



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ - ВАРНА**

**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА**

**ВТОРА КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ**

**УНС ПО ЕНДОКРИНОЛОГИЯ**

**НЕИНВАЗИВНА ОЦЕНКА НА АРТЕРИАЛНАТА РИГИДНОСТ ПРИ  
ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 - КОРЕЛАЦИЯ С НЯКОИ  
БИОМАРКЕРИ.**

**Д-Р ЕЛЕНА СТОЯНОВА МАРИНОВА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНО-НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

**НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: ЕНДОКРИНОЛОГИЯ**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:**

**ДОЦ. Д-Р МИЛА БОЯДЖИЕВА, ДМ      ПРОФ. Д-Р БРАНИМИР КАНАЗИРЕВ, ДМ**

**РЕЦЕНЗЕНТИ:**

**Проф. д-р Мария Орбецова, дм**

**Проф. д-р Борислав Георгиев, дмн**

**ВАРНА, 2020**

Дисертационният труд е представен на 136 страници и е онагледен с 31 таблици, 20 диаграми и 11 графики. Библиографската справка обхваща 207 литературни източника, от които 1 на кирилица и 206 на латиница.

Дисертационния труд е обсъден и насочен за публична защита от Втора катедра по Вътрешни болести на Медицински университет – Варна.

## **НАУЧНО ЖУРИ**

1. проф. д-р Кирил Христозов, дм – Клиника по ендокринология и болести на обмяната, МБАЛ „Св. Марина“- Варна, МУ-Варна
2. проф. д-р Мария Орбецова, дмн - Клиника по ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“ - База 1, МУ-Пловдив
3. доц. д-р Живка Бонева, дм - Медицински Институт на МВР, МБАЛ-Централна клинична база в София
4. проф. д-р Борислав Георгиев, дмн – Национална кардиологична болница- София, МУ-София
5. доц. д-р Атанас Ангелов – първа кардиологична клиника с ИКО, МБАЛ „Св. Марина“, МУ-Варна

Резервни членове:

1. доц. д-р Мира Сидерова, дм - Клиника по ендокринология и болести на обмяната, МБАЛ „Св. Марина“, МУ-Варна
2. доц. д-р Антоанета Гатева, дм – Клиника по ендокринология, УМБАЛ „Александровска“, МУ-София

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 02.12.2020 г от.....часа на заседание на Научното жури във виртуалната зала на електронната платформа на Blackboard към Медицински университет Варна.

Материалите по защита на дисертационния труд са на разположение а библиотеката на МУ-Варна

## СЪДЪРЖАНИЕ

I	
II. Цел и задачи на изследването .....	6
III. Материали и методи на изследването.....	6
В	
IV. Резултати.....	11
V. Обсъждане.....	47
е	
VI. Изводи.....	60
VII. Приноси на дисертационния труд.....	60
н	
VIII. Заключение.....	61
IX. Списък на публикации и участия свързани с дисертационния труд. ....	63

