excess Cardiovascular Risk in Type 1 Diabetes Mellitus. *CIRCULATION*. 2019;2019,139(6):744–7

207. Picó C, Palou M, Pomar CA, Rodríguez AM, Palou A. Leptin as a key regulator of the adipose organ. *Rev Endocr Metab Disord.* 2022;23(1):13-30.
208. Pilacinski S., Wierusz-Wysocka B. and Zozulinska-Ziolkiewicz D. "Association between serum adiponectin and HbA1c is independent of the severity of clinical presentation in young adults with new onset type 1 diabetes." *Journal of Endocrinological Investigation.* 2016,39(8):935-937.
209. Pizzarelli F., Maas R., Dattolo P. et al. Asymmetric dimethylarginine predicts survival in the elderly. *AGE* 2013, 35:2465–2475.
210. Poetsch M, Strano A, Guan K. Role of Leptin in Cardiovascular Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020,11:354.
211. Popovic S., Sekerus V. "Levels of different adipocytokines in chronic complications of type 1 diabetes mellitus." *Integr Obes Diabetes.* 2016,2: 255-261.
212. Pozaic P, Dukic L, Simundic AM. The effect of hemolysis, icterus and lipemia on Randox immunoturbidimetric adiponectin assay. *Clin Chim Acta.* 2015,450:64-6.
213. Vasandani i C., Pucino V., Mantzoros, C. S., & Matarese, G. Leptin in autoimmune diseases. *Metabolism.* 2015,64(1):92-104.
214. Publications of the World Health Organization. WHO website (<http://www.who.int>),2016.
215. Putri E. et al. "The Correlation Between Adiponectin Levels With C-Reactive Protein in Adult Obese Non-Diabetic Among Staffs of DR. M. Djamil Hospital Padang." *Jurnal Profesi Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan.* 2021,15(1).
216. Raaz-Schrauder D., Schrauder M, Stumpf C. et al. Plasma levels of sRANKL and OPG are associated with atherogenic cytokines in patients with intermediate cardiovascular risk. *Heart Vessels.* 2017,32:1304–1313.
217. Rahmani A. et al. Association between plasma leptin/adiponectin ratios with the extent and severity of coronary artery disease. *BMC Cardiovasc. Dis.* 2020,20:474.
218. Raman P, Khanal S. Leptin in Atherosclerosis: Focus on Macrophages, Endothelial and Smooth Muscle Cells. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021; 22(11):5446.
219. Rasmussen L., Tarnow L., Hansen T., Parving H., and Flyvbjerg A., "Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status, systolic blood pressure, kidney function and cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients," *European Journal of Endocrinology.* 2006,154,(1): 75–81.
220. Rawshani A et al, Relative Prognostic Importance and Optimal Levels of Risk Factors for Mortality and Cardiovascular Outcomes in Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation.* 2019, 16;139(16):1900-1912.
221. Redondo J. Sex differences in circulating leptin as a marker of adiposity in obese or overweight adolescents with type 1 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research and Care.* 2020, 8(1), e001683.
222. Reid R., Baldock A., Cornish, J. Effects of leptin on the skeleton. *Endocrine reviews.* 2018, 39(6):938-959.
223. Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The Role of Osteoprotegerin and Its Ligands in Vascular Function. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019, 20(3):705.
224. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol.* 2016, 8(2):101-109.
225. Ruhl E., Everhart E. Leptin concentrations in the United States: relations with demographic and anthropometric measures. *The American journal of clinical nutrition.* 2001,74(3):295-301.
226. Sahay M. et al. Diabetes and Anemia: International Diabetes Federation (IDF)–Southeast Asian Region (SEAR) position statement. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2017,11:685-695.
227. Sánchez-Quesada J. et al, Electronegative Low Density Lipoprotein Subform Is Increased in Patients with Short-Duration IDDM and Is Closely Related to Glycaemic Control. *Diabetologia.* 1996;39:1469–1476.
228. Sánchez-Quesada J., Pérez A. Modified Lipoproteins as Biomarkers of Cardiovascular Risk in Diabetes Mellitus. *Endocrinol. Nutr. Órgano Soc. Esp. Endocrinol. Nutr.* 2013;60:518–528.
229. Sankiewicz A. et al. An SPR imaging immunosensor for leptin determination in blood plasma. *Anal. Methods.* 2021,13, 642-646.
230. Schaalan M., Mohamed W. Predictive ability of circulating osteoprotegerin as a novel biomarker for early detection of acute kidney injury induced by sepsis. *Eur. Cytokine Netw.* 2017, 28: 52–62.

