



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

Д-р Гургана Младенова Чаушева

**ЛАБОРАТОРНА ОЦЕНКА НА СЪРДЕЧНО-СЪДОВ
РИСК ПРИ ЛИЦА С ДЪЛГОГОДИШЕН ЗАХАРЕН
ДИАБЕТ ТИП I – АДИПОКИНИ,
ОСТЕОПРОТЕГЕРИН,
АСИМЕТРИЧЕН ДИМЕТИЛ-АРГИНИН**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен
„доктор“**

Специалност „Клинична лаборатория“

Научен ръководител:

Доц. д-р Яна Димитрова Бочева, д.м.

Варна, 2023 г.

Научно жури:

Проф. д-р Красимира Илиева Икономова-Шахова, д.м.

Доц. д-р Ирена Иванова Генчева-Ангелова, д.м.

Доц. д-р Марианка Генова Петрова-Яначкова, д.м.

Доц. д-р Даниела Иванова Герова, д.м.

Доц. д-р Соня Василева Галчева, д.м.

Резервни членове:

Доц. д-р Таня Иванова Денева, д.м.

Доц. д-р Трифон Георгиев Червенков, д.м.

Дисертационният труд съдържа общо 175 страници, онагледени с 56 таблици и 52 фигури. Библиографията съдържа 307 литературни източника, от тях 14 на кирилица и 293 на латиница.

Проучването и лабораторния анализ са извършени в МДЛ „Клинична лаборатория“ към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна.

Докторантът работи в МДЛ „Клинична лаборатория“ към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна и заема длъжност „асистент“ в Катедра по клинична лаборатория към МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“.

Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен за защита пред научно жури от Катедрен съвет № ..., Катедра по клинична лаборатория към МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна на 5.12.2022 г.

Защита на дисертационния труд ще се състои на 24.02.2022 г.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МУ-Варна и са публикувани на интернет страницата на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	7
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	8
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	10
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	11
1. Материали	11
IV. РЕЗУЛТАТИ.....	17
1. Клинико-лабораторна характеристика на изследваните лица	17
2. Прогностична стойност на ADMA за оценка на ССР при Т1Д.....	20
2.1. ADMA – влияние на пол, възраст и давност на диабета.....	20
2.2. ADMA – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.	21
2.3. ADMA – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3	21
2.4. ROC анализи за извеждане на прагови стойности на ADMA.....	24
3. Прогностична стойност на OPG за оценка на ССР при Т1Д.....	25
3.1. OPG – влияние на пол, възраст и давност на диабета.....	25
3.2. OPG – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.	27
3.3. OPG - връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3	29
3.4. ROC анализи за извеждане на прагови стойности на OPG при Т1Д	30
4. Прогностична стойност на ADNC за оценка на ССР при Т1Д	33
4.1. ADNC – влияние на пол, възраст и давност на диабета	33
4.2. ADNC – връзки със ST1RE, ESC от 2019 г. и Riskfactor3	34
4.3. ADNC – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3	36
4.4. ROC анализи за извеждане на прагови стойности на ADNC спрямо категорията на ССР при лица с дългогодишен Т1Д	38
5. Прогностична стойност на Lер за оценка на ССР при Т1Д.....	39
5.1. Lер – влияние на пол, възраст, давност на диабета и ИТМ.....	39
5.2. Lер – връзки със ST1RE, ESC от 2019 г. RiskFactor3.....	40
5.3. Lер – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3	43
5.4. Lер – логистични регресионни модели и ROC анализи за извеждане на прагови стойности.....	48

6. Хематоморфологични показатели.....	50
6.1. Сравнение между пациенти с Т1Д и здрави лица	50
6.2. Връзки с OPG и ADMA	56
6.3. Връзки със ST1RE, ESC от 2019 г. и Riskfactor3	59
6.4. Анемия и ССР при лица с дългогодишен Т1Д	60
6.5. Левкоцитоза и ССР при пациенти с дългогодишен Т1Д	62
6.6. Връзки с ADNC и Lер.....	63
6.6.1. ADNC – асоциация с анемия и левкоцитоза	67
6.6.2. Lер - асоциация с анемия, левкоцитоза и тромбоцитоза	67
V. ДИСКУСИЯ.....	68
1. Оценка на ССР според насоките на ESC от 2019 г. и ST1RE при Т1Д	68
2. Прогностична стойност на ADMA за оценка на ССР при Т1Д.....	69
2.1. ADMA – възрастово и полово обусловени разлики.....	69
2.2. ADMA – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.	70
2.3. ADMA – връзки с HbA1C, CRP, AlbU и RiskFactor3	71
2.4. ADMA – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3	73
3. Прогностична стойност на OPG за оценка на ССР при Т1Д.....	74
3.1. OPG – възрастово и полово обусловени разлики	74
3.2. OPG – връзки с ADMA.....	75
3.3. OPG – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.	76
3.4. OPG – връзки с HbA1C, CRP, AlbU и с RiskFactor3.....	78
3.5. OPG – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3	79
4. Прогностична стойност на ADNC за оценка на ССР при Т1Д	80
4.1. ADNC – възрастово и полово обусловени разлики.....	80
4.2. ADNC – връзки с ADMA.....	82
4.3. ADNC – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.	83
4.4. ADNC – връзки с HbA1C, CRP, AlbU и с RiskFactor3	84
4.5. ADNC – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3	87

5. Прогностична стойност на Lер за оценка на ССР при Т1Д	88
5.1. Lер – възрастово и полово обусловени разлики	88
5.2. Lер – връзки с OPG	89
5.3. Lер – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.	90
5.4. Lер – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с Riskfactor3	91
5.5. Lер – прагови стойности спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3	92
6. Хематоморфологични промени и ССР при Т1Д.....	94
6.1. Тенденция за анемия при лица с дългогодишен Т1Д	94
6.2. Тенденция за левкоцитоза при лица с дългогодишен Т1Д.....	95
6.3. Промени в тромбоцитни показатели при лица с Т1Д.....	96
6.4. Зависимости между ADMA, OPG и хематологични показатели	99
6.5. Зависимости между ADNC, Lер и хематологични показатели.....	100
VI. ИЗВОДИ.....	104
VII. ПРИНОСИ	106
1. Приноси с оригинален характер	106
2. Приноси с теоретичен и научно-приложен характер	106
VIII. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	107
IX. БЛАГОДАРНОСТИ.....	108

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	метаболитен 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 ССУ и респективно по-ниски финансови разходи. Ще се повиши капацитетът на звената от базова 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. 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 от 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.

III. 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 Комисия 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. 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. При втората визита се проведе интервю от обучен изследовател с цел уточняване на неясноти и допълване на липсващата информация.

- 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; 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); бременност; при участници с диабет – преживени тежки хипогликемии или диабетна кетоацидоза в последните три месеца и/или наличие на тежки документиранни 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, центрофугиран за 15 минути при 2500 G (~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. Серумите за ADMA, OPG, ADNC и Lер 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.

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.

2.3.2. Рутинните биохимични показатели и съответните аналитични методи за количествено определяне са представени в таблица 1.

Таблица 1. 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	0,12-164mg/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	1,55-500mg/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 (THb). THb е измерен чрез колориметричен метод.*

2.3.3. ADMA, OPG, ADNC и Lер са измерени чрез ELISA-метод (enzyme-linked immunosorbent assays) с готов тест набори. Серумните нива на OPG са отчетени в pmol/l, на ADMA – в μmol/l, на ADNC – в μg/ml, на Lер – в ng/ml. (табл. 2)

Таблица 2. Аналитични характеристики на ELISA-методи за количествено определяне на ADMA, OPG, ADNC и Lep

Показател	Производител	LOD	Кръстосана реактивност	Линейност	Възпроизводимост CV%	Референтни стойности
ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	ADMA Fast ELISA, <u>DLD Dianostika 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, албуминурия, HbA1C, eGFR, LDL холестерол; тютюнопушене; двигателна активност. Възприе 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). Прие 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. Възприе 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 макроалбуминурия – 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 (статистическия пакет SPSS 19):

2.5.1. Дескриптивна статистика. Определяне мерки за централна тенденция, мерки за разсейване на разпределението.

- 2.5.2.** Корелационен анализ. Корелационен коефициент на Пирсън (r) за оценка на линейна връзка и коефициент на рангова корелация на Спирмън ρ .
- 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 по отделно, така и съвместно влиянието на две или повече независими променливи върху една зависима променлива.
- 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.
- 2.5.5.** Непараметрични статистически методи за номинални данни. 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).
- 2.5.6.** Бинарната логистична регресия.
- 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.

IV. 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.3) 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 3. 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 4 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 4. 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 – $p > 0,05$.

Средноаритметичната давност на Т1Д 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, $t = 1,78$, $p = 0,241$.

Таблица 5. Клинико-лабораторна характеристика на контингента

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 (μmol/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) (μg/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.

Значима междугрупова разлика не се установява при съпоставка на следните променливи: ИТМ, CRP, ADMA, OPG и Lep. Средната стойност на HbA1C% при пациентите с Т1Д е сигнификантно по-висока от тази на контролите: $8,47 \pm 1,62\%$ спрямо $5,4\% \pm 0,39\%$, $F = 205,7$, $p < 0,0001$. (табл. 5)

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, $F = 5,210$, $p = 0,024$.

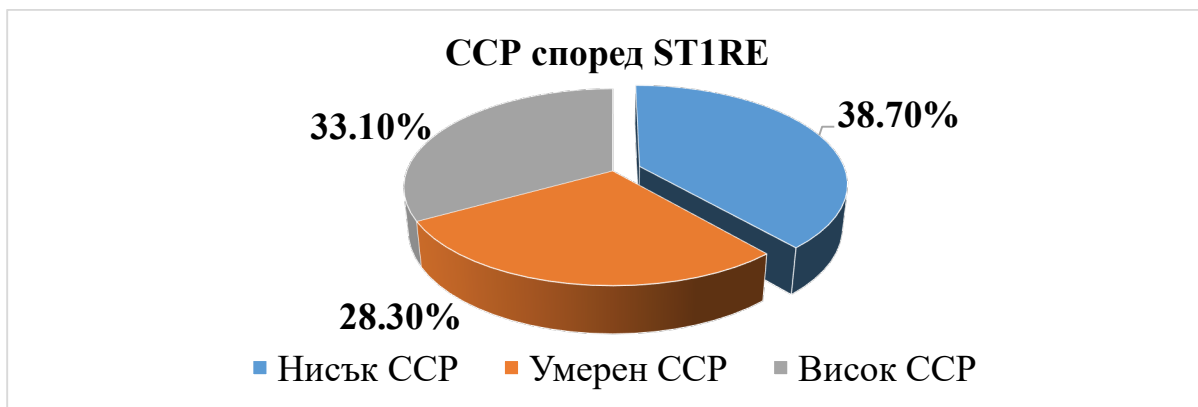
Фигура 1 демонстрира процентното разпределение на пациентите спрямо категорията на ССР съгласно насоките на ESC от 2019 г.: 30,6% от пациентите имат висок ССР, а 69,4% – много висок ССР. (фиг. 1) Не се установява сигнификантна междуполова разлика при ESC от 2019 г. – $\chi^2 = 0,480$, $p = 0,489$.

Фигура 2 демонстрира процентното разпределение на пациентите спрямо определената с калкулатора ST1RE категория на ССР: 38,7% от лицата с Т1Д имат нисък ССР; 28,2% – умерен и 33,1% – висок ССР.



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

39,6% от пациентите с нисък ССР са мъже, а 60,4% – жени според ST1RE. 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 междуполова разлика – $\chi^2 = 5,943$, $p = 0,051$.



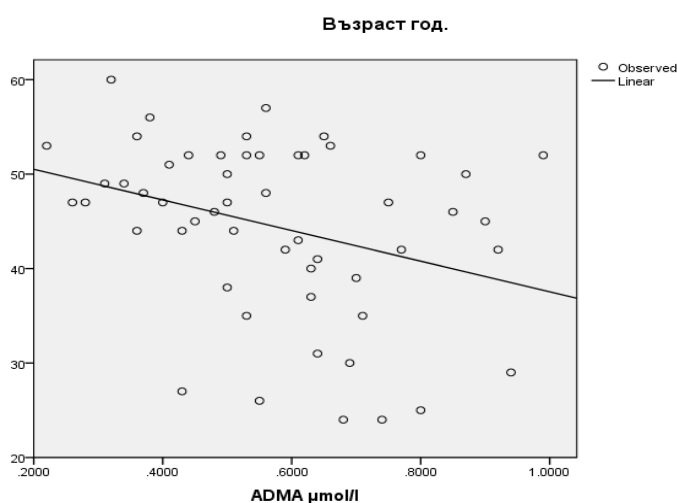
Фигура 2. Процентно разпределение на ССР при лица с Т1Д според ST1RE

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

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

Средноаритметичните стойностите на ADMA 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 $\mu\text{mol/l}$, $p = 0,126$.

При контролите се регистрира значима отрицателна корелация между възрастта и концентрацията на ADMA, $r = -0,329$, $p = 0,015$. (фиг. 3) В групата на лицата с дългогодишен Т1Д тази зависимост се запазва като посока, но губи сигнификантността си: $r = -0,0016$, $p = 0,865$. (табл. 7)

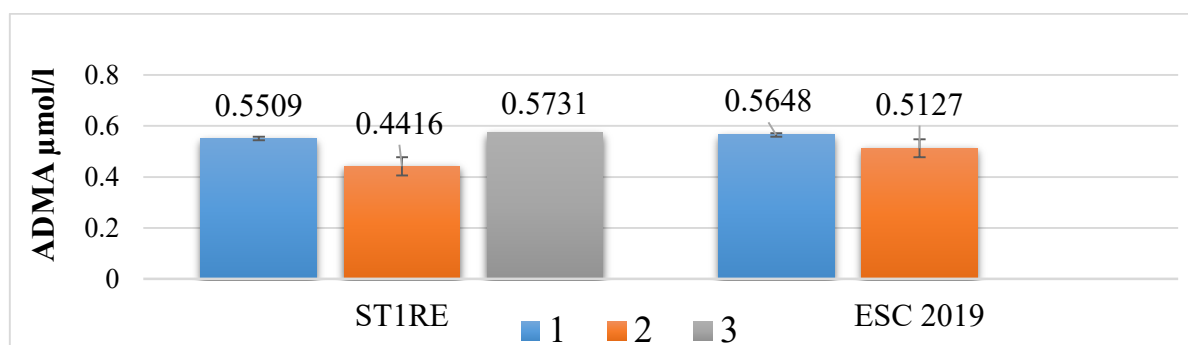


Фигура 3. Корелационна зависимост между възраст и ADMA при контроли

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.