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АР – артериална ригидност

АСС - обща каротидна артерия

ДАН - диастолно артериално налягане

ДПНП - диабетна полиневропатия

ДНП - диабетна нефропатия

ДРП - диабетна ретинопатия

ЕТ- ехотракинг

ИТМ - индекс на телесна маса

ИР - инсулинова резистентност

КБС – коронарна болест на сърцето

КО - коремна обиколка

НГГ- нарушена гликемия на гладно

НГТ- нарушен глюкозен толеранс

ОС - остеокладин

ПГГ- плазмена глюкоза на гладно

ППГ- постпрандиална глюкоза

САН - систолно артериално налягане

ССЗ - сърдечно-съдови заболявания

T23Д - захарен диабет тип 2

АС - артериален къмплайънс

AI – аугментационен индекс

сОС - карбоксилиран остеокладин

cf-PWV- каротидо-феморална скорост на пулсовата вълна

Ер – модул на еластичност

FRS – Фрамингам рисков скор

GLP-1- глюкагоно-подобен протеин-1

HbA1c - гликиран хемоглобин

PWV- скорост на пулсовата вълна

PWV $\beta$  – скорост на пулсовата вълна в една точка

tOC - тотален остеокладин

ucOC - некарбоксилиран остеокладин

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Макроваскуларните усложнения при захарен диабет тип 2 (Т2ЗД) включват процесите на съдова калцификация и артериална ригидност (АР). Процесите на калцификация настъпващи в медиалния съдов слой се считат за една от причините за развитието на ригидност. Веднъж възникнала АР бива отнася към нетрадиционните сърдечно-съдови рискови фактори. Тя се появява паралелно с ендотелната дисфункция в хода на развитие на атеросклеротичния процес, като съществува неяснота по отношение на причинно-следствената връзка между двата процеса. Измерването на ригидността на артериалната стена понастоящем е обект на научен интерес поради независимата си предиктивна стойност за сърдечно-съдови събития особено при високорискови пациенти, като такива с Т2ЗД. Напредъкът в диагностичните ултрасонографски технологии позволи навлизането през последните години на нови методики за ранна детекция на съдовите промени, именно оценени чрез измерване на ригидността. Предклинично откриване на тези промени би позволило отлагане на сърдечно-съдовите усложнения при пациентите с Т2ЗД. Такава нова методика е едноточковата ехотракинг система даваща информация за локалната АР на общата каротидна артерия. Установено е в проучвания, че локалната каротидна ригидност, корелира с ригидността на аортата и следователно с риска за развитие на съдечно-съдова заболяемост и смъртност. Създадени са референтни стойности за локалната АР измерена на каротидната артерия при здрави индивиди, но данни за ригидността при пациенти с Т2ЗД по настоящем са оскъдни. Натрупването на данни за АР при пациентите с Т2ЗД би позволило по-добро управление на сърдечно-съдовите усложнения и терапевтична намеса във фазата на субклинична атеросклероза.

През последното десетилетие се разкри хормоналната природа на костния протеин остеокалцин (ОС) и неговото участие във въглехидратния, енергийния и липидния метаболизъм. Той съществува в две форми различаващи се по степента си на карбоксилиране, като ключовият ензим отговорен за преминаването му от некарбоксилирана в карбоксилирана форма е витамин К–зависим. Така нивата на витамин К в организма пряко влияят на степента на карбоклиране на ОС и следователно на неговата биологична активност. Известно в литературата е, че карбоксилирания ОС участва в процесите на костно формиране. Недобре проучена е некарбоксилираната форма на ОС за която се смята, че притежава хормонално действие, свързва се с увеличена секреция на инсулин от панкреаса и адипонектин от адипоцитите и по този начин води до подобрена инсулинова чувствителност. Обратно, ниските концентрации на ОС се свързват с повишен риск за развитие на Т2ЗД. Връзката на ОС с диабетът, който е един от водещите рискови фактори за развитието и акцелерирането на процесите на атеросклероза, води до възникване на хипотезата за участие на ОС в процесите на съдова калцификация и артериална

ригидност. Понастоящем се счита, че ОС е един от инхибиторите на съдовата калцификация.

Паралелно с развитието на познанието за патофизиологичните механизми водещи до съдова увреда и откриването на нови съдови биомаркери, се търсят и нови терапевтични стратегии. В тази връзка интерес представлява витамин К2 и неговата функция на кофактор на  $\gamma$ -карбоксилазата превръщаща некарбоксилирания ОС в карбоксилиран. Известна и потвърдена е ролята на витамин К2 в комплексното лечение на остеопороза. Предполага се, че той има отношение и към съдовата калцификация и ригидност, като кофактор на  $\gamma$ -карбоксилазата активираща редица протеини с функция на инхибитори на калцификацията, сред които и ОС. Понастоящем данните в литературата за ефектите на витамин К2 върху съдовата биология са недостатъчни. Нужни са допълнителни интервенционални проучвания, които да уточнят ролята на този витамин в съдовите промени настъпващи при Т23Д.

## **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **Цел**

Да се получат данни за локалната АР на каротидните артерии при пациенти с Т23Д без макроваскуларни усложнения чрез ехотракинг методика. Да се потърси връзка на показателите на АР с глюкометаболитни, липидни, хемодинамични параметри и нивата на серумен остеокалцин, както и да се оцени ефекта от суплементация с витамин К2 при част от лицата с диабет.

### **Задачи**

1. Да се измери локалната АР на двете каротидни артерии, посредством ехотракинг методика, при пациенти с Т23Д без установени макроваскуларни усложнения и да се сравни с тази при контроли.
2. Да се потърси връзка между ЕТ показателите и възрастта на лицата с Т23Д и антропометрични, глюкометаболитни и липидни нива.
3. Да се анализира съществува ли връзка между показателите на АР и хемодинамичните показатели (CASP, САН, ДАН, ПН, ср.АН) при лица с Т23Д.
4. Да се определят серумните концентрации на ucОС и cОС при част от пациентите с Т23Д и да се сравнят спрямо тези на здравите контроли.
5. Да се потърси връзка между АР при лица с Т23Д и серумните нива на остеокалцин.
6. Да се потърси настъпила промяна в стойностите на показателите на АР и серумните нива на ОС при пациентите провели суплементация с витамин К2.