231. Scherer P. The multifaceted roles of adipose tissue-therapeutic targets for diabetes and beyond: the 2015 Banting Lecture. *Diabetes*. 2016;65:1452–1461.
232. Schofield J, Ho J, Soran H. Cardiovascular Risk in Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabetes Ther*. 2019;10(3):773–789.
233. Schoppet M., Kavurma M., Hofbauer L., Shanahan S., “Crystallizing nanoparticles derived from vascular smooth muscle cells contain the calcification inhibitor osteoprotegerin,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013, 407,(1): 103–107.
234. Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Böger RH. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(12):1377-83.
235. Schutte A, Schutte R. Leptin: a cardiovascular perspective. *JEMDSA*. 2012, 17(2):72-76.
236. Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, Schulze F, Riederer U, Böger RH. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2007;851:211–9.
237. Shah V, Carpenter R, Ferguson V, Schwartz A. Bone health in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2018;25:231–36.
238. Sharma H, Lencioni M, Narendran P. Cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Cardiovasc Endocrinol Metab*. 2019; 8(1):28–34.
239. Sheriff D. "Adiponectin, Diabetes and Coronary Artery Disease." *JAMA*. 2017;291(14): 1730-1737.
240. Shklyayev S., Melnichenko G., Volevodz N., Falaleeva N., Ivanov S., Kaprin A., Mokrysheva N. Adiponectin: a pleiotropic hormone with multifaceted roles. *Problems of Endocrinology*. 2021;67(6):98-112.
241. ShuaiFei J. et al. "The relationship between mean platelet volume and diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis." *Diabetology & metabolic syndrome*. 2019,11(1): 1-8.
242. Simonet W., Lacey D., Dunstan C. et al., “Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density,” *Cell*. 1997, 89(2):309–319.
243. Singh D., Winocour P., Summerhayes B., Viljoen A., Sivakumar G., and Farrington K., “Low serum osteoprotegerin levels in normoalbuminuric type 1 diabetes mellitus,” *Acta Diabetologica*. 2010, 47(1):105–110.
244. Sitar M. Asymmetric Dimethylarginine and Its Relation As a Biomarker in Nephrologic Diseases. *Biomark Insights*. 2016, 7(11):131-137.
245. Soedamah-Muthu S. EURODIAB Prospective Complications Study Group Risk Factors for Coronary Heart Disease in Type 1 Diabetic Patients in Europe: The EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care*. 2004;27:530–537.
246. Soedamah-Muthu S, Fuller J, Mulnier H, Raleigh V, Lawrenson R, Colhoun H. High risk of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes in the U.K.: a cohort study using the general practice research database. *Diabetes Care*. 2006; 29: 798-804.
247. Song D, Zhou P, Xiu X, Zhou G, Sun Y, Song C. Relationships of OPG genetic polymorphisms with susceptibility to cardiovascular disease: a meta-analysis. *Med Sci Monit*. 2016, 22:1223–1231.
248. Song S, Oh T, Choi H et al. High serum adiponectin as a biomarker of renal dysfunction: Results from the KNOW-CKD study. *Sci Rep*. 2020;10(1):5598.
249. Sowka A, Dobrzyn P. Role of perivascular adipose tissue-derived adiponectin in vascular homeostasis. *Cells*. 2021,10(6):1485.
250. Stern J, Rutkowski J, Scherer P. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell Metab*. 2016;23(5):770-784.
251. Stratigou T. et al, Progression of Albuminuria Among Patients with Type 1 Diabetes Mellitus: A Long Term Observational Follow-up Study. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2021,129(4):276-282.
252. Strobel J, Muller F, Zolk O, Endress B, Konig J, Fromm MF, et al. Transport of asymmetric dimethylarginine (ADMA) by cationic amino acid transporter 2 (CAT2), organic cation transporter 2 (OCT2) and multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1). *Amino Acids*. 2013;45:989–1002.
253. Tahergorabi Z., Khazaei, M. Leptin and its cardiovascular effects: Focus on angiogenesis. *Adv. Biomed. Res*. 2015;4:79.
254. Takaya J. et al, Asymmetric dimethylarginine is negatively correlated with hyperglycemia in children. *Endocrine Journal*. 2015;62(6):551-556.