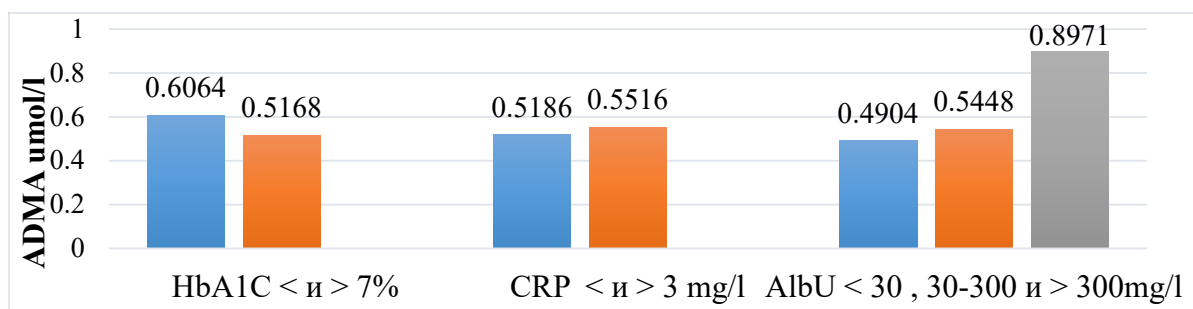
След приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey) се установи значимо различие в средните нива на ADMA между групите с умерен ССР и висок ССР според ST1RE, но при 90% достоверност на резултатите: MD = $0,1315 \mu\text{mol/l}$, p = $0,078$. Не се отчете сигнификантна разлика между средните нива на ADMA според ESC от 2019 г. (t = $0,985$, p = $0,327$). Не се установиха значими междуполови 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. (фиг. 4)



Фигура 4. Средни стойности на ADMA в зависимост от категорията на ССР ST1RE: 1 – нисък риск; 2 – умерено висок риск; 3 – много висок риск. ESC 2019 г.: 1 – висок риск; 2 – много висок риск

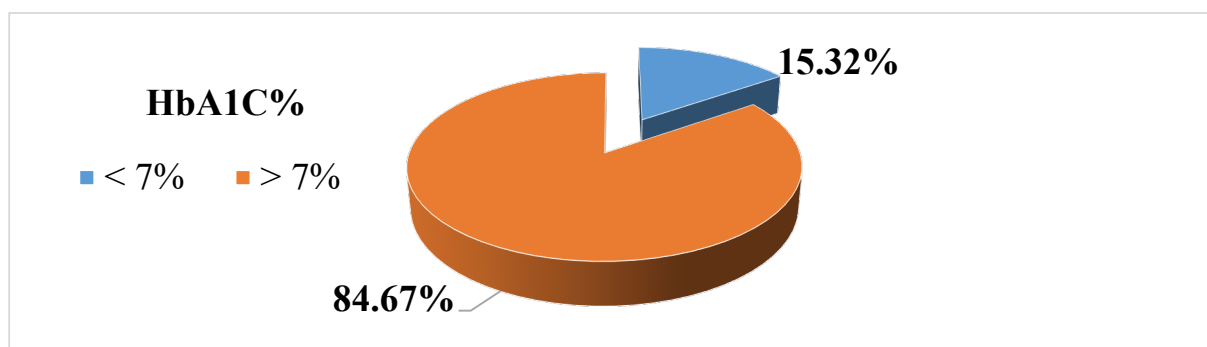
2.3. ADMA – връзки с AlbU, CRP, HbA1C и с RiskFactor3

На фигура 6 са представени средните нива на изследваната променлива спрямо HbA1C под и над 7%; спрямо CRP под и над 3 mg/l и спрямо AlbU – под 30 mg/l, между 30 и 300 mg/l и над 300 mg/l. Сигнификантна разлика се установи спрямо стойността на AlbU, F = $9,193$, p = $0,000$. (фиг. 5)



Фигура 5. Средни нива на ADMA спрямо HbA1C, CRP и AlbU при T1Д

Постхок анализ на Туки HDS демонстрира сигнификантни различия между изследваните с AlbU под 30 mg/l и AlbU над 300 mg (MD = 0,407 μ 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 μ mol/l, $p = 0,003$). Отчита се преобладаващ дял на пациенти с 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. 6)



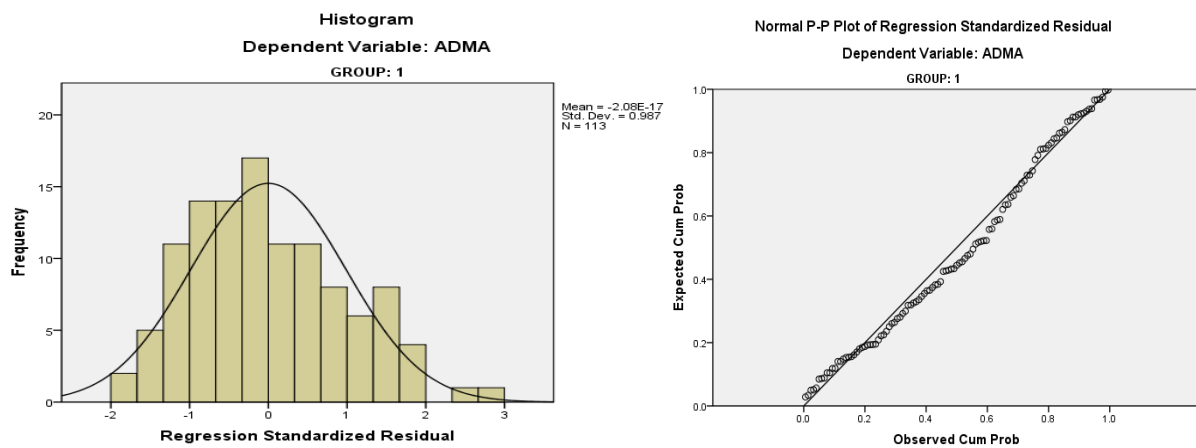
Фигура 6. Разпределение на пациенти с T1Д според HbA1C – под и над 7%

Нормоалбуминурия се установи при почти всички контроли – 91,4%, а при лицата с T1Д – 73,4%. Пациентите с микроалбуминурия са 20,2% спрямо 8,6% в контролната група. Макроалбуминурия се регистрира само при пациентите с T1Д – 6,5%. При тази съпоставка на относителните дялове се отчита сигнификантна разлика - $\chi^2 = 8,552$, $p = 0,014$.

В групата на контролите се установява сигнификантна връзка между HbA1C и CRP ($r = 0,310$, $p = 0,014$). При пациентите с дългогодишен T1Д, ADMA се асоциира положително с AlbU: $r = 0,371$, $p = 0,000$. 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: $r = - 0,150$, $p = 0,111$. Регистрира се статистически значима комбинация от променливите HbA1C и AlbU за прогноза на стойността на

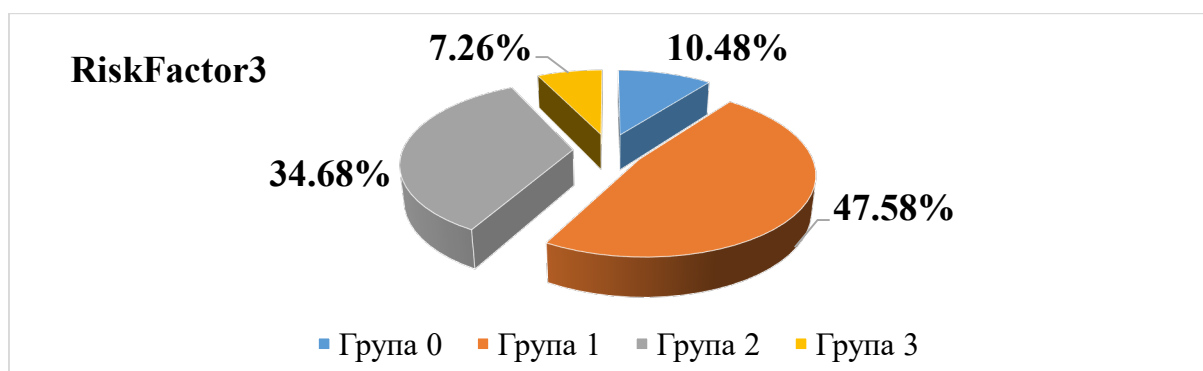
ADMA при лицата с Т1Д, $F = 7,584$, $p = 0,000$. 15% от измененията в стойността на ADMA могат да се обяснят с представения регресионен модел. Намереното уравнение за връзката между променливите е:

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

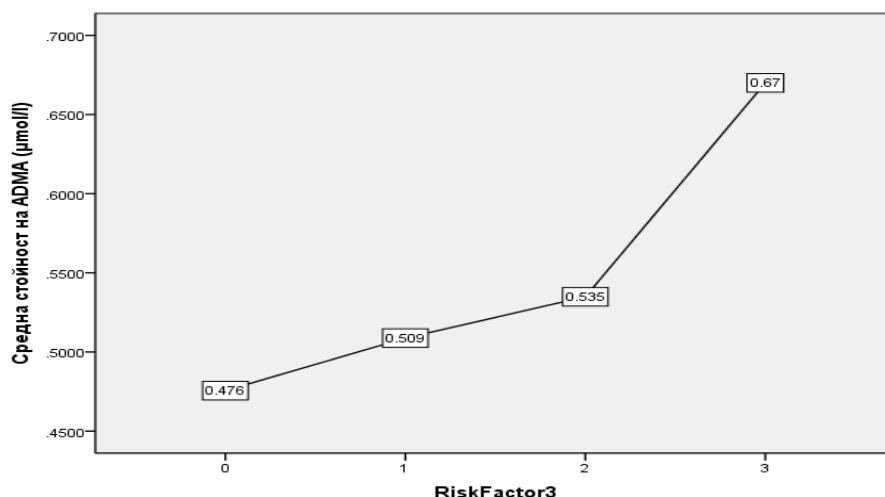


Фигура 7. Графики за нормално разпределение: хистограма и P – P Plot

Пациентите с дългогодишен Т1Д бяха разпределени в допълнителни подгрупи според RiskFactor3. 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 група 1 – 47,58% и средна стойност на ADMA – $0,509 \pm 0,241 \mu\text{mol/l}$. В група 2 – 34,68% от общия брой пациенти при ADMA – $0,535 \pm 0,276 \mu\text{mol/l}$, а в група 3 – 7,26% при ADMA – $0,67 \pm 0,306 \mu\text{mol/l}$. Не се отчита сигнификантна разлика в средните нива на ADMA, $F = 1,168$, $p = 0,325$. (фиг. 8,9)



Фигура 8. Разпределение на пациентите с Т1Д според Riskfactor3



Фигура 9. Средни стойности на АДМА според Riskfactor3

Силна корелационна връзка 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 $r = 0,224$, $p = 0,012$. АДМА се асоциира по-силно с Riskfactor3, но без статистическа значимост, $r = 0,159$, $p = 0,092$. (табл. 6)

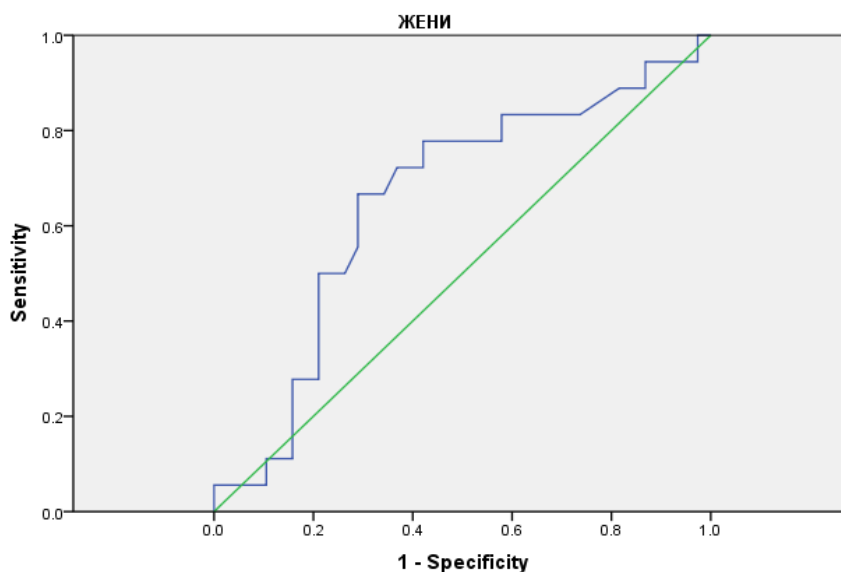
Таблица 6. Корелационни зависимости при лица с Т1Д

		RiskFakctor3	ESC от 2019 г.	ST1RE
ADMA (µmol/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 АДМА

Не се установява добра прогностична стойност на АДМА спрямо ST1RE - AUC = 0,564, $p = 0,265$, а при ESC от 2019 г. - AUC е 0,410, $p = 0,131$. При RiskFactor3, AUC е 0,543, $p = 0,451$.



Фигура 10. AUC-ROC крива за оценка на прогностична стойност на ADMA

Отчете се по-висока стойност на AUC при жените спрямо RiskFactor3 (AUC - ROC е 0,653, $p = 0,067$). (фиг. 10) Изведена е прагова стойност 0,535 $\mu\text{mol/l}$ при ДЧ 72,2% и ДС 63,2%. Определиха се $LR+ = 1,96$ и $LR- = 0,51$, $DOR = 3.84$, индекс на Youden = 1,09 и ДЕ = 66%. (табл. 10)

Таблица 7. Диагностична надеждност на ADMA спрямо RiskFactor3.

Показател	Критерий	cut-off	N	ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС	ДЕ
ADMA-жени ($\mu\text{mol/l}$)	RiskFactor3 ≥ 2 РФ	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 Т1Д

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

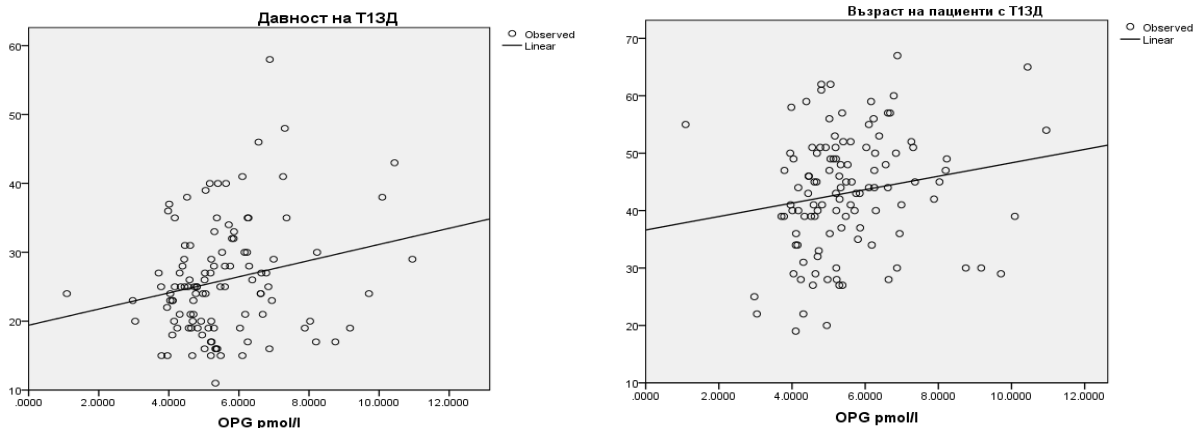
В двете изследвани групи се установи статистически значима разлика в полза на жените. При пациентите с Т1Д, MD е 0,3844 pmol/l , $p = 0,055$, а при контролите – MD = 1,1077 pmol/l , $p = 0,049$. (табл. 7)

Таблица 8. 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			
Контрол-на група	Мъже	29	5,055517	1,6450935	-2,013	0,049	-1,1077
	Жени	25	6,163200	2,3772265			

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

При съпоставяне на средните нива на OPG спрямо медианата на давността на Т1Д, се отчитат по-високи стойности при по-голяма продължителност на Т1Д ($5,723 \pm 1,506$ pmol/l) спрямо давност под 24 години - $5,317 \pm 1,574$ pmol/l, MD = 0,406 pmol/l, $t = -1,400$, $p = 0.164$.