### **III МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **1. Материална база за реализиране на дисертационния труд**

Настоящото изследване се проведе в следните структури:

- Клиника по вътрешни болести, УМБАЛ „Св.Марина“- Варна
- Клиника по ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св.Марина“- Варна
- Диагностично-консултативен център „Св.Марина“- Варна
- Клинична лаборатория, УМБАЛ „Св.Марина“- Варна
- Катедра по фармакология, клинична фармакология и терапия, МУ-Варна
- Катедра по Социална медицина и организация на здравеопазването, МУ-Варна

#### **2. Пациентска популация включена в изследването**

Изследването се проведе в периода октомври 2018г - септември 2019г, като бяха включени общо 100 пациента (52 жени и 48 мъже) с тип 2 захарен диабет и 30 здрави контроли (15 мъже и 15 жени). В проучването се включиха пациенти с диабет, без анамнеза за доказани макроваскуларни усложнения, на възраст над 18 години, ало- и автопсихично ориентирани, способни да прочетат, разберат и подпишат собственоръчно информираното съгласие. Пациентите са хоспитализирани в Клиниката по вътрешни болести и Клиниката по ендокринология или са контингент на прегледите на диагностично-консултативните кабинети към клиниките. Включени бяха пациенти прегледани в ендокринологичен кабинет на ДКЦ „Св. Марина“ по повод захарен диабет тип 2. Контролната група ще се формира от пациенти, преминали през съответните клинични центрове, при които не е доказан Т23Д и атеросклеротично сърдечно-съдово заболяване или повода за прегледа е бил друго заболяване извън изключващите критерии. Част от групата на пациентите с Т23Д, след писмено информирано съгласие получиха суплементация с витамин К2 (Кинон) 75ммг/дн за срок от 4 седмици (общо 20 пациента). Двама от получилите суплементация не бяха проследени, поради невявяване на контролен преглед след двукратна покана. Общо 18 пациента (11 жени и 7 мъже) проведоха суплементация и контролни кръвни и ехографски изследвания в края на едномесечния период. Изследването се извърши след получаване на протокол за одобрение от Комисията по етика на научните изследвания към Медицински университет – Варна.

### 3. Критерии за включване на лицата

- пациенти със захарен диабет тип 2, без анамнеза за настъпили макроваскуларни усложнения
- лица над 18 г. Възраст
- хоспитализирани пациенти в Клиниката по ВБ и в Клиниката по Ендокринология и болести на обмяната
- пациенти прегледани по повод захарен диабет тип 2 в ендокринологичен кабинет ДЦК „Св.Марина“
- лица способни да прочетат, разберат и собственоръчно да подпишат информираното съгласие

### 4. Критерии за изключване

- лица под 18 г. възраст
- лица ало- и автопсихично дезориентирани и други, които не могат да прочетат, разберат и собственоръчно да подпишат информираното съгласие
- пациенти със захарен диабет тип 1
- бременност
- пациенти с вече настъпили макроваскуларни усложнения на захарния диабет, като исхемична болест на сърцето, мозъчно-съдова болест, периферна артериална болест, коремна аневризма
- пациенти с неконтролирана артериална хипертония
- пациенти с абсолютна аритмия при предсърдно мъждене
- пациенти провеждащи лечение с витамин К антагонисти
- пациенти със захарен диабет тип 2 на хроничен диализ
- пациенти приемащи витамин К2 и/или витамин Д като хранителна добавка
- пациенти с остеопороза или провеждащи антиостеопорозна терапия
- пациенти на системно глюкокортикоидно лечение
- пациенти с онкологично заболяване

### 5. Методи

- **Анкетен метод** – при всички участници беше проведена анкета относно възраст, наличие на вредни навици, давност на диабета, вид на провежданото антидиабетно лечение, наличие на усложнения на диабета. Данни за прием на антихипертензивна терапия и симптоми на атеросклеротично сърдечно-съдово заболяване.



- **Антропометрия** – измери се ръст (м), тегло (кг), коремна обиколка (см). Изчисли се индекса на телесна маса по формулата  $ИТМ = \frac{\text{тегло(кг)}}{\text{ръст}^2(\text{м})}$  и съотношението талия/ръст.

- **Лабораторни методи**

1. *Биохимични изследвания*

На участниците в проучването - пациенти и контроли бе взета венозна кръв посредством венепункция на кубитална вена или друга подходяща периферна вена на гладно, след поне 12 часа гладуване. Изследването на плазмената глюкоза се извърши по хексокиназен метод. Изследването на общия холестерол, HDL, и триглицеридите се проведе по ензимен метод, като LDL е изчислен по формула. Гликираният хемоглобин се изследва по имунотурбидиметричен анализ. Използваната апаратура е Olympus AU400. Лабораторните биохимични изследвания са извършени в клиничната лаборатория на УМБАЛ “Св. Марина”, Варна.