255. Tecce N., Masulli M., Lupoli R., Della Pepa G., Bozzetto L., Palmisano L., Rivellese A.A., Riccardi G., Capaldo B. Evaluation of Cardiovascular Risk in Adults with Type 1 Diabetes: Poor Concordance between the 2019 ESC Risk Classification and 10-Year Cardiovascular Risk Prediction According to the Steno Type 1 Risk Engine. *Cardiovasc. Diabetol.* 2020;19:166.
256. Teerlink T, ADMA metabolism and clearance. *Vasc Med.* 2005,10(1): 73-81.
257. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1993;329:977–986.
258. Theoleyre Y, Wittrant S., Tat Y, Fortun F. Redini and HeymannD, “The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling,”*Cytokine and Growth Factor Reviews.* 2004,15(6):457–475.
259. Thong E, Herath M, Weber D, Ranasinha S, Ebeling P, Milat F, Teede H. 2018. Fracture risk in young and middle-aged adults with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 89:314–23.
260. Tomono Y., Hiraishi Ch., and Yoshida H.. "Age and sex differences in serum adiponectin and its association with lipoprotein fractions." *Annals of Clinical Biochemistry.* 2018,55(1): 165-171.
261. Tony A., El Eldeen M., Tony A., El-Shereif T., Abdou A. The role of adrenomedulin and leptin in type 2 diabetes mellitus: can be used as early predictors for its microvascular complications?. *Journal of The Egyptian Society of Nephrology and Transplantation.* 2018, 18(3): 73.
262. Tousoulis D et al, Methionine-Induced Homocysteinemia Impairs Endothelial Function in Hypertensives: The Role of Asymmetrical Dimethylarginine and Antioxidant Vitamins, *American Journal of Hypertension.* 2011,24(8): 936–942.
263. Treviño-Garza C, Mancillas-Adame L, Estrada-Zúñiga M, Villarreal-Pérez Z., Villarreal-Martinez L., De la O-Cavazos E. Measurement of Leptin by RIA Versus MIA in a Population of Healthy Newborns. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 2016, 30(3):254-257.
264. Tschiderer L, Willeit J, Schett G, Kiechl S, Willeit P. Osteoprotegerin concentration and risk of cardiovascular outcomes in nine general population studies: Literature-based meta-analysis involving 26,442 participants. *PLoS One.* 2017,12(8):e0183910.
265. Tschiderer L. et al, Osteoprotegerin and Cardiovascular Events in High-Risk Populations: Meta-Analysis of 19 Prospective Studies Involving 27 450 Participants. *J Am Heart Assoc.* 2018,7(16):e009012.
266. Tsioufis C. et al, Relationships of osteoprotegerin with albuminuria and asymmetric dimethylarginine in essential hypertension: integrating vascular dysfunction, *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2011,15(12):1347-1353.
267. Tsuda E., Goto M., Mochizuki S. et al., “Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis,” *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1997, 234(1):137–142.
268. Type 1 diabetes mellitus. *BMJ Best practice.* <http://www.bestpractice.bmj.com>, 2019.
269. Uko K. et al. Some haematological parameters in patients with type-1 diabetes in Sokoto, North Western Nigeria. *J Blood Lymph.* 2013, 3(110):2165-7831.
270. Umeji L, Paul A, Felix S, et al. Haematological profile of diabetes and non-diabetes patients in Abuja, Nigeria. *IJRSI.* 2019; 6(5):2321–2705.
271. Unlu A et al, HPLC and LC-MS/MS measurement methods for the quantification of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related metabolites, *Turkish Journal of Biochemistry.* 2021, 46:4.
272. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992,339:572-575.
273. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart.* 2001,85(3):342-350.
274. Varma B. et al. Higher leptin levels are associated with coronary artery calcium progression: The multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Diabetes Epidemiology and Management.* 2022,6:100047.
275. Vasandani C., Clark O., Adams-Huet B., Quittner C, Garg A. Efficacy and safety of metreleptin therapy in patients with type 1 diabetes: a pilot study. *Diabetes care.* 2017, 40(5): 694-697.
276. Venuraju S, Yerramasu A, Corder R, Lahiri A. Osteoprotegerin as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular mortality and morbidity. *J Am Coll Cardiol.* 2010,55(19):2049-61.