Фигура 11. Зависимости между OPG и: възраст и давност на Т1Д

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 Т1Д анализиранията зависимост е положителна и по-слабо изразена: $r = 0,173$, $p = 0,067$. Възрастта на пациентите се асоциира положително с давността на Т1Д, като корелацията е закономерна ($r = 0,435$, $p = 0,000$). (табл. 7) Отчетените коефициенти на детерминация са: $R^2 = 0,030$, $p = 0,06$ спрямо възрастта и $R^2 = 0,048$, $p = 0,019$ спрямо давността на Т1Д. (фиг. 11)

Отчита се и значима положителна корелация между OPG и ADMA в двете изследвани групи. При контролите тя е средна по сила: $r = 0,362$, $p =$

0,007. При лицата с дългогодишен Т1Д – по-слаба по сила и значимост: $r = 0,175$, $p = 0,064$. (табл. 7)

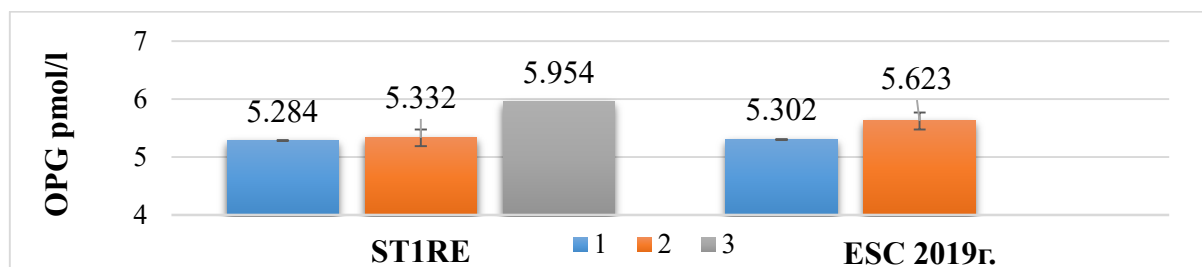
Таблица 9. Корелации между OPG и: ADMA, възраст и давност на Т1Д

Група			ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	Възраст (год.)	Давност на Т1Д (год.)
Група с Т1Д	OPG (pmol/l)	Pearson Correlation	0,175	0,173	0,220
		P value	0,064	0,067	0,019
		Брой	113	113	113
Контролна група	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.

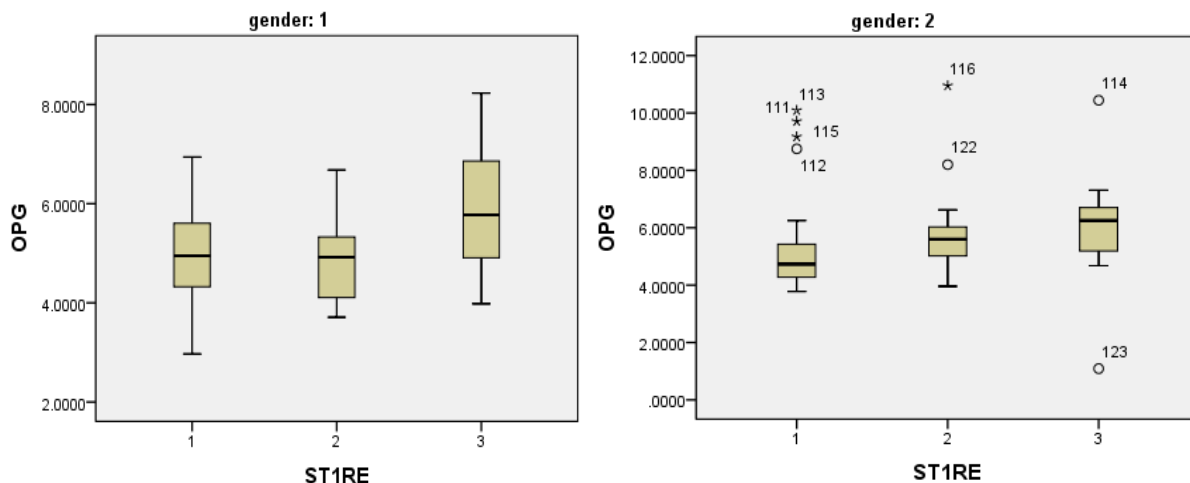
OPG се асоциира положително със ST1RE, като намерената корелация е сигнификантна, но слаба по сила – $r = 0,183$, $p = 0,053$. Аналогична корелация се установява между OPG и Riskfactor3: $r = 0,194$, $p = 0,039$. Не се отчита значима връзка между OPG и ESC от 2019 г.

Не се отчита сигнификантна междугрупова разлика в средните нива на OPG спрямо ST1RE ($F = 2,322$, $p = 0,103$) и спрямо ESC от 2019 г. $t = -1,003$, $p = 0,318$. (фиг. 12)



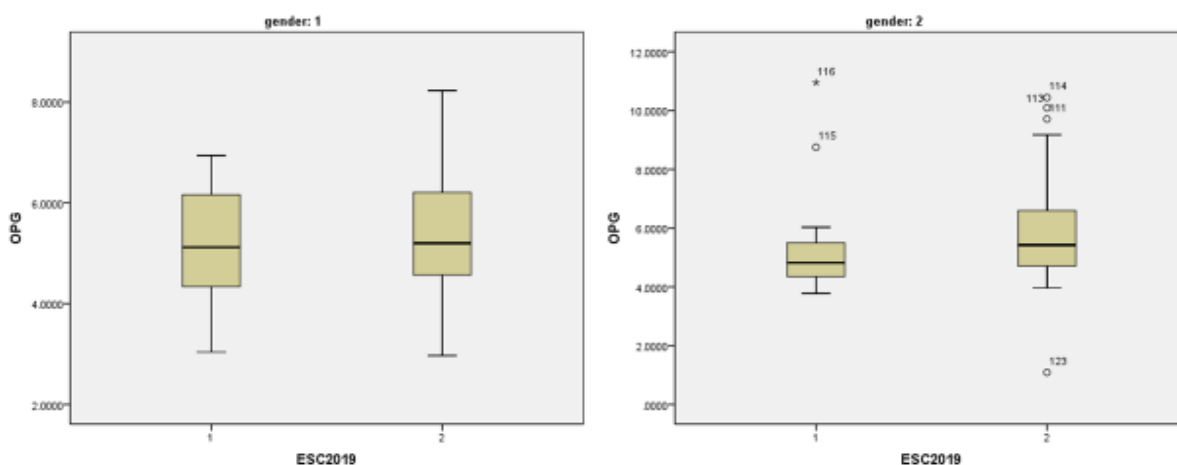
Фигура 12. Средни нива на OPG (pmol/l) спрямо ST1RE и ESC от 2019 г.

Медианата и интерквартилният обхват на OPG при мъжете с нисък ССР според критериите на ST1RE са 4,95 (4,31 – 5,86) pmol/l ; при мъжете с умерен ССР са 4,92 (4,04 – 5,37) pmol/l ; при мъжете с висок риск са 5,775 (4,855 – 6,87) pmol/l ; при жените с нисък ССР са 5,73 (4,24 – 5,74) pmol/l ; при умерен ССР са 5,60 (4,91 – 6,325) pmol/l ; при висок ССР са 6,25 (5,05 – 6,78) pmol/l . (фиг. 13)



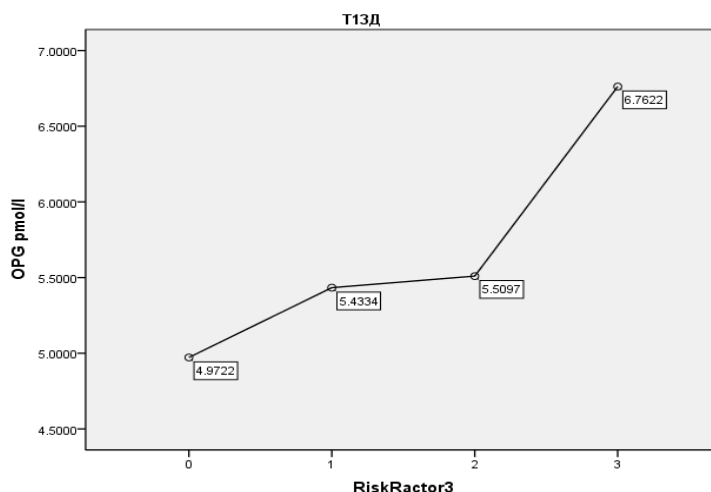
Фигура 13. OPG при мъже и жени според ST1RE. Gender 1 – мъже, 2 – жени

Медианите и интерквартилните обхвати на OPG при мъжете според ESC 2019 г. са: 5,12 (4,265 – 6,215) pmol/l за висок риск и 5,20 (4,56 – 6,218) pmol/l за много висок ССР. При жените са следните: 4,82 (4,24 – 5,60) pmol/l за висок риск и 5,425 (4,708 – 6,605) pmol/l за много висок ССР. (фиг. 14)



Фигура 14. OPG при мъже и жени спрямо ESC 2019 г. Gender 1 – мъже, 2 – жени.

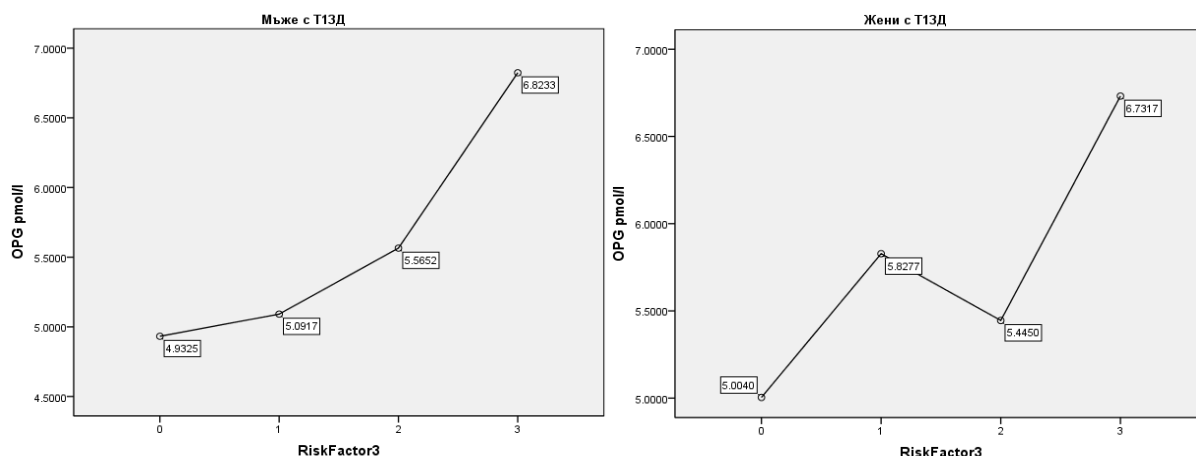
В група 0, средното ниво на OPG е $4,972 \pm 0,489$ pmol/l; в група 1 – $5,433 \pm 1,51$ pmol/l; в група 2 - $5,51 \pm 1,69$ pmol/l; в група 3 – $6,76 \pm 1,35$ pmol/l. $F = 2,466$, $p = 0,066$). (фиг. 15)



Фигура 15. Средни стойности на OPG (pmol/l) спрямо RiskFactor3

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

Еднофакторен дисперсионен анализ спрямо RiskFactor3 демонстрира значима разлика при мъжете, но при 90% доверителен интервал ($4,93 \pm 0,391$ pmol/l за 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: $5,004 \pm 0,600$ 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. 16)

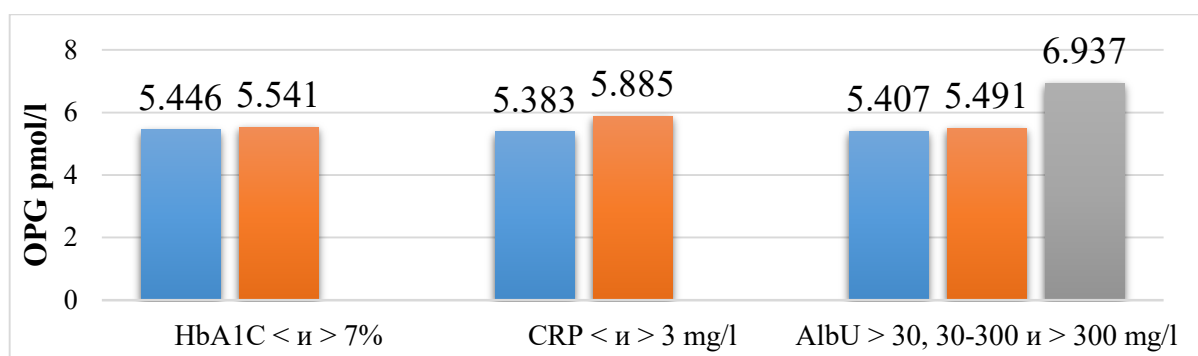


Фигура 16. OPG (pmol/l) при мъже и жени с Т1Д спрямо RiskFactor3

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. 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.

При лицата с дългогодишен Т1Д се съпоставиха средните нива на OPG 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; $5,491 \pm 1,848$ pmol/l и $6,937 \pm 1,609$ pmol/l). Сигнификантна разлика се установи в средните нива на OPG между така съпоставените групи спрямо AlbU, $F = 3,263$, $p = 0,042$. Регистрираха се 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, $p = 0,080$). (фиг. 17)



Фигура 17. Средни нива на OPG спрямо: HbA1C, CRP и AlbU при лица с дългогодишен Т1Д

В контролната група, намерените разлики спрямо HbA1C, CRP и AlbU са несигнификантни. В групата на Т1Д се установи значима корелация между OPG и AlbU ($r = 0,218$, $p = 0,021$). При контролите не се отчетоха сигнификантни зависимости. С цел да се установи линейната комбинация между стойностите на ALbU и OPG при лицата с Т1Д, беше приложен единичен линеен регресионен анализ ($F = 5,521$, $p = 0,021$). Стойността на коригирания коефициент на детерминация (adjusted R^2) е 0,039, което показва, че 4% от измененията в концентрацията на OPG могат да се обяснят от представения регресионен модел: **OPG (pmol/l) = 5,381 + 0,218.AlbU (mg/l)**

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

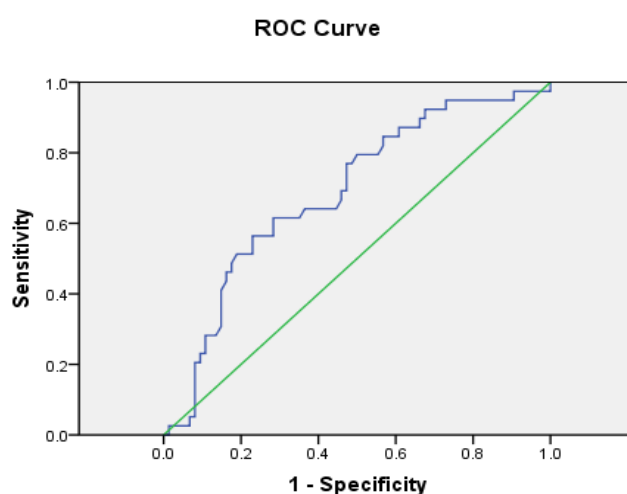
В таблица 16 са представени обобщени резултати от анализа. При ST1RE, AUC-ROC е 0,687, $p = 0,001$, а при ESC 2019 г. - 0,589, $p = 0,138$. Не се отчита добра прогностична стойност на OPG спрямо RiskFactor3 като