2. *Хормонален анализ*

Остеокалцин - серумните пробите за изследване на исОС и сОС бяха вземани сутрин нагладно чрез венепункция. След центрифугиране и отпипетиране серумът беше замразяван на  $-80^{\circ}\text{C}$  до момента на анализа. Двете форми на остеокалцин са изследвани чрез имуноензимен метод по типа на сандвич ELISA с индивидуални китове за човешки карбоксилиран (gla-) остеокалцин и човешки некарбоксилиран (glu-) остеокалцин (Takara Bio, Inc., Japan), като са спазвани инструкциите на производителя. Серумните нива на остеокалцин са отчетени в ng/ml. Изследването е проведено на апарат ELISA ридер LKB 5060-006 (LKB Instruments, Australia) в Катедрата по фармакология, клинична фармакология и терапия, МУ-Варна.

- **Инструментални методи.**

1. Измерване на артериално брахиално налягане (АН) и централно аортно систолно налягане (CASP).

Измерването се проведе непосредствено преди ехографското изследване с портативно устройство за измерване на централното аортно систолно налягане - Caspal A-pulse CASP-AL ( HealthSTATS Int.). Устройството е в списъка на одобрените от FDA и използва модифицирана тонометрична техника. При измерването се поставя маншет на предмишницата в областта на брахиалната артерия и се регистрират три последователни измервания с интервал между тях 1 мин на САН, ДАН и СЧ. След което апаратът автоматично изчислява техните средни стойности. Втора стъпка е поставянето на датчик на мястото на палпация на артерия радиалис в областта на китката, с помоща на който апаратът регистрира пулсовата вълна и изчислява CASP.

2. Изчисляване на пулсовото налягане (ПН) по формулата:

$$\text{ПН (mmHg)} = \text{САН (mmHg)} - \text{ДАН (mmHg)}.$$

3. Изчисляване на средното артериално налягане по формулата:

$$\text{Ср. АН (mmHg)} = \text{ДАН} + (\text{САН} - \text{ДАН})/3$$

#### 4. Ехографско изследване

Ехографско изследване на общата каротидна артерия двустранно се извърши с ултразвуков апарат Aloka Hitachi Prosound  $\alpha 7$  снабден с високочестотен линеарен трансдюсер. Пациентът заема лежачо по гръб положение с екстензия на шията и лека ротация на  $30^\circ$  контралатерално на изследваната област. Измерването се извършва на 2 см проксимално от каротидната бифуркация, като целта е общата каротидна артерия да се визуализира на екрана в най-голямата си ширина в надлъжен срез, при което съдовата стена и ултразвуковия сигнал са перпендикулярни. Това осигурява точно проследяване на промяната в съдовия диаметър. След това е необходимо да се включи функцията echo-tracking от екрана за управление, при което се появяват два маркера с чиято помощ отбелязваме границите на изследвания артериален съд. Маркерите се поставят на близката и далечната стена на артерията на границата между tunica media и tunica adventitia. Предварително на пациента се поставят периферни електроди с помощта на които на екрана наблюдаваме симултантен ЕКГ запис и се отчита с точност началото на систолата и диастолата на сърдечната контракция. Регистрират се поне шест сърдечни цикъла, като през това време пациентът е задържал дишането си за подобряване на качеството на образа и стопираме изображението. Изисква се и въвеждането на данни от предварително измереното САН и ДАН и се преминава към автоматично изчисляване на показателите на артериална еластичност посредством математически алгоритми. Промяната в диаметъра на съда се обработва групово за всички пулсови вълни и се получава средна стойност на показателите:  $\beta$ -stiffness индекс, AC, PWV $\beta$ , AI и Ep.

- **Статистически методи за обработка и анализ на резултатите**

Данните се обработиха чрез специализиран статистически пакет за персонален компютър SPSS Windows, версия 25. Графичното изобразяване се извърши с Excel и GraphPad Prism 8. Използваха се следните статистически методики:

1. Дескриптивни статистически методи - количествените променливи се описаха със средна аритметична стойност, стандартно отклонение, максимална и минимална стойност. Качествените променливи бяха описани чрез: n (брой на наблюденията) и относителна честота на разпределението в проценти. За търсене на значими разлики в честотното представяне на категорийни стойности се използваха непараметрични тестове, като кростабулация и хи-квадрат. За

определяне на вида на разпределението на изследваните данни се проведе теста на Kolmogorov-Smirnov.