277. Viñals C. et al. Steno Type 1 Risk Engine and Preclinical Atherosclerosis in Mediterranean Individuals with Type 1 Diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2020,36:e3320.
278. Vistisen D., Andersen G.S., Hansen C.S., Hulman A., Henriksen J.E., Bech-Nielsen H., Jørgensen M.E. Prediction of First Cardiovascular Disease Event in Type 1 Diabetes Mellitus: The Steno Type 1 Risk Engine. *Circulation.* 2016;133:1058–1066.
279. Wabitsch M et al. Measurement of immunofunctional leptin to detect and monitor patients with functional leptin deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2017,176(3):315-322.
280. Wallace A, McMahon A, Packard C, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, Sattar N. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation.* 2001,104:3052–3056.
281. Wang G, Wanga Q, Xu W. Elevated asymmetric dimethylarginine level as biomarkers of adverse outcomes in individuals undergoing coronary angiography/percutaneous coronary interventions: a systematic review and meta-analysis. *Coron Artery Dis.* 2022, 31 (1):e80-e86.
282. Wang S, Xu J, Wang M, Chen FL, Ding G. Increased plasma osteoprotegerin concentrations in Type 1 diabetes with albuminuria. *Clin Nephrol.* 2013,79(3):192-8.
283. Wang Y, Ma X, Lau W. Cardiovascular adiponectin resistance: the critical role of adiponectin receptor modification. *Trends Endocrinol Metab.* 2017,28(7):519-530.
284. Wang Z, Nakayama T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:1-17.
285. Wang Zh., Scherer Ph., Adiponectin, the past two decades, *Journal of Molecular Cell Biology.* 2016,8(2):93–100.
286. Watanabe T. et al, Development of fully automated and ultrasensitive assays for urinary adiponectin and their application as novel biomarkers for diabetic kidney disease. *Scientific reports.* 2020,10(1): 1-12.
287. Wauman J., Zabeau L, Tavernier J. The leptin receptor complex: heavier than expected? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017,8:30.
288. Wei J et al, The influence of different types of diabetes on vascular complications, *Journal of Diabetes Research.* *J Diabetes Res.* 2022; 2022: 3448618
289. Wiczorek-Surdacka E., Hanff E., Chyrchel B. et al. Distinct associations between plasma osteoprotegerin, homoarginine and asymmetric dimethylarginine in chronic kidney disease male patients with coronary artery disease. *Amino Acids.* 2019,51:977–982.
290. Winnica D, Scott J, Grasemann H., Holguin F., Chapter 19 - Asymmetric-Dimethylarginine, Editor(s): Louis J. Ignarro, Bruce A. Freeman, *Nitric Oxide (Third Edition)*, Academic Press. 2017,247-254.
291. Wisudawati N, Rita C., Lismayanti L., Sugianli AK. Differences of asymmetric dimethyl arginine level in patients with diabetic nephropathy and non-diabetic nephropathy. *Indonesian journal of clinical pathology and medical laboratory.* 2018, 24(3): 262-265.
292. Woodward M, Huxley R. Increased risk of coronary heart disease in female smokers—authors reply. *Lancet* 2012; 379: 803.
293. Xingming C. et al. Meta-analysis of type 1 diabetes mellitus and risk of cardiovascular. *J Diabetes Complications actions.* 2021, 35(4):107833.
294. Xuan Ch., Tian Q., Li H., Zhang B., He G., Lun L. Levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, and risk of coronary artery disease: A meta-analysis based on 4713 participants, *European Journal of Preventive Cardiology.* 2016,23(5):502–510.
295. Yamauchi T., Kamon J. et al. "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." *Nature.* 2003,423(6941): 762-769.
296. Yang Y, Bedford M. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:37–50.
297. Yassin M., AbuMustafa M., Yassin M. Serum leptin in diabetic nephropathy male patients from Gaza Strip. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2019,13(2):1245-1250.
298. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N. et al., "Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro," *Endocrinology.* 1998, 139(3):1329–1337.
299. Yu J. et al. Effects of Long-Term Glycemic Variability on Incident Cardiovascular Disease and Mortality in Subjects without Diabetes: A Nationwide Population-Based Study. *Med. Baltim.* 2019, 98:e16317.