AUC е 0,520, $p = 0,734$. За разграничаване на пациенти с висок ССР според ST1RE е изведена cut-off стойност за OPG 5,315 pmol/l, с ДЧ 64,1% и ДС 63,5%. Определиха се: $LR+ = 1,75$ и $LR- = 0,57$, $DOR = 3,07$, индекс на Youden = 1,006 и ДЕ = 63,7%. (табл. 8, фиг. 18)

Таблица 10. Диагностична надеждност за OPG спрямо ST1RE

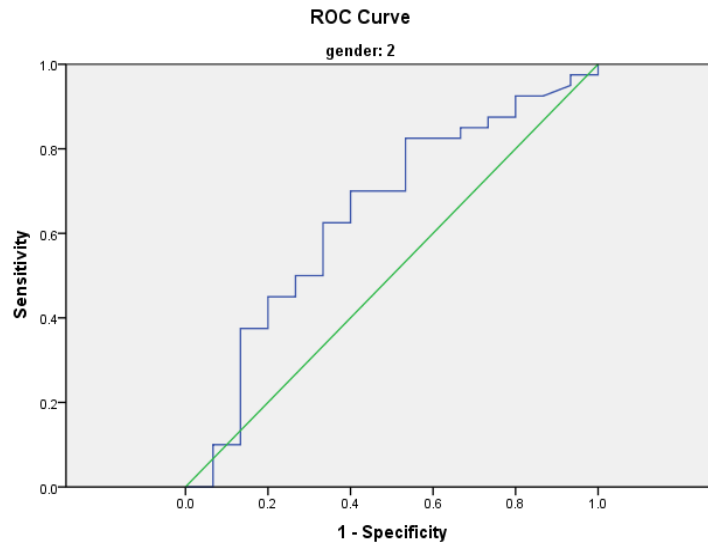
Показател	Критерий	cut-off	N	ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС	ДЕ
OPG (pmol/l)	ST1RE – висок ССР	5,315	113	25	47	27	14	64,1%	63,5%	63,7%

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



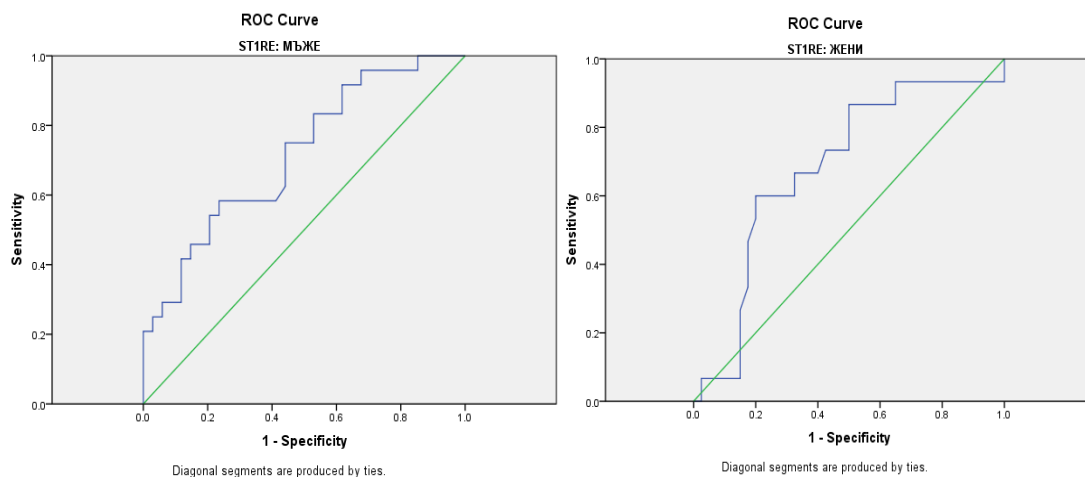
Фигура 18. AUC-ROC за оценка прогностична стойност на OPG при T1D спрямо ST1RE

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 с много висок ССР според ESC от 2019 г. – 5,025 pmol/l, при ДЧ 70% и ДС 60%. Определиха се: $LR+ = 1.75$, $LR- = 0.571$, $DOR = 3,064$, индекс на Youden = 1.1 и ДЕ = 67,2%. (фиг. 19)



Фигура 19. AUC-ROC крива – жени за оценка на прогностична стойност на OPG спрямо ESC от 2019 г.

Изведени са прагови стойности на OPG за отдиференциране на лица с висок ССР според ST1RE: 5,075 pmol/l с ДЧ 70,8% и ДС 55,9% за мъже и 5,355 pmol/l за жени с ДЧ 66,7% и ДС 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. (табл. 8, фиг. 20)



Фигура 20. AUC-ROC крива за оценка на прогностична стойност на OPG при мъже и жени с дългогодишен Т1Д спрямо ST1RE

Таблица 11. Диагностична надеждност на OPG спрямо St1RE и ESC 2019 г.

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

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

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

Средната стойност на ADNC е значимо по-висока при жените в двете изследвани групи, при MD = 8,182 µg/ml, t = - 2,566, p = 0,013 за здрави лица и MD = 7,157 µg/ml, t = -3,906, p = 0,000 за пациенти с Т1Д. (табл. 9)

Таблица 12. Средни стойности на ADNC в зависимост от пола

Група участници		Пол	N	mean	SD	t	P value	MD
Контролна група	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			

Мъжете с по-голяма продължителност на Т1Д имат по-високи нива на показателя ($12,327 \pm 5,662$ µg/ml) спрямо изследваните с давност под 24 години – $9,625 \pm 5,394$ µg/ml, MD = 2,702 µg/ml, t = 1,801, p = 0,077. При жените, не се регистрира значимо различие (t = - 0,056, p = 0,960).

Отчете се умерено положителна корелация при мъжете между давността на Т1Д и ADNC, r = 0,273, p = 0,040. При жените, изследваната връзка е несигнификантна, r = 0,042, p = 0,761. Не се отчете значима асоциация между възрастта и ADNC. Установи се сигнификантна връзка между ИТМ и ADNC при мъжете с Т1Д и тя е с обратна посока и голяма по

сила: $r = -0,466$, $p = 0,000$. При жените с Т1Д, отчетената връзка отново е отрицателна, но е значима при 90% достоверност на резултатите: $r = -0,241$, $p = 0,080$. В групата на контролите мъже се регистрира положителна корелация между ADNC и ADMA ($r = 0,430$, $p = 0,020$). 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 връзки между серумните нива на ADMA и OPG в двете изследвани групи. (табл. 10)

Таблица 13. Корелации между ADNC и: възраст, давност на Т1Д, ADMA и OPG

Пол	Група			Възраст (години)	Давност на Т1Д (години)	ИТМ (kg/m ²)	ADMA (µmol/l)	OPG (pmol/l)
Мъже	Група с 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	
	Контрол-на група	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	Група с 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	
	Контрол-на група	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

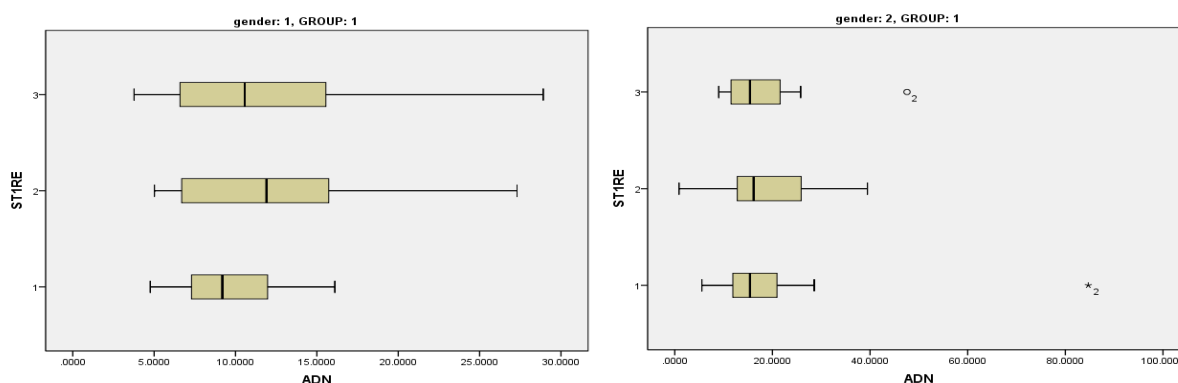
Коефициентът на рангова корелация Спирмън ρ между ADNC и RiskFactor3 е : $\rho = -0,23$, $p = 0,015$. Приблизително 5% от дисперсията в концентрациите на ADNC при лица с Т1Д се асоциират с дисперсията в RiskFactor3. Знакът на корелацията е отрицателен и се запазва такъв при отчетените зависимости между ADNC и: ESC от 2019 г. и ST1RE, но не е статистически значим. (табл. 10)

Таблица 14. Корелации между ADNC и: ST1RE, ESC 2019 г. и 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

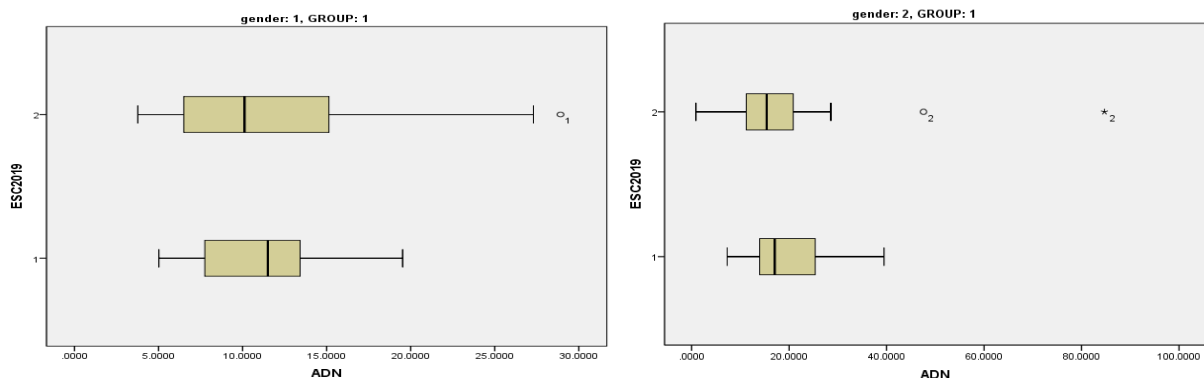
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). ** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Липсва статистически значимо различие в средноаритметичните нива на ADNC спрямо ST1RE. Медианите и интерквartilните обхвати на ADNC при мъжете с нисък ССР са 9,19 (7,19 – 12,24) µg/ml; с умерен – 11,905 (6,528 – 16,488) µg/ml; с висок – 10,57 (6,45 – 15,555) µg/ml; при жените са: с нисък – 15,39 (11,433 – 21,168) µg/ml; с умерен 16,15 (11,895 – 26,54) µg/ml; при висок 15,39 (11,44 – 22,29) µg/ml. (Фиг. 21)



Фигура 21. ADNC (µg/ml) при мъже и жени според ST1RE. Gender 1 – мъже, 2 – жени; 1 – нисък; 2 – умерен, 3 – много висок ССР

При ESC 2019 г. се установи близко до статистически значимо различие при мъжете: $10,913 \pm 3,972$ µg/ml с висок и $11,386 \pm 6,339$ µg/ml с много висок ССР, MD = - 0,4723 µg/ml, t = - 0,290, p = 0,065. При жените – $20,006 \pm 9,099$ µg/ml с висок и $17,773$ µg/ml с много висок ССР, MD = 2,233 µg/ml, t = 0,582, p = 0,563. (фиг. 22)

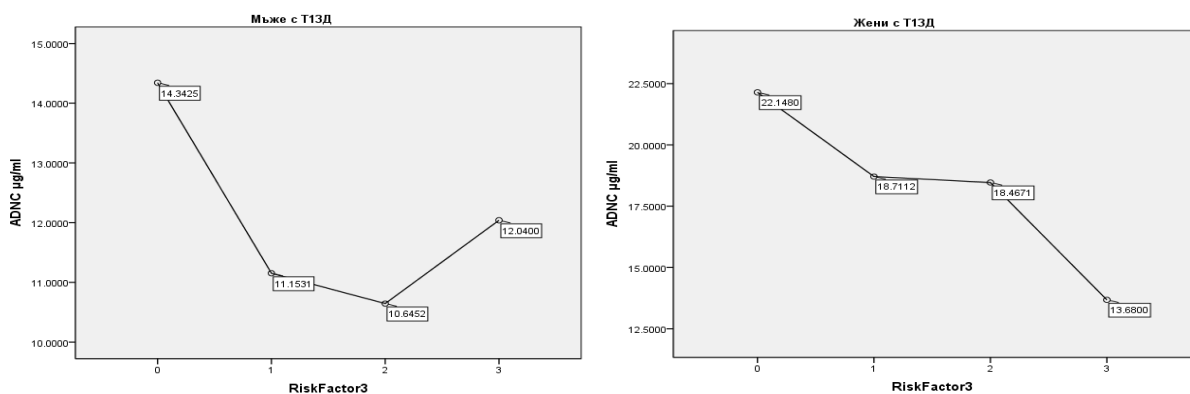


Фигура 22. ADNC ($\mu\text{g/ml}$) според ESC 2019 г. (Gender 1 – мъже, 2 – жени; 1 – висок, 2 – много висок CCP)

Медианите и интерквартилните обхвати са: 11,50 (7,665 – 13,44) $\mu\text{g/ml}$ при мъже с висок 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 и 15,39 (10,98 – 20,85) $\mu\text{g/ml}$ при много висок CCP. (фиг. 22)

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

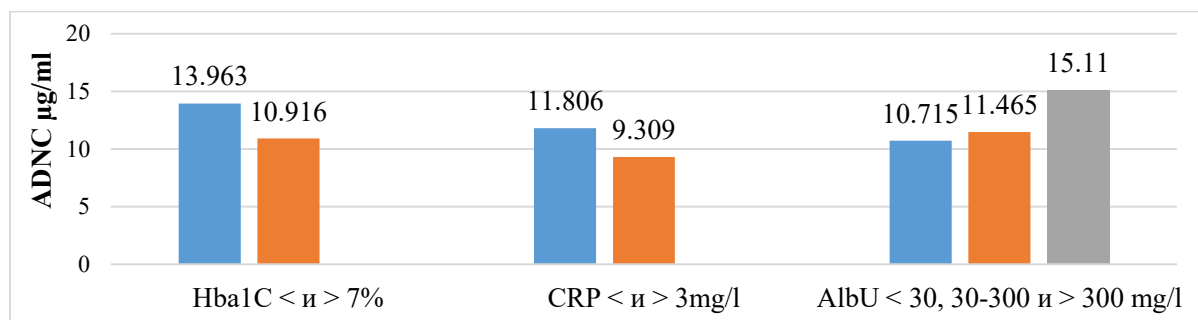
Еднофакторен дисперсионен анализ спрямо RiskFactor3 демонстрира тенденция за намаляване, но без значима разлика ($F = 0,485$, $p = 0,694$ при мъже с Т1Д и $F = 0,423$, $p = 0,738$ при жени с Т1Д). (фиг. 23)



Фигура 23. Средни стойности на ADNC ($\mu\text{g/ml}$) според RiskFactor3

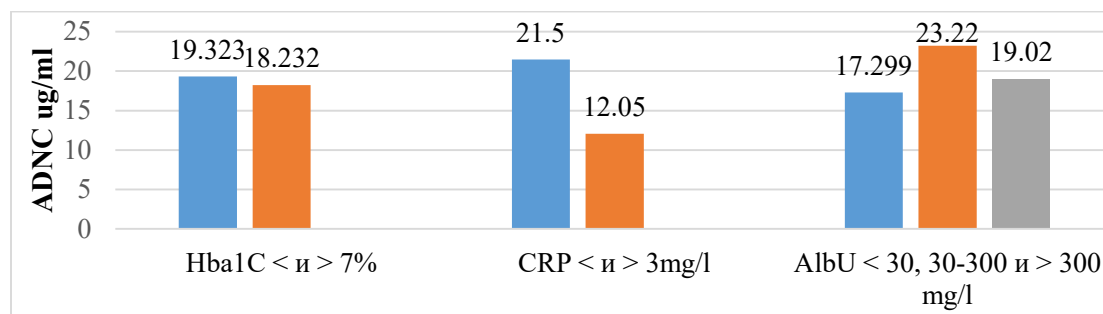
Медианите и интерквартилните обхвати на ADNC при мъжете с Т1Д са: 15,405 (7,87 – 19,75) $\mu\text{g/ml}$ за група 0; 10,57 (7,295 – 12,59) $\mu\text{g/ml}$ за група 1; 8,04 (5,07 – 15,172) $\mu\text{g/ml}$ за група 2; 10,98 (6,87 - *) $\mu\text{g/ml}$ за група 3; при жените са: 20,85 (17,935 – 27,01) $\mu\text{g/ml}$ 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.