2. Аналитични статистически методи - за сравняване на средните величини на показателите в двете изследвани групи се използва independent t-тест. За оценка на значимостта на промяната на изследваните променливи преди и след проведената суплементация се използва paired t-тест. В случаите, при които се установи липса на нормална дистрибуция на данните за оценка на значимостта на разликите се използва непараметричния тест на Mann-Whitney. При сравняване на повече от две групи се използва еднофакторен ANOVA, а в определени случаи и post-hoc анализ на Tukey HSD.

Проведе се корелационен анализ за изследване на зависимостите между различните изследвани клинични, ехографски и лабораторни показатели и силата на тяхното влияние. Оценката на корелационната зависимост между променливите се базира на стойността на коефициента на Пийърсън (r) или коефициента на Спийрман. Тези коефициенти определят посоката и силата на зависимостта между две изследвани променливи. Многофакторен регресионен анализ се използва за оценка на ефекта на различните променливи върху скоростта на пулсовата вълна (PWV) и  $\beta$ -stiffness индекса.

При всички анализи статистическа значимост на разликите се приемаше при  $p \leq 0.05$

## **V. РЕЗУЛТАТИ**

### **1. Дескриптивна статистика на изследваните групи**

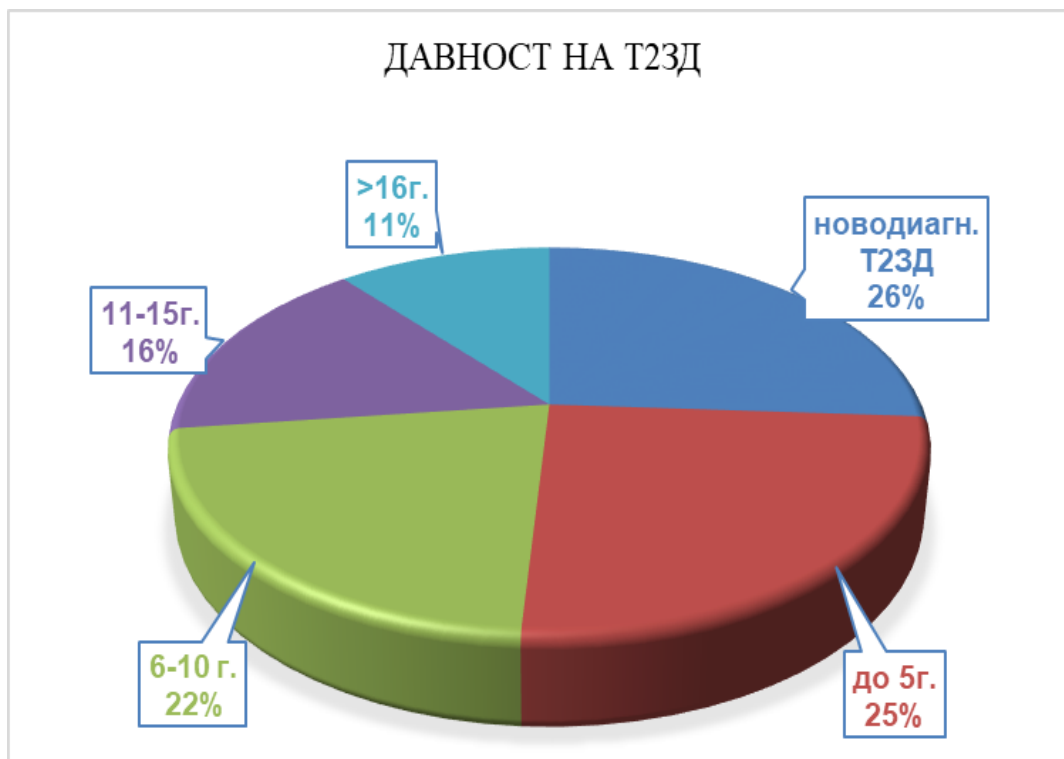
В проучването бяха включени 100 пациента с T23Д на средна възраст  $57.7 \pm 7.48$  год. и 30 лица без анамнеза за захарен диабет на средна възраст  $56.7 \pm 6.98$  год., които образуваха контролната група. Половото разпределение в изследваната група е 52% жени и 48 % мъже, а в контролната група е 50% жени и 50% мъже. Според вида на провежданото антидиабетно лечение, изследваната група имаше следното разпределение: инсулиново лечение провеждаха 39% (N=39) от пациентите с T23Д, а останалите 61% (N=61) - перорална терапия, инжекционна неинсулинова терапия, или комбинация от двете.

Половината от общият брой участници нямаша анамнеза за нито едно настъпило до този момент усложнение 50% (n=50). Най-често пациентите съобщаваха за наличие на диабетна полиневропатия (ДПНП) (n=47), следвана от диабетна ретинопатия (ДРП) (n=17) и диабетна нефропатия (ДНП) (n=5). В нашето

проучване не бяха включвани пациенти с анамнеза за макроваскуларни усложнения, които са част от изключващите критерии.