300. Yuan G. et al. "C-reactive protein inhibits adiponectin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes." *Journal of endocrinology*. 2007,194(2): 275-281.
301. Zannettino A., Holding A., Diamond P., et al. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *Journal of Cellular Physiology*. 2005;204(2):714–723.
302. Zgibor J., Piatt G.A., Ruppert K., Orchard T.J., Roberts M.S. Deficiencies of Cardiovascular Risk Prediction Models for Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2006,29:1860–1865.
303. Zhang M. et al. "Association between serum/plasma adiponectin levels and immune-mediated diseases: A meta-analysis." *Archives of Dermatological Research*. 2017,309(8): 625-635.
304. Zhao H, Cao Y, Chen H, Xu W, Sun X, Pan X. The association between OPG rs3102735 gene polymorphism, microembolic signal and stroke severity in acute ischemic stroke patients. *Gene*. 2017;613:25–29.
305. Zhao S, Kusminski CM, Elmquist JK, Scherer PE. Leptin: Less Is More. *Diabetes*. 2020;69(5):823-829.
306. Zhou Z., Sun B., Huang S., Zhu C., Bian M. Glycemic Variability: Adverse Clinical Outcomes and How to Improve It? *Cardiovasc. Diabetol*. 2020;19:102.
307. Zobel E. et al. Symmetric and asymmetric dimethylarginine as risk markers of cardiovascular disease, all-cause mortality and deterioration in kidney function in persons with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16(1):88.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Попчева Г**, Бочева Я, Йотова В, Галчева С, Йотов Й, Балев Б, Бояджиева М, Ушева Н, Панчева Р. Лабораторни биомаркери за оценка на сърдечно-съдовия риск при пациенти с тип 1 захарен диабет. Наука Ендокринология, 2019, 2: 4-13
2. **Чаушева Г.**, асиметричен диметиларгинин – природа, аналитични методи за определяне и клинично приложение, Варненски медицински форум, 2022,11, брой 1.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **G. Chausheva**, S. Shefket, Y. Bocheva, V. Iotova, K. Tsochev, S. Galcheva, I. Yotov, G. Valchev, N. Usheva, M. Boyadzhieva. Sex differences in leptin and its correlation with C-reactive protein in patients with long-standing type 1 diabetes mellitus. *XXVIII Balcan clinical laboratory federation meeting and XIII National conference of clinical laboratory*, Sofia, Bulgaria, Sept 8-11, 2021.
2. **G. Chausheva 1**, Y. Bocheva 1, S. Shefket 1, K. Tsochev 3, V. Iotova 3, Y. Yotov 2, T. Chalukova 2, N. Usheva 4, M. Boyadzhieva 5, G. Valchev 6, R. Pancheva 7. Correlation between osteoprotegerin, asymmetric dimethylarginine and disease duration in patients with long-term type 1 diabetes mellitus- *24th IFCC- EFLM European congress of clinical laboratory medicine*, Munich, Germany, April 10-14, 2022.
3. **G. Chausheva**, Y. Bocheva, S. Shefket, K. Tsochev, T.Chalukova, N. Usheva., M. Boyadzhieva, G. Valchev Y., V. Iotova, Changes in platelet count and platelet indices in relation to disease duration and patient age in long-term type 1 diabetes mellitus. *IFCC WorldLab Seoul Congress*, June 26-30, 2022
4. **G. Chausheva**, Y. Bocheva, S. Shefket, Y. Yotov, V. Iotova, M. Boyadzhieva, K. Tsochev, N. Usheva, Correlations between asymmetric dimethylarginine, osteoprotegerin and albuminuria in longstanding type 1 diabetic patients, *IFCC WorldLab Seoul Congress*, June 26-30, 2022.

БЛАГОДАРНОСТИ

На първо място, изказвам огромната си благодарност на моя научен ръководител доц. д-р Яна Д. Бочева, д.м., която в истинския смисъл на думата беше мой учител и с преподавателска самоотверженост и огромно търпение ми оказа неоценима помощ в работата над моята дисертация.

Дълбока благодарност изказвам на проф. Виолета М. Йотова, д.м., и проф. Йото Т. Йотов, д.м., за подкрепата и възможността да участвам в научен проект „Сърдечно-съдов и метаболитен риск, свързан с висцералната мастна тъкан при пациенти с тип 1 захарен диабет“.

Искрено благодаря на д-р Севим А. Шефкет, д.м., за помощта, която ми оказа в извършване на експерименталната работа, за сътрудничеството, конструктивните съвети и стимулиращите дискусии.

Изказвам голяма благодарност на д-р Калоян Ц. Цочев и д-р Татяна П. Чалъкова за подкрепата и оказаната помощ на различни етапи от работата по дисертацията.

Благодаря на доц. Силвия П. Николова, д.м., за помощта и подкрепата, които ми оказа в извършване на статистическата обработка на данните от проучването.

Признателна съм на целия колектив – колеги и лаборанти от Клинична лаборатория към УМБАЛ „Св. Марина“, гр. Варна.

И не на последно място, сърдечно благодаря на моето семейство и съпруга ми. Те вярваха в мен и ме подкрепяха в решенията и действията ми. Благодаря им за това, че проявяваха разбиране и ме насърчаваха в трудните моменти на моята работа. Тяхната любов и подкрепа са безценни за мен.