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 $9,309 \pm 5,012 \mu\text{g/ml}$ ($MD = 2,497 \mu\text{g/ml}$, $t = -1,408$, $p = 0,165$). 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. 24)



Фигура 24. Средни нива на ADNC спрямо HbA1C, CRP и AlbU при мъже с Т1Д

Не се отчитат статистически значими различия между жените с Т1Д и 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 $MD = 9,447$, $t = -2,683$, $p = 0,01$. Еднофакторен дисперсионен анализ с последващо приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey) не установи 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. 25)



Фигура 25. Средни нива на ADNC спрямо HbA1C, CRP и AlbU при жени с Т1Д.

За контролната група се установи сигнификантна разлика в стойностите на ADNC при жени с AlbU под 30 ug/ml и 30 – 300 ug/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: $r = 0,777$, $p = 0,000$. С цел да се установи линейната комбинация между стойностите на AlbU и ADNC, беше приложен единичен линеен регресионен 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. Наличната информация за AlbU позволи да се прогнозира стойността на ADNC при контролите жени, $F = 33,603$, $p = 0,015$. 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 R^2) 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.

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

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.

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 Т1Д

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

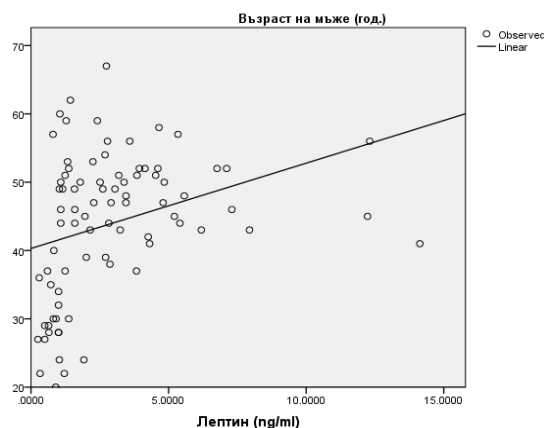
След приложение на t-тест за независими извадки на Стюдънт се установиха значими междуполови различия в средноаритметични стойности на Lер и при двете изследвани групи: MD = 3,109, t = - 3,540, p = 0,001 при контроли и MD = -5,349, t = - 5,458, p = 0,000 при пациенти с Т1Д. (табл.11)

Таблица 15. Средни стойности на Lер в зависимост от пола

Група участници	Пол	N	mean	SD	t	P value	MD
Контролна група	Мъже	27	3,0815	1,99841	-3,540	0,001	-3,10935
	Жени	24	6,1908	4,04543			
Пациенти с Т1Д	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.

При мъжете с давност на Т1Д над 24 г. се отчитат значимо по-високи стойности за Lер спрямо изследваните с давност под 24 г. ($3,4685 \pm 3,443$ ng/ml спрямо $1,926 \pm 1,618$ 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 ($9,976 \pm 8,799$ ng/ml) спрямо изследваните с давност над 24 години ($7,0525 \pm 4,625$ ng/ml, MD = 2,924, t = - 1,581, p = 0,050). Корелационна зависимост, която се отчита в двете изследвани групи е между възрастта на мъжете и концентрацията на Lер. (фиг. 26)



Фигура 26. Корелация между Lер и възраст на изследваните мъже

В двете изследвани групи се установиха сигнификантни връзки между ИТМ и серумните нива на Lер 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. 19)

Таблица 16. Зависимости между: Lер, ADNC ,давност на Т1Д и възраст

Група				Възраст год.	Давност год.	ИТМ (кг/м ²)	ADNC (µg/ml)
Т1Д	Мъже	Lер ng/ml	Pearson Correlation P value Брой	0,284* 0,034 56	0,196 0,147 56	0,667** 0,000 56	-0,185 0,171 56
	Жени	Lер ng/ml	Pearson Correlation P value Брой	-0,024 0,863 52	-0,194 0,168 52	0,635** 0,000 52	-0,198 0,159 52
Контрол- на група	Мъже	Lер ng/ml	Pearson Correlation P value Брой	0,425* 0,027 27	*	0,806 0,000 27	-0,067 0,740 27
	Жени	Lер ng/ml	Pearson Correlation P value Брой	-0,008 0,971 24	*	0,762 0,000 24	-0,052 0,810 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 линейката връзка между Lер, 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 Lер и OPG ($r = 0,296$, $p = 0,027$) при мъжете. При жените не се отчитат значими резултати.

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

С цел да се изследва връзката между концентрацията на Lер и категорията на ССР, дефинирана според ST1RE, ESC от 2019 г. и предложения модел RiskFactor3, беше използван коефициентът на рангова корелация Спирмън ро. Стойността на рангова корелация Спирмън ро между така изследваните променливи при мъжете е: $rho = 0,23$, $p = 0,084$ между Lер и RiskFactor3; $rho = 0,361$, $p = 0,006$ между Lер и ESC 2019 г. и $rho = 0,549$, $p = 0,000$ между Lер и ST1RE. Прави впечатление, че и трите

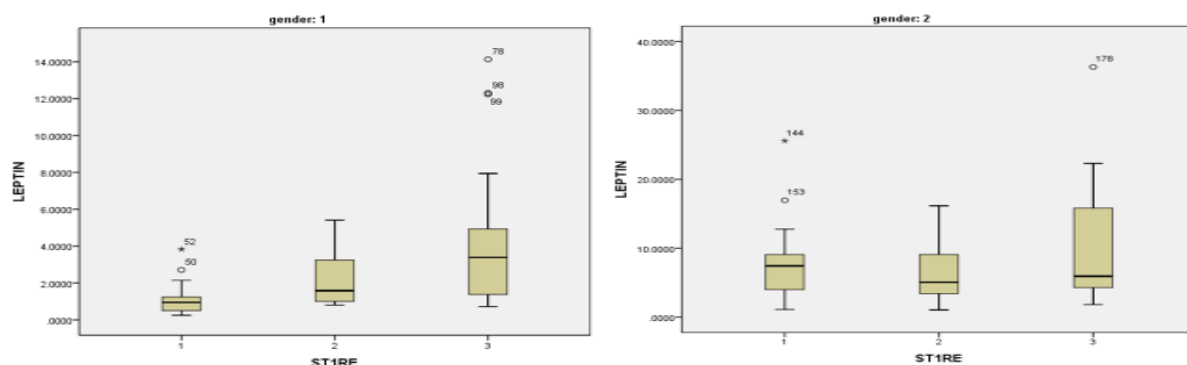
установени зависимости са сигнификантни. Знакът на корелациите е положителен, а големината на ефекта е най-голяма при ST1RE (табл. 13)

Таблица 17. Корелационни зависимости на Лер със ST1RE, ESC 2019 г. и предложения модел RiskFactor3

			Лер (ng/ml)	RiskFaktor3	ESC от 2019 г.	ST1RE
Spearman's rho Мъже с Т1Д	Лер (ng/ml)	Correlation	1,000	0,233	0,361**	0,549**
		Coefficient	.	0,084	0,006	0,000
		P value	56	56	56	56
Жени с Т1Д		Correlation	1	0,437**	0,200	0,070
		Coefficient	.	0,001	0,151	0,617
		P value	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 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 RiskFactor3. (табл. 13)

Спрямо ST1RE сигнификантна разлика се отчете в средните нива на Лер между мъжете с нисък ССР и изследваните с 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 висок ССР ($2,162 \pm 1,561$ ng/ml спрямо $4,354 \pm 3,743$ ng/ml, MD = 2,192 ng/ml, $p = 0,029$), $F = 7,070$, **$p = 0,002$** . При жените с Т1Д резултатите от F-теста показаха, че не може категорично да се отклони нулевата хипотеза H_0 , $F = 2,029$, $p = 0,142$. Медианите и интерквартилните обхвати на Лер са: при мъжете с нисък – 0,95 (0,458 – 1,468) ng/ml; с умерен – 1,585 (1,000 – 3,293) ng/ml; с висок ССР – 3,39 (1,355 – 5,07) ng/ml; при жените с нисък – 7,43 (3,975 – 9,103) ng/ml; с умерен – 5,06 (3,345 – 9,688) ng/ml; с висок ССР – 5,94 (4,27 – 16,11) ng/ml. (фиг. 27)



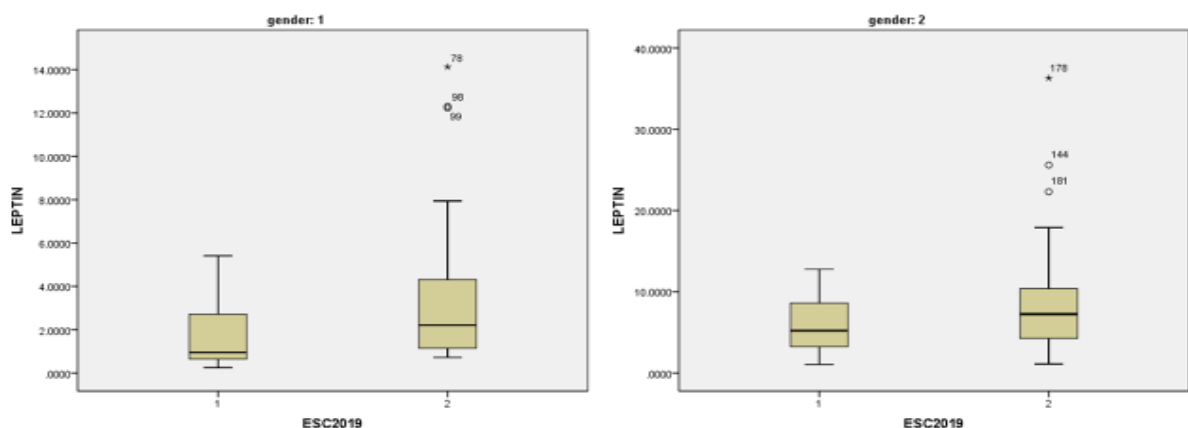
Фигура 27. *Лер (ng/ml) при мъже и жени спрямо ST1RE. (Gender 1 – мъже, gender 2 – жени, 1 – нисък ССР, 2 – умерен ССР, 3 – висок ССР)*

По отношение на ESC от 2019 г. отчетената разлика между мъжете с висок и тези с много висок ССР е $1,6288 \text{ ng/ml}$, $t = -1,982$, $p = 0,053$ ($1,757 \pm 1,664 \text{ ng/ml}$ спрямо $3,386 \pm 3,281 \text{ ng/ml}$). При жените MD е $3,188 \text{ ng/ml}$, $t = -2,080$, $p = 0,043$ ($5,925 \pm 3,699 \text{ ng/ml}$ спрямо $9,113 \pm 7,387 \text{ ng/ml}$). (табл. 14)

Таблица 18. 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	Лер (ng/ml)	Висок ССР	18	1,757222	-1,62883	1,6644406	-1,982	0,053
		Много висок ССР	38	3,386053	-1,62883	3,2814849		
Жени	Лер (ng/ml)	Висок ССР	15	5,925333	-3,18809	3,6998318		
		Много висок ССР	38	9,113421	-3,18809	7,3871416	-2,080	0,043

Медианите и интерквартилните обхвати са: при мъже с висок риск – $0,95$ ($0,6125 - 2,895$) ng/ml , а при мъже с много висок ССР – $2,21$ ($1,133 - 4,365$) ng/ml ; при жени с висок риск са $5,21$ ($2,95 - 9,33$) ng/ml , а при жени с много висок ССР – $7,245$ ($4,203 - 11,205$) ng/ml . (фиг. 28)



Фигура 28. *Lep (ng/ml) при мъже и жени според ESC от 2019 г. (1 – висок CCR, 2 – много висок CCR, gender 1 – мъже, 2 – жени)*

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

Еднофакторен дисперсионен анализ за проверка на статистическа значимост на разликата между средноаритметичните стойности на Lep при пациенти с Т1Д според RiskFactor3 демонстрира отново тенденция за пропорционално значимо нарастване в стойностите на Lep ($F = 6,717$, $p = 0,001$ при мъже и $F = 3,666$, $p = 0,018$ при жени). (табл. 15)

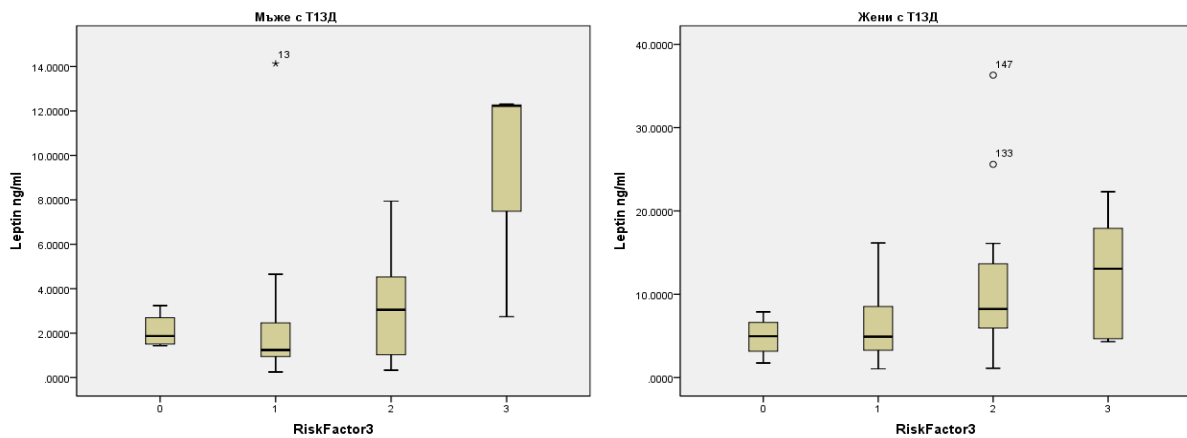
Таблица 19. Средни стойности за Lep при мъже и жени според RiskFactor3