Новодиагностицирани случаи на Т2ЗД в хода на проведеното проучване имахме при 26 участника (26%). Разпределението на пациентите според давността на Т2ЗД е показана на диаграма 1.

**Диаграма 1.** Давност на захарния диабет в изследваната група.



Изходните антропометричните, биохимични и хемодинамични показатели на изследваната и контролната група са отразени в таблица 1.

**Таблица 1.** Сравнение на изходните характеристики на двете групи.

Храктеристика	Пациенти с Т23Д	Контролна група	p
	ср.стойн. ± станд. откл.	ср.стойн. ± станд. откл.	
Възраст (год.)	57,70 ± 7.48	56.76± 6.98	0.54
Давност на диабета (год.)	6.75±6.37		
Ръст (cm)	166,70± 10.11	168.28± 9.14	0.47
Тегло (kg)	90,67± 20.84	84.08± 20.34	0.13
ИТМ ( kg/m <sup>2</sup> )	32,41± 6.61	29.67± 6.08	0.05
Коремна обиколка (cm)	108,69± 14.92	100.85± 16.24	0.01
Талия/ръст	0.65±0.09	0.6±0.08	0.007
Глюкоза (mmol/l)	7,62± 2.51	5.68±0.67	0.001
HbA1c	9,17± 2.44	5.55±0.43	0.001
Chol (mmol/l)	5,18± 1.32	5.63± 1.49	0.153
TG (mmol/l)	2,30± 1.68	2.26± 1.76	0.81
LDL (mmol/l)	3,00± 1.12	3.30± 1.12	0.27
HDL (mmol/l)	1,18± 0.39	1.33± 0.33	0.11
Креатинин (µmol/l)	78.9± 21.14	73.89± 14.28	0.29
MDRD (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	89.85± 21.1	85.21± 14.67	0.6
Хемоглобин (g/l)	140,78± 16.67	141.45± 13.13	0.85
CAPS (mmHg)	126,40± 13.79	125.76± 12.62	0.84
САН (mmHg)	134,01± 14.63	132.64± 13.1	0.136
ДАН (mmHg)	85,83± 10.26	87.50± 9.83	0.48
Пулсово налягане (mmHg)	48.08± 11.53	45.14± 9.83	0.39
Ср.АН (mmHg)	101,82± 10.6	101.97± 10.28	0.62
СЧ ( уд./min)	75,12± 11.11	73.17± 10.31	0.41
Пушачи (%)	46	40	0.56

Измерените антропометрични показатели в двете групи са ръст, тегло, ИТМ, коремна обиколка (КО). Спрямо контролите, изследваната група показва по-високи средни стойности на ИТМ ( $t=1.968$ ;  $p=0.05$ ) и КО ( $t=2.407$ ;  $p= 0.018$ ).

Средните стойности и стандартните отклонения на измерената плазмена глюкоза на гладно при пациентите с Т23Д са  $7.62\pm 2.51$  mmol/l, а в контролната група респективно  $5.68\pm 0.67$  mmol/l,  $p=0.001$ . Средната стойност на гликираният хемоглобин в групата на пациентите с Т23Д е  $9.17\%\pm 2.44$ , а в контролната съответно  $5.55\%\pm 0.43$ ,  $p=0.001$  (таблица 2).

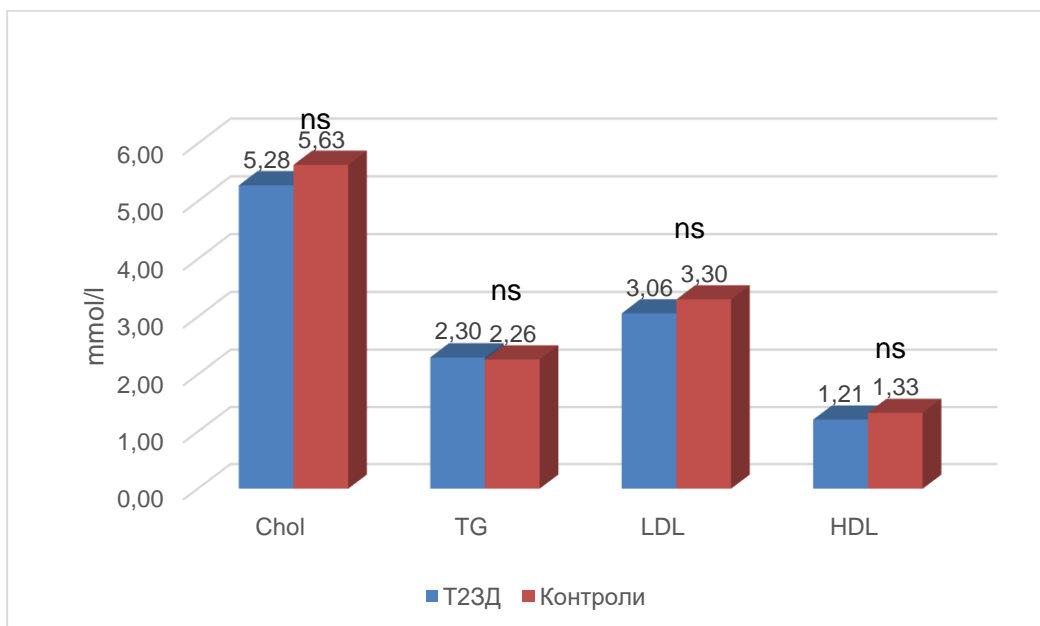
**Таблица 2.** Разлики между плазмената глюкоза на гладно (ПГГ) и гликирания хемоглобин, установени с t-тест.

	<b>T23Д</b>	<b>Контроли</b>	<b>P</b>
ПГГ, ммол/л (ср.ст±станд.откл.)	7.62±2.51	5.68±0.67	0.001
HbA1c, % (ср.ст±станд.откл.)	9.1±2.44	5.5±0.43	0.001

Проведохме анализ на липидните показатели на двете групи– общ холестерол, триглицериди, HDL-C и LDL-C. Проверка за нормалността на разпределението на данните, извършихме с теста на Колмогоров-Смирнов. При този тест, стойности на  $p < 0.05$  показват асиметрично, а при  $p > 0.05$  симетрично разпределение на данните. Установи се нормално разпределение в нивата на три от показателите – общ холестерол, LDL-C и HDL-C. Поради това за тяхното сравнение използвахме t-test за независими извадки. Той показва липса на значима разлика между изследваната и контролната група - общ холестерол ( $t=-1.43$ ;  $p=0.15$ ), LDL ( $t=-1.09$ ;  $p=0.27$ ) и HDL ( $t=-1.59$ ;  $p=0.11$ ) (диаграма 2). Нивата на TG показаха асиметрично разпределение. При тяхното сравняване използвахме непараметричния тест на Mann-Whitney като средните ранковете на TG в изследваната група показаха по-високи стойности, но без да достигат статистически значима разлика с контролната група ( $U=1105.5$ ;  $p=0.819$ ) (диаграма 2).

Допълнително потърсихме разлики в изследваната и контролната група по отношение на статуса на тютюнопушене. Честота на тютюнопушене в група на T23Д е 46%, а в контролната 40%. Значимостта на разликите в тези категорийни стойности, оценихме с непараметричния анализ кростабулация и хи-квадрат, който показва липса на значимост ( $X^2= 0.33$ ;  $p= 0.56$ ) (таблица 1).

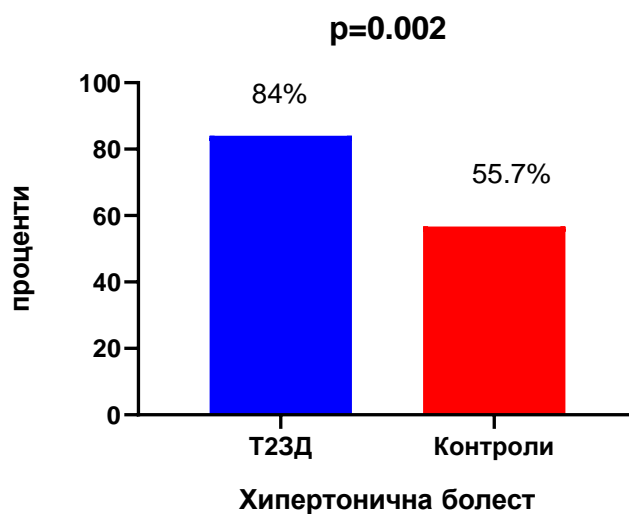
**Диаграма 2.** Несигнификантни разлики в средните стойности на общия холестерол, TG, LDL-C и HDL-C в двете групи.



## 2. Анализ на хемодинамичните показатели.

За да сравним наличието на придружаваща хипертонична болест при пациентите с Т23Д и контролите използвахме непараметричния тест кростабулация и хи-квадрат, сравняващ честотното представяне на категорийни стойности. Тестът показва, че процентните разлики между двете групи са статистически значими ( $\chi^2=9.98$ ;  $p=0.002$ ), т.е. по-голяма е вероятността за наличието на хипертонична болест в групата на пациентите с Т23Д, отколкото в контролната (диаграма 3).