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

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

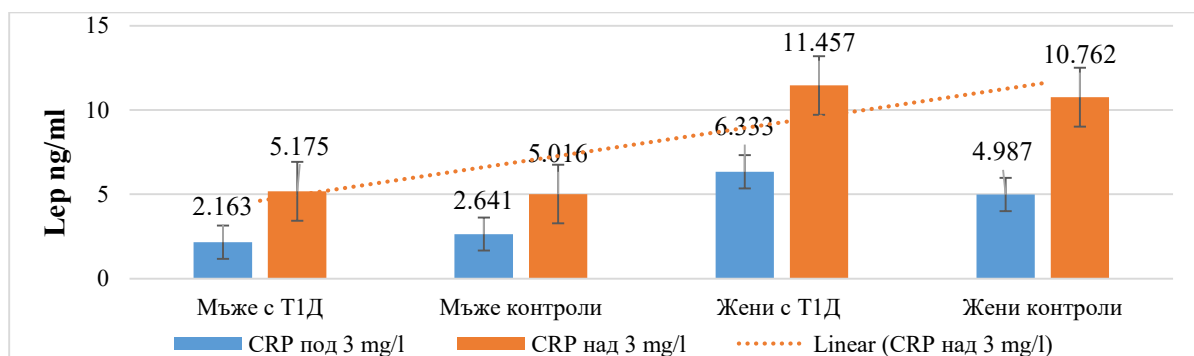
Медианите и интерквартилните обхвати на Lep при мъже от различните категории според RiskFactor3 са: 1,87 (1,47 – 2,298) ng/ml за група 0; 1,24 (0,924 – 2,485) ng/ml за група 1; 3,05 (1,015 – 4,87) ng/ml за група 2; 12,23 (2,74 – *) ng/ml за група 3. Медианите и интерквартилните обхвати на Lep

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. 29)



Фигура 29. *Lep (ng/ml) при мъже и жени спрямо RiskFactor3*

Не се регистрираха значими различия в средните нива на Lep 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). В двете изследвани групи, при мъже с Т1Д и при здрави мъже, се установяват сигнификантно по-високи резултати за Lep 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, $t = 2,664$, $p = 0,013$. Маркирана е линия на тенденцията – пропорционално увеличение в стойностите на Lep. (фиг. 30)

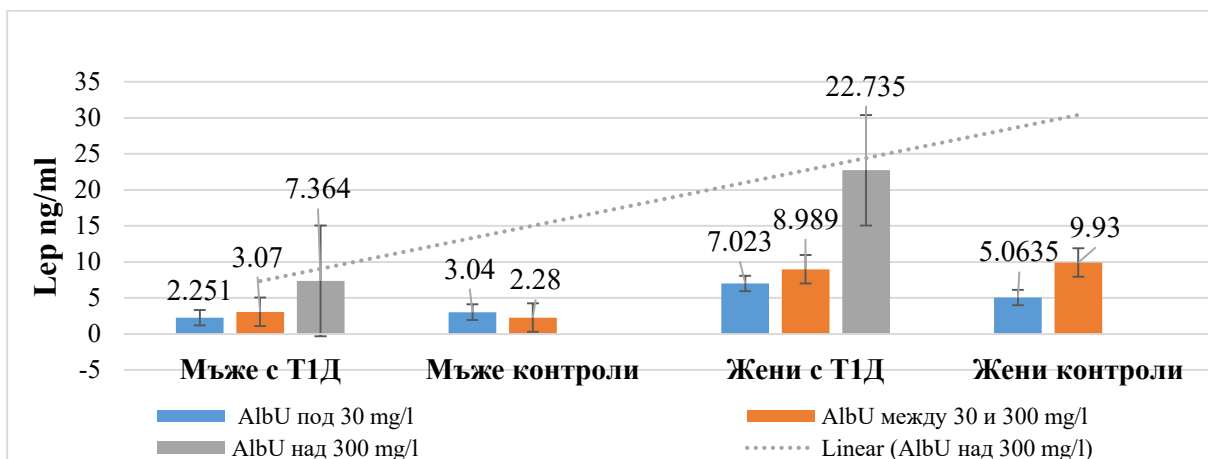


Фигура 30. *Средни стойности за Lep в зависимост от CRP под и над 3 mg/l при мъже и жени*

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. 31)

При мъжете с Т1Д, средните стойности на Lер спрямо AlbU под 30 mg/l, между 30 и 300 mg/l и над 300 mg/l 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). Маркирана е линия на тенденцията, според която се наблюдава пропорционално увеличение в стойностите на изследваната променлива. (фиг. 32)

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. 31)



Фигура 31. Средни нива за Lер в зависимост от стойността на AlbU

В групата на Т1Д се установиха три сигнификантни корелации: между Lер и AlbU при мъжете (r = 0,367, p = 0,005) и между Lер и AlbU (r = 0,413, p = 0,002) и Lер и CRP (0,378, p = 0,006) при жените. Всички зависимости

изброени дотук са средни по сила и прави по посока. При контролните случаи с Лер 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 ($r = 0,505$, $p = 0,012$). (табл. 16)

Таблица 20. Корелационни зависимости между Лер и: AlbU, CRP и HbA1C

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

Комбинацията от променливи CRP и AlbU за прогноза на стойността за Лер 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). (табл. 17)

Таблица 21. Множествен линеен регресионен анализ със зависима променлива Lep (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 Lep могат да се обяснят с представените регресионно модели. Изведени са следните регресионни уравнения:

Lep (ng/ml) = 5,424 + 0,325.CRP (mg/l) + 0,358.AlbU (mg/l) за жени с Т1Д

Lep (ng/ml) = 3,615 + 0,521.CRP (mg/l) + 0,345.AlbU (mg/l) за здрави жени

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 Lep могат да се обяснят с представения регресионен модел, което съгласно Коен (Cohen, 1988) отново е малка големина на ефекта. Изведено е следното регресионно уравнение:

Lep (ng/ml) = 2,388 + 0,367.AlbU (mg/l)

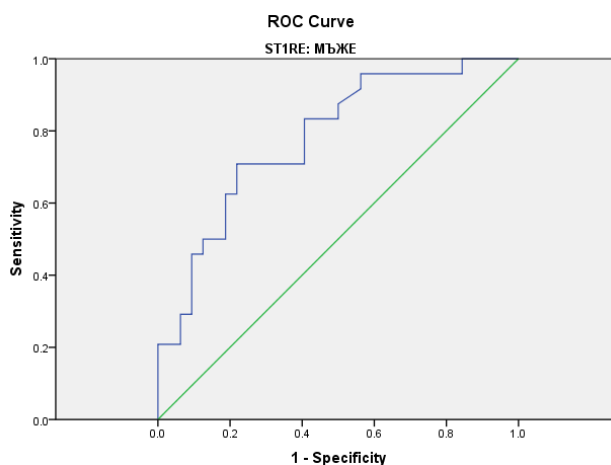
5.4. Lер – логистични регресионни модели и ROC анализи за извеждане на прагови стойности

По отношение на ST1RE, 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 (HbA1C $\geq 7\%$, CRP ≥ 3 mg/l или AlbU ≥ 30 mg/l) с 1,21 пъти. (табл. 18)

Таблица 22. Прогностична стойност на Lер спрямо: ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3

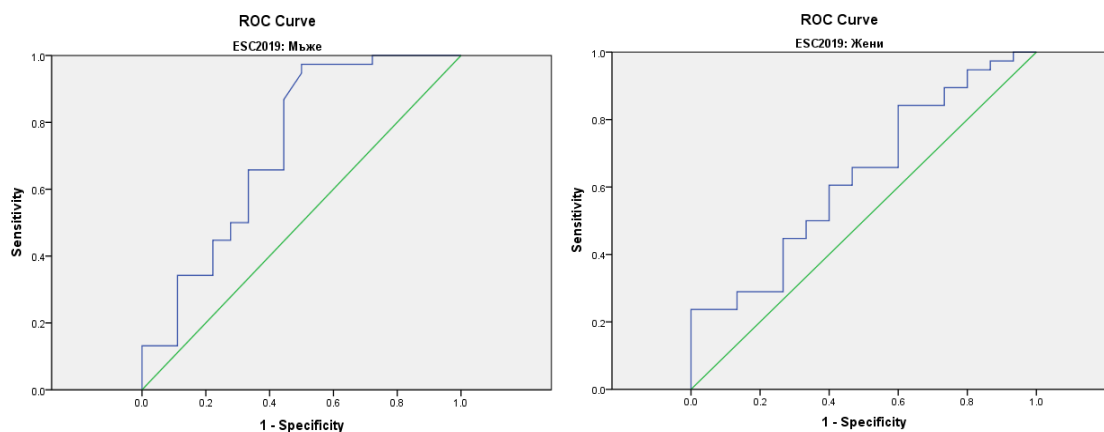
Модел	Пол	OD%	95% CI	P value
ST1RE - висок ССР	Мъже	1,693	1,169 – 2,451	0,005
	Жени	1,087	0,990 – 1,193	0,081
ESC от 2019 г. – много висок ССР	Мъже	1,404	0,971 – 2,029	0,071
	Жени	1,113	0,969 – 1,278	0,129
RiskFactor3 ≥ 2 РФ (HbA1C $\geq 7\%$, CRP ≥ 3 mg/l или AlbU ≥ 30 mg/l)	Мъже	1,161	0,946 – 1,424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

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 Lер в отдиференциране на мъже с висок ССР. При cut-off стойност на Lер = 2,28 ng/ml, Lер има ДЧ 70,8% и ДС 78,1%. Определиха се: LR+ = 3,23 и LR- = 0,309, DOR = 10,45, индекс на Youden = 0,927 и ДЕ = 75 %. (фиг. 32)



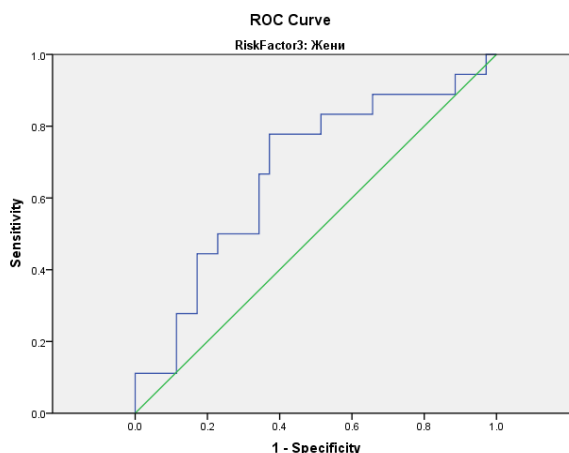
Фигура 32. AUC - ROC за Lер (ng/ml) при отдиференциране на мъже с висок ССР според ST1RE. Sensitivity- чувствителност, specificity – специфичност.

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 ефективност при мъже спрямо жени с Т1Д. При cut-off стойност на $Lep = 1,38 \text{ ng/ml}$ за мъже, биомаркерът има ДЧ 65,8% и ДС 66,7%; при cut-off = 5,475 ng/ml за жени с ДЧ 60,5% и ДС 60%. (фиг. 33) 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 33. ROC криви за диагностичната надеждност на Lep при отдиференциране на мъже и жени с много висок ССР 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 $Lep = 5,815 \text{ ng/ml}$ за жени, биомаркерът има ДЧ 77,8% и ДС 62,9%. (фиг. 34) 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 ДЕ = 67,9% за жени с Т1Д. (табл. 19)



Фигура 34. AUC - ROC за Lep при отдиференциране на жени от групи 0, 1, 2 спрямо група 3 на RiskFactor3

Таблица 23. Диагностична надеждност на Lер спрямо ST1RE, ESC от 2019 г. и RiskFactor3

Показател	Критерий	cut-off	N	ИП	ИО	ФП	ФО	ДЧ	ДС	ДЕ
Lер (ng/ml) Мъже	St1RE - висок ССР	2,28	56	17	25	7	7	70,8%	78,1%	75%
Lер (ng/ml) Мъже	ESC от 2019 г. - много висок ССР	1,38	56	25	12	6	13	65,8%	66,7%	66%
Lер (pmol/l) Жени	ESC от 2019 г. - много висок ССР	5,475	53	23	15	9	6	60,5%	60%%	71,7%
Lер (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 Lер има добра прогностична стойност за мъже при отдиференцирането на висок ССР спрямо ST1RE (приблизително 80%) и ESC от 2019 г. (приблизително 70%), а при жените – при отдиференциране на 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

T-тестът за независими извадки на Стюдънт демонстрира статистически значимо различие за следните левкоцитни променливи: 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 = $0,053 \cdot 10^9/L$, $t = 2,235$, $p = 0,027$). (табл. 26)

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 се отчетоха при 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 МСНС 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. 26)

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 – $10,652 \pm 1,172fL$ 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 $12,924fL \pm 2,19fL$ vs $12,25 \pm 1,87fL$ 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. 20)

Таблица 24. Хематологични показатели при Т1Д и здрави индивиди

Група участници		N	Mean	SD	t	P value	MD
WBC $10^9/L$	пациенти с Т1Д контролна група здрави	124 59	7,0250 6,4214	1,90846 1,63854	2,090	0,038	0,60364
Neu $10^9/L$	пациенти с Т1Д контролна група здрави	124 59	4,2141 3,7122	1,49966 1,26142	2,223	0,027	0,50191
Neu %	пациенти с Т1Д контролна група здрави	124 59	58,9960 56,8644	9,45820 7,89524	1,599	0,112	2,13156
Ео $10^9/L$	пациенти с Т1Д контролна група здрави	124 59	0,2160 0,1629	0,21679 0,10445	2,235	0,027	0,05309
Ео %	пациенти с Т1Д контролна група здрави	124 59	2,8919 2,5661	2,21387 1,53326	1,019	0,309	0,32583
Ва$10^9/L$	пациенти с Т1Д контролна група здрави	124 59	0,0439 0,0441	0,02495 0,02174	-0,052	0,959	-0,00020
Ва %	пациенти с Т1Д контролна група здрави	124 59	0,6476 0,7034	0,37686 0,35183	-0,956	0,340	-0,05581

Mo 10⁹/L	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	0,5190 0,4883	0,18890 0,13787	1,241	0,216	0,03065
Mo %	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	7,5113 7,7356	1,87821 1,70129	-0,806	0,422	-0,22430
Lym 10⁹/L	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	2,0252 1,9914	0,64846 0,53075	0,374	0,709	0,03381
Lym %	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	29,4944 31,7288	7,64094 7,07952	-1,945	0,054	-2,23446
Hb g/L	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	138,23 142,15	17,734 14,208	-1,605	0,111	-3,919
RBC 10¹²/L	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	4,6600 4,7780	0,58851 0,55380	-1,291	0,198	-0,11797
HCT L/L	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	0,4139 0,4245	0,05145 0,03774	-1,583	0,115	-0,01068
MCV fl	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	88,9589 89,3746	5,41877 7,13342	-0,436	0,663	-0,41571
MCH pg	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	29,5145 30,4661	2,17311 4,91362	-1,819	0,071	-0,95159
MCHC g/L	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	331,62 334,75	11,734 11,910	-1,676	0,096	-3,125
RDW_CV %	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	13,032 12,983	1,5562 1,4080	0,206	0,837	0,0492
MPV fL	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	10,5621 10,2220	1,17200 1,16087	1,846	0,067	0,34006
PDW fL	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	109 47	12,9339 12,2489	2,18794 1,86791	1,993	0,049	0,68501
P-LCR %	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	109 47	31,5266 29,5574	8,12278 7,35452	1,486	0,141	1,96916
PCT %	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	109 47	0,2992 0,2647	0,07017 0,04822	3,545	0,001	0,03449
PLT x10⁹/L	пациенти с Т1Д контролна група зdravi	124 59	280,60 253,08	76,016 47,098	2,999	0,003	27,520

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

При пациентите с по-голяма продължителност на заболяването WBC, Eo и Neu показват редукция. Ba, Mo и Lym се увеличават при по-продължително боледуване, $p > 0,05$. RBC 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; $90,42 \pm 4,11 \text{ fl}$ vs $87,55 \pm 6,15 \text{ fl}$, MD = $2,87 \text{ fl}$, $p = 0,003$ за MCV; $29,96 \pm 1,7 \text{ pg}$ vs $29,08 \pm 2,48 \text{ pg}$, MD = $0,88 \text{ pg}$, $t = -2,319$, $p = 0,022$ 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; $10,34 \pm 1,26 \text{ fL}$ vs $10,79 \pm 1,03 \text{ fL}$, MD = $0,44 \text{ fl}$, $t = -2,132$, $p = 0,032$ 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 $12,68 \pm 2,46 \text{ fL}$ vs $13,17 \pm 1,89 \text{ fL}$, MD = $0,49$, $t = -1,173$, $p = 0,243$ за PDW. От петте анализирани показателя се регистрират значими разлики за MPV и PLT. (табл. 21)

Таблица 25. 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.

При лица с Т1Д с HbA1C над 7%, намерената стойност за MCV е $88,352 \pm 5,436 \text{ fL}$ vs $92,311 \pm 3,999 \text{ fL}$ при HbA1C под 7%, MD = $3,958 \text{ fL}$, $t = -3,025$, $p = 0,003$. При случаите с лош гликемичен контрол средното ниво на MCH е $29,320 \pm 2,256 \text{ pg}$, а при HbA1C под 7% - $3,589 \pm 1,193 \text{ pg}$, MD = $1,269 \text{ pg}$, t

= - 3,613, $p = 0,001$. RDW-CV% е по-високо при HbA1C над 7%: $13,057 \pm 1,652\%$ vs $12,895 \pm 0,875\%$, но без значима разлика. Hb (g/l) се понижава при HbA1C > 7% - $137,9 \pm 18,443\text{g/L}$ vs $139,74 \pm 13,453\text{ g/L}$ при HbA1C < 7%, MD = 1,775 g/l, $p = 0,690$. Сигнификантни различия се установиха при PCT и PLT, като те са по-високи при HbA1C над 7%: $286,32 \pm 78,259 \cdot 10^9/\text{L}$ vs $249,00 \pm 53,438 \cdot 10^9/\text{L}$, MD = $37,324 \cdot 10^9/\text{L}$, $p = 0,014$ 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. 22)

Таблица 26. Сигнификантни различия в зависимост от HbA1C% под и над 7% при лица с дългогодишен Т1Д за MCV, MCH, PCT и PLT

	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 $\times 10^9/\text{L}$	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 групата с Т1Д се установяват сигнификантни междуполови разлики при всички тромбоцитни показатели с превес при жените: $10,524 \pm 0,999\text{fl}$ спрямо $10,605 \pm 1,35\text{fl}$, $p = 0,006$ 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 $268,73 \pm 75,031 \cdot 10^9/\text{L}$ спрямо $294,12 \pm 75,501 \cdot 10^9/\text{L}$, $p = 0,063$ за PLT. (табл. 23)

Таблица 27. Тромбоцитни показатели в зависимост от половата принадлежност

Група		Пол	N	Mean	SD	t	P value
Група с 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			
Контрол-на 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.

Изключение правят резултатите за PDW, които са по-високи при мъжете: $12,936 \pm 1,869\text{fl}$ vs $12,932 \pm 2,535\text{fl}$, $p = 0,026$. 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. 29)

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 $F = 4,980$, $p = 0,029$, $F = 3,517$, $p = 0,064$.

Съпоставени са случаите в двете тествани групи според нивото им на MPV (лимитирано над и под 10%) при 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 – $X^2 = 1,211$, $p = 0,270$. 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

анализираните 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.

6.2. Връзки с OPG и ADMA

В таблица 30 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 ранга 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. При еритроцитните 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. 24)

Таблица 28. 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 25 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 асоциацията 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 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.

Таблица 29. 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. По отношение на еритроцитните променливи намерените корелации са отрицателни. При тромбоцитните променливи, от една страна, се регистрира обратна зависимост на ST1RE с PLT, а от друга – положителна с PDW. (табл. 26)

Таблица 30. Зависимости между ST1RE и показатели от кръвната картина

		Lym 10 ⁹ /L	RBC x10 ¹² /L	Hb g/l	MPV fL	PDW fL	P-LCR %	PLT x10 ⁹ /L
ST1RE N(124)	Pearson Correlation	-0,153	-0,224*	-0,142	0,138	0,190	0,154	-0,129
	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 27 са представени корелационните коефициенти на връзки между хематоморфологичните показатели и ESC от 2019 г. Намерените корелации с Hb, RBC и HCT тук не са значими, но по аналогия със ST1RE отново са с обратна посока.

Таблица 31. Корелации между ESC 2019 г. и показатели от кръвната картина

		Ba x10 ⁹ /L	RBC x10 ¹² /L	Hb g/L	HCT L/L	MPV fL
ESC от 2019 г. N (124)	Pearson Correlation	-0,174	-0,125	-0,139	-0,138	0,107
	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)						

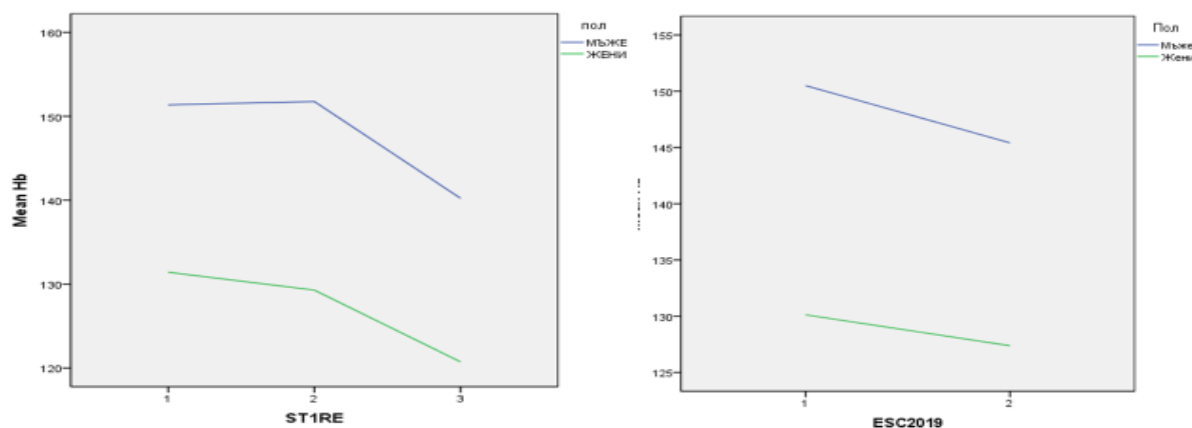
В таблица 28 са представени корелационните коефициенти на редица променливи с отчетена значимост или близка до сигнификантната при RiskFactor3.

Таблица 32. Корелации между RiskFactor3 и 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 N (124)	Pearson Correlation	0,200	0,194	0,162	-0,265	-0,145	-0,212	-0,268	-0,197	0,138	0,228	0,190
	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)												

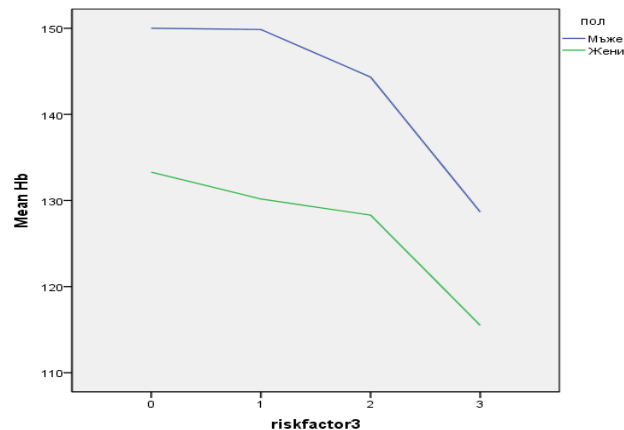
6.4. Анемия и ССР при лица с дългогодишен Т1Д

Представени са линейни графики със средноаритметичните нива на Hb (g/l) при мъже и жени с Т1Д според ST1RE и ESC от 2019 г. (фиг. 35)



Фигура 35. Тенденция за анемия при мъже и жени според ST1RE и ESC 2019 г.

Установената тенденция за анемия е най-демонстративна спрямо RiskFactor3. (фиг. 36)



Фигура 36. Тенденция за анемия (средна концентрация на Hb g/l) при мъже и жени според Riskfactor3

Намерено е статистически значимо различие в средните нива на Hb след приложение на еднофакторен дисперсионен анализ при ST1RE за мъже: $F = 5,50$, $p = 0,006$. След приложение на постхок тест на Туки HDS (Tukey) тази разлика остана сигнификантна между мъжете с нисък и изследваните с висок CCP ($MD = 11,138$ g/l, $p = 0,023$) и между мъжете с умерен и тези с висок CCP ($MD = 11,531$ g/l, $p = 0,014$). При жените регистрираното различие не достигна статистическа значимост ($F = 2,48$, $p = 0,093$). 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 ($t = 0,594$, $p = 0,555$). При Riskfactor3 статистически значимо различие се установи при мъжете: $148,25 \pm 12,209$ g/l за група 0, $150,74 \pm 14,047$ g/l за група 1, $144,33 \pm 14,493$ g/l за група 2 и $128,67 \pm 10,786$ 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: $134,60 \pm 10,213$ g/l за група 0, $130,04 \pm 15,392$ g/l за група 1, $127,63 \pm 16,067$ g/l за група 2 и $115,50 \pm 15,437$ g/l за група 3 ($F = 1,811$, $p = 0,156$).

Регресионен модел със статистическа значимост се установи при мъжете с висок CCP според ST1RE: $F = 7,409$, $p = 0,012$. 21,8% от измененията в Hb концентрация при мъже с висок CCP според ST1RE, могат да се обяснят от представения регресионен модел:

$$\text{Hb (g/l)} = 11,673 - 0,041 \cdot \text{OPG (pmol/l)}$$

При ESC 2019 г. 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 $b = -0,031$, $p = 0,011$. 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:

$$\text{Hb (g/l)} = 9,861 - 0,031 \cdot \text{OPG (pmol/l)}$$

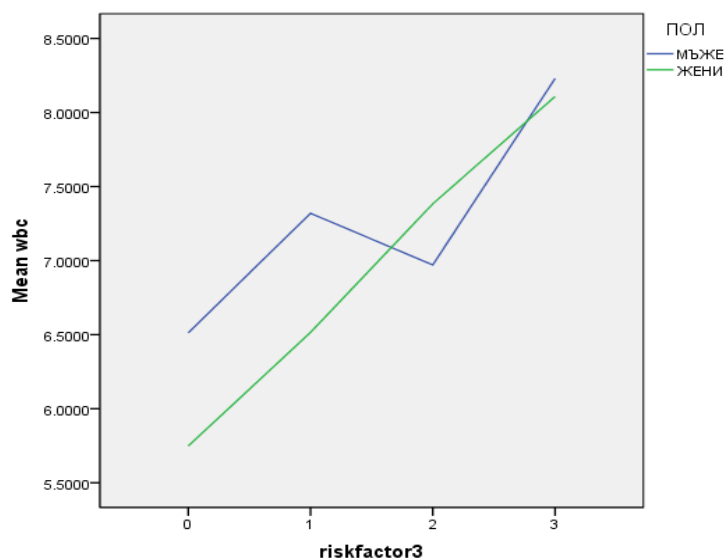
Регресионен модел със статистическа значимост спрямо Riskfactor3 се установи при мъжете от група 2: $F = 7,141$, $p = 0,015$ при $a = 12,381$, $p = 0,000$ и $b = -0,047$, $p = 0,015$. 23,5% от измененията в Hb (g/l) при мъже от група 2 според Riskfactor3 могат да се обяснят от представения регресионен модел:

$$\text{Hb (g/l)} = 12,381 - 0,047 \cdot \text{OPG (pmol/l)}$$

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

Не се установи статистически значима разлика между средноаритметичните стойности за WBC при мъже и жени в зависимост от категорията на ССР. 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. При Riskfactor3 се установи тенденция за левкоцитоза при пациенти с Т1Д. С близка до сигнификантна значимост разлика се отчете при жените – $F = 2,224$, $p = 0,096$. При мъжете не се установи значимо различие – $F = 0,790$, $p = 0,504$. Средноаритметични стойности за WBC 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. (фиг. 37)



Фигура 37. Средноаритметични стойности за WBC според Riskfactor3

6.6. Връзки с ADNC и Lep

При контролите се установиха отрицателни и средни по сила корелации между ADNC и: WBC ($r = -0,309$, $p = 0,023$); Мо ($r = -0,301$, $p = 0,027$) и с Ly ($r = -0,330$, $p = 0,015$). 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 Lep и: WBC ($r = 0,177$, $p = 0,068$); Мо ($r = 0,260$, $p = 0,007$) и Ly ($r = 0,0180$, $p = 0,063$). Установиха се и отрицателни асоциации между ADNC и: WBC, която е средна по сила ($r = -0,248$, $p = 0,009$); 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. 35)

В таблица 36 са представени корелации между еритроцитните показатели и изследваните адипокини. При контролите се установяват три значими корелации с ADNC – 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 лицата с Т1Д се установяват редица сигнификантни зависимости. 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 $r = 0,352$, $p = 0,000$. Последната асоциация е единствената установена с положителен знак. (табл.29)

Таблица 33. Корелационните зависимости между ADNC, Lep и левкоцити

Контролна група		ADNC (µg/ml)	Ранг – посока на корелация	Lep (ng/ml)	Ранг – посока на корелация
WBC 10⁹/l	Pearson Correlation	-0,309*	-2	0,097	0
	P value	0,023		0,498	
	Брой	54		51	
Neu 10⁹/L	Pearson Correlation	-0,222	0	0,095	0
	P value	0,107		0,506	
	Брой	54		51	
Ео 10⁹/L	Pearson Correlation	-0,151	0	0,101	0
	P value	0,276		0,483	
	Брой	54		51	
Ва 10⁹/L	Pearson Correlation	0,012	0	0,040	0
	P value	0,931		0,782	
	Брой	54		51	
Мо 10⁹/L	Pearson Correlation	-0,301*	-2	0,049	0
	P value	0,027		0,733	
	Брой	54		51	
Ly 10⁹/L	Pearson Correlation	-0,330*	-2	0,049	0
	P value	0,015		0,735	
	Брой	54		51	
Група с Т1Д		ADNC (µg/ml)	Ранг – посока на корелация	Lep (ng/ml)	Ранг – посока на корелация
WBC 10⁹/l	Pearson Correlation	-0,248**	-1	0,177	+1
	P value	0,009		0,068	
	Брой	111		108	
Neu 10⁹/L	Pearson Correlation	-0,187*	-1	0,121	0
	P value	0,049		0,213	
	Брой	111		108	
Ео 10⁹/L	Pearson Correlation	-0,068	0	-0,032	0
	P value	0,479		0,741	
	Брой	111		108	
Ва 10⁹/L	Pearson Correlation	-0,072	0	-0,018	0
	P value	0,454		0,856	
	Брой	111		108	
Мо 10⁹/L	Pearson Correlation	-0,247**	-1	0,260**	+1
	P value	0,009		0,007	
	Брой	111		108	
Ly 10⁹/L	Pearson Correlation	-0,199*	-1	0,180	+1
	P value	0,036		0,063	
	Брой	111		108	
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). * Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).					

При Lep, всички установени сигнификантни взаимодействия тук отново са отрицателни. 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 – $r = -0,181$, $p = 0,061$. (табл.30)

Таблица 34. Корелационни зависимости между адипокини и еритроцитни показатели

Контролна група		ADNC (µg/ml)	Ранг – посока на корелация	Lep (ng/ml)	Ранг – посока на корелация
Hb g/l	Pearson Correlation	-0,463**	-2	-0,178	0
	P value	0,000		0,212	
	Брой	54		51	
RBC 10¹²/L	Pearson Correlation	-0,302*	-2	-0,222	0
	P value	0,026		0,117	
	Брой	54		51	
HCT L/L	Pearson Correlation	-0,513**	-2	-0,144	0
	P value	0,000		0,313	
	Брой	54		51	
MCV fl	Pearson Correlation	-0,165	0	0,116	0
	P value	0,233		0,418	
	Брой	54		51	
MCH pg	Pearson Correlation	-0,127	0	-0,074	0
	P value	0,360		0,606	
	Брой	54		51	
MCHC g/l	Pearson Correlation	-0,013	0	-0,131	0
	P value	0,924		0,361	
	Брой	54		51	
RDW-CV%	Pearson Correlation	0,152	0	-0,149	0
	P value	0,273		0,297	
	Брой	54		51	
Група с Т1Д		ADNC (µg/ml)	Ранг – посока на корелация	Lep (ng/ml)	Ранг – посока на корелация
Hb g/l	Pearson Correlation	-0,423**	-2	-0,355**	-2
	P value	0,000		0,000	
	Брой	111		108	
RBC 10¹²/L	Pearson Correlation	-0,270**	-1	-0,257**	-1
	P value	0,004		0,007	
	Брой	111		108	
HCT L/L	Pearson Correlation	-0,381**	-2	-0,325**	-2
	P value	0,000		0,001	
	Брой	111		108	
MCV fl	Pearson Correlation	-0,262**	-1	-0,056	0
	P value	0,005		0,566	
	Брой	111		108	
MCH pg	Pearson Correlation	-0,349**	-2	-0,355**	-1
	P value	0,000		0,000	
	Брой	111		108	
MCHC g/l	Pearson Correlation	-0,301**	-2	-0,257**	-1
	P value	0,001		0,007	
	Брой	111		108	
RDW-CV%	Pearson Correlation	0,352**	+2	-0,325**	0
	P value	0,000		0,001	
	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 37 са представени корелационни зависимости между анализираниите адипокини и тромбоцитните показатели. При изследваните от контролната група не се установиха значими корелационни връзки. 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. 31)

Таблица 35. Зависимости между адипокини и тромбоцитни показатели

Контролна група		ADNC ($\mu\text{g/ml}$)	Ранг – посока на корелация	Lер (ng/ml)	Ранг – посока на корелация
MPV fL	Pearson Correlation	-0,196	0	0,118	0
	P value	0,156		0,411	
	Брой	54		51	
PDW fL	Pearson Correlation	0,126	0	0,045	0
	P value	0,417		0,780	
	Брой	54		51	
P-LCR %	Pearson Correlation	0,200	0	0,074	0
	P value	0,192		0,646	
	Брой	54		51	
PCT %	Pearson Correlation	0,126	0	0,229	0
	P value	0,415		0,150	
	Брой	54		51	
PLT $\times 10^9/\text{L}$	Pearson Correlation	-0,216	0	0,112	0
	P value	0,118		0,433	
	Брой	54		51	
Група с Т1Д		ADNC ($\mu\text{g/ml}$)	Ранг – посока на корелация	Lер (ng/ml)	Ранг – посока на корелация
MPV fL	Pearson Correlation	-0,062	0	0,061	0
	P value	0,516		0,528	
	Брой	111		108	
PDW fL	Pearson Correlation	0,058	0	0,047	0
	P value	0,571		0,654	
	Брой	111		108	
P-LCR %	Pearson Correlation	0,075	0	0,049	0
	P value	0,464		0,640	
	Брой	111		108	
PCT %	Pearson Correlation	0,025	0	0,061	+1
	P value	0,808		0,528	
	Брой	111		108	
PLT $10^9/\text{L}$	Pearson Correlation	0,062	0	0,047	+1
	P value	0,518		0,654	
	Брой	111		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

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:

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

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

Спрямо **ST1RE**, статистическа значимост се установи при мъже с умерен риск и жени с нисък ръст: $F = 11,289$, $p = 0,001$ и $F = 6,108$, $p = 0,007$, $\text{adjusted } R^2 = 0,548$ и $\text{adjusted } R^2 = 0,290$. При **ESC от 2019 г.** – при мъже с висок риск ($F = 3,618$, $p = 0,052$) и с много висок риск ($F = 3,151$, $p = 0,055$) и при жени с много висок риск: $F = 3,887$, $p = 0,030$. Намерените коефициенти на детерминация са съответно $\text{adjusted } R^2 = 0,235$, $\text{adjusted } R^2 = 0,102$ и $\text{adjusted } R^2 = 0,132$. При **Riskfactor3** – 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 ($F = 4,846$, $p = 0,025$), при $\text{adjusted } R^2 = 0,217$, $\text{adjusted } R^2 = 0,873$ и $\text{adjusted } R^2 = 0,325$.

6.6.2. Lep - асоциация с анемия, левкоцитоза и тромбоцитоза

17,8% от измененията в серумните нива на Lep при лица с Т1Д могат да се обяснят от представения регресионен модел:

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

От изследваните четири биомаркера Lep се асоциира най-силно с тромбоцитните индекси при лицата с дългогодишен Т1Д. 24,6% от измененията в Lep при жени могат да се обяснят от представения регресионен модел:

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

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

V. ДИСКУСИЯ

1. Оценка на ССР според насоките на ESC от 2019 г. и ST1RE при 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 настоящото проучване 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 анализирания показател.

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

2.1. ADMA – възрастово и полово обусловени различия

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 несигнификантна, 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 B. и сътр.[76], Marcovecchio M. 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. Hueber M. 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 B. и сътр. [78], повишаването на ADMA е защитен механизъм както по отношение развитието на субклинична атеросклероза, така и с цел запазване на миокардната 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 ST1RE и ESC от 2019 г.

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 Т1Д. В изследването на Маркова Ал. и съавт. (2021) е анализирана ролята на ADMA и връзката ѝ с калкулатори за ССР, но при пациенти с Т2Д. [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]

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 Т1Д 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 Т1Д. 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 Т1Д 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 Т1Д.[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 отчасти 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 30mg/l; от 30 до 300 mg/l и над 300mg/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 пациенти 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 MC 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 MC 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 ST1RE и ESC от 2019 г.

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 на серумните нива на протеина би могла да осигури огромна полза при стратифицирането на риска, централизиране на ресурсите и елиминиране на 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) констатират наличието на значима връзка между серумните нива на ОРГ и каротидната ИМТ 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 T1Д 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 T1Д 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 T1Д, 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/24h. [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 коментираният по-горе различия от корелационен анализ – тук резултатите са значими и за двата пола. От друга страна е важно да се акцентира върху приложението 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 констатират значима разлика между половете. [143] Някои автори предполагат, че повишаването в концентрацията на андрогените по време на пубертета при мъжете е възрастовият период, от който нивата започват да се различават. Съобщава се и за пропорционално увеличаване на полова разлика с напредване на възрастта. [144] Кио 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 показваха 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, полови 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 по-високоинтензивно 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 тази 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 еднороден инхибитор на eNOS. Raduszyńska A. 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 Heilman 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 констатират 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 ST1RE и ESC от 2019 г.

В настоящото интердисциплинарно проучване се оцени връзката на изследвания биомаркер ADNC със специфични за T1D 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. 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 T1D. Според Menzaghi Cl. и сътр. (2018) повишените нива на ADNC са независим предиктор за обща и сърдечно-съдова смъртност при възрастни индивиди с T1D. 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 ІМТ. [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 С1. 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 отбеляза 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 ± 5,677 µg/ml, p = 0,216 за мъже и 19,323 ± 5,456 µg/ml спрямо 18,232 ± 13,444 µg/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 затлъстяването, хипертонията, дислипидемията, 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 пониския 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 Lер в културелна среда, отколкото тези от мъжете. [48,117,221] Проучвания *in vitro* показват, че естрадиолът повишава освобождаването на Lер 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 Lер и изключват тезата, че естрогените са отговорни за различията между половете. [117] Възможно е и половият диморфизъм в концентрациите на Lер 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 Lер, независимо от ИТМ. В *in vitro* проучвания, Wabitsch M. и сътр. (2017) и Funcke B. и сътр. (2014) доказват директен дългосрочен инхибиторен ефект на тестостерона върху производството на Lер от човешки адипоцити в културелна среда. [85,279]

Пациентите с дългогодишен Т1Д показаха по-високи стойности за Lер 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 Lер 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 Lер 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 Lер при здрави мъже с напредване на възрастта се запазва и при патофизиологични 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 Lер и/или неговия синтез. Въз основа на предишни проучвания, които съобщават, че концентрацията на Lер е намалена, непроменена или дори увеличена при стареене, връзката между възрастта и Lер все още не е ясна. В предишни проучвания е доказано, че нивата на Lер 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 факта, че често връзката възраст–Lер 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 ОРГ

В настоящото проучване се констатира значима положителна корелация между серумните нива на Lер и ОРГ 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 Лер-обусловено инхибиране на остеокластогенезата в културелни среди от човешки мононуклеарни клетки на периферна кръв. Други изследователи установяват, че Лер повишава синтеза на OPG и намалява нивата на RANKL в стромалните клетки на човешки костен мозък. [222] Следователно констатираната положителна корелация между OPG и Лер съответства на изказаната хипотеза. Като обяснение за наблюдаваната зависимост само при мъже, предлагаме теорията за полово-обусловена хормонална регулация. Инхибиращото влияние на тестостерона върху Лер и OPG едновременно предполага закономерни промени в серумите нива на маркерите. При жените описаното влияние на естрогените върху концентрацията на Лер е противоречиво, върху концентрацията на OPG се счита за положително и съответно не предполага подобна зависимост между двата маркера.

5.3. Лер – връзки със ST1RE и ESC от 2019 г.

В настоящото проучване се оцени прогностичната стойност на биомаркера Лер спрямо категорията на ССР, изчислен с помощта на калкулатора ST1RE и според насоките на ESC от 2019 г. Резултатите от приложения корелационен анализ показаха значима положителна асоциация на Лер 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 доказва сигнификантни междугрупови разлики в серумните нива на Лер 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 Лер 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 Лер се отчитат.

Последните проучвания сочат, че при физиологични условия Лер 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 Лер, включително неговия ефект върху кръвното налягане, тромбоцитната агрегация, нестабилност на плаката и възпалителния съдов отговор. Счита се, че високите нива на Лер 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 Lер 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 Lер. Пациентите с интензифицирана инсулинотерапия имат по-високи нива на Lер от пациентите с конвенционална инсулинотерапия. В проучването на Atwa H. и сътр. (2018) е изследвана връзката между адипокини (Lер и ADNC) с каротидната IMT при деца и юноши с Т1Д. [30] Изследователите установяват положителна корелация между Lер и каротидната IMT 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 Lер и IMT е потвърдена и при възрастни индивиди.[62]

5.4. Lер – 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 Lер и RiskFactor3 при мъжете отново е с права посока, но е значима при 90% достоверност на резултатите : $\rho = 0,23$, $p = 0,084$ между Lер 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 Lер при мъже и жени от различните групи според RiskFactor3 ($p < 0,05$).

При последващо парциално анализиране на РФ установихме, че серумните нива на Lер корелират със стойността на AlbU при лицата с дългогодишен Т1Д ($p < 0,05$). Наблюдаваната зависимост е потвърдена от редица изследователи, които докладват, че серумният Lер е значимо по-висок при пациенти с микро- и макроалбуминурия в сравнение с контролите и нормоалбуминуричните пациенти със ЗД [109,297]. Според Tony A. и сътр. (2022), серумният Lер 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 оказва, 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 (коефициент 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 анизозитоза 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 Т1Д (16,7%), спрямо изследваните от контролната група (9,1%). При Т1Д делът на жени с анемия отново е намерен по-голям от този при контролите, но резултатите са по-близки (20,7 при Т1Д спрямо 15,4% при контроли). Анемията е често срещано и недостатъчно разпознато усложнение при пациенти с Т1Д. Един на всеки пет (~20%) индивиди с Т1Д 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 Т1Д 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 аутоимунен 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 Т1Д.

Колкото по-висок е ССР според ST1RE и ESC от 2019 г., толкова по-ниска е концентрацията на Hb при лицата с дългогодишен Т1Д. 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

Статистическа 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 маргиначните 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 тромбоцитни показатели 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 T1Д, така и при T2Д. [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 кървене 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 T1Д 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 A2, тромбоксан B2, 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 CCR.

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, делът на реактивните PLT при Т1Д се увеличава. По-високият изчислен CCR 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 ($p < 0,05$). Констатиранияте 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, аутоимунни 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 хематологични 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 хематологични 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 хемопоетични стволови клетки, а серумните нива на ADNC се свързват обратнопропорционално с риска от хронична лимфоцитна левкемия, остра миелоидна левкемия, миелодиспластичен синдром и мултиплен миелом. [61] ADNC се синтезира от Lym, 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, Mo 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 патологични условия.

В настоящото проучване констатирахме значими корелационни връзки между левкоцитните променливи (общ брой WBC, Mo 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, Mo 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, предполагахме 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 CCR според ST1RE демонстрира, че промените в серумните

нива на ADNC прогнозираят 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 тромбоза. 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 прогнозираят 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.

VI. 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 **Lер** с напредване на възрастта. При мъжете с Т1Д, независимо положително влияние върху серумните нива на **Lер** има и стойността на **AlbU** – 11,9%.
8. При жените значими положителни детерминанти за серумните нива на **Lер** са **AlbU** и **CRP**. Посочените променливи прогнозираят 23,8% от измененията в серумната концентрация на **Lер** при жени с дългогодишен Т1Д и 29,4% при здрави жени.
9. **Lер** 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 **Lер** 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 **Lер** 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**, **Lер** и тенденция за микроцитна, хипохромна анемия. По отношение на левкоцитните променливи адипокините оказват противоположно действие: **ADNC** е отрицателен регулатор, а **Lер** – 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 **Lер** и **ADMA**.

VII. 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 ССР: 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 \geq 3 mg/l и AlbU \geq 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

- 1.5.** Потвърдено е значението на OPG като прогностичен фактор, влияещ на риска от ССЗ при лица с дългогодишен Т1Д.
- 1.6.** Потвърдено е значението на Lер като прогностичен фактор, влияещ на риска от ССЗ при лица с дългогодишен Т1Д.
- 1.7.** Потвърдено е значението на AlbU като независима променлива върху серумните нива на ADMA, OPG, ADNC и Lер.
- 1.8.** Потвърдено е значението на ИТМ и CRP върху серумните нива на адипокините.
- 1.9.** Потвърдена е регулаторната на роля на адипокините върху хематопоезата при лица с дългогодишен Т1Д и здрави контроли.
- 1.10.** 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.

VIII. 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.

IX. 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“ – Варна.

И не на последно място, сърдечно благодаря на моето семейство и съпруг. 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.