**Диаграма 3.** Процентно разпределение на хипертоничната болест в изследваната и контролната група.



Тъй като, систолното артериално налягане (САН), пулсовото налягане (ПН), средното артериално налягане (Ср. АН), централно аортно систолно налягане

(CASP) и сърдечна честота (СЧ) са променливи, показващи нормално разпределение, за сравняване на техните средни числови стойности с тези на контролите използвахме t-тест. Диастолното артериално налягане (ДАН) показва несиметрично разпределение на данните, поради което значимостта на разликата в стойностите му между двете групи, оценихме посредством теста на Mann-Whitney. Разликите не достигнаха статистически значимост при сравняване на отделните ранговете ( $U=1280$ ;  $p=0.489$ ) (таблица 3).

**Таблица 3.** Стойности на хемодинамичните показатели в изследваната и контролната група. Статистически незначими разлики между групите при проведения t-тест.

	Група	Средна ст. ± станд.откл.	95% CI, граници		p
<b>Систолно АН, mmHg</b>	T23Д	134.01 ± 14.63	-4.69	7.43	0.66
	Контроли	132.64 ± 13.11	-5.40	6.67	
<b>Центр. аортно систолично налягане, mmHg</b>	T23Д	126.40 ± 13.8	-3.10	7.67	0.84
	Контроли	125.76 ± 12.62	-2.69	6.57	
<b>Сърд. Честота, уд./мин</b>	T23Д	75.12 ± 11.11	-8.56	5.25	0.41
	Контроли	73.17 ± 10.31	-4.69	7.43	
<b>Пулсово налягане, mmHg</b>	T23Д	48.08 ± 11.53	-5.40	6.67	0.39
	Контроли	45.14 ± 9.83	-3.10	7.67	
<b>Средно АН, mmHg</b>	T23Д	101.82 ± 10.6	-2.69	6.57	0.62
	Контроли	102.51 ± 10.02	-8.56	5.25	

### 3. Резултати от измерването на ET показателите на AP на каротидните артерии.

При анализа на резултатите от ехографското изследване на каротидните артерии в групата на пациентите с T23Д, средната стойност на PWVβ на лявата каротидна артерия е  $7.37 \pm 1.32$  m/sec и респективно на дясната е  $7.42 \pm 1.33$  m/sec.



При контролната група PWV $\beta$  измерена на лявата каротидна артерия е  $6.37\pm 0.94$  m/sec, а на дясната съответно е  $6.43\pm 1.11$  m/sec (таблица 4). Следвайки същите горепосочени статистически методи, за да установим дали тази разлика има значимост между пациентите с Т23Д и здравите контроли, проведехме тест на Колмогоров-Смирнов, който показва нормална дистрибуция на данните. Първоначално се вижда, че разликите в PWV $\beta$  между двете групи изразени като средна стойност са 1m/sec за лява АСС и 0.99 m/sec за дясна АСС. Проведеният t-тест показва статистическа значимост на по-високата PWV $\beta$  (ляво и дясно) в изследваната група, в сравнение с контролната ( $t=3.764$ ;  $p=0.001$  и  $t=3.561$ ;  $p=0.001$ ) (таблица 4). С „ R” означихме показателите измерени на дясна, а с „ L“ на лява обща каротидна артерия.

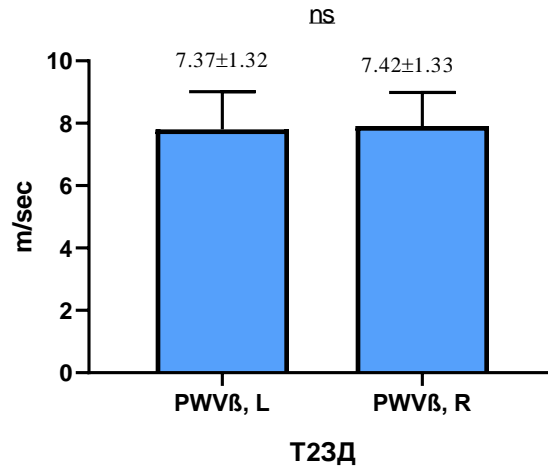
**Таблица 4.** Средни стойности и стандартно отклонение на PWV $\beta$  (L) и PWV $\beta$  (R) в двете изследвани групи и проведен t-тест.

ЕТ показател	Т23Д (n=100)	Контроли (n=30)	p	95% CI, граници	
PWV, L (средна ст. $\pm$ станд.откл.)	$7.37\pm 1.32$	$6.37\pm 0.94$	0.001	0.48	1.54
PWV, R (средна ст. $\pm$ станд.откл.)	$7.42\pm 1.33$	$6.43\pm 1.11$	0.001	0.44	1.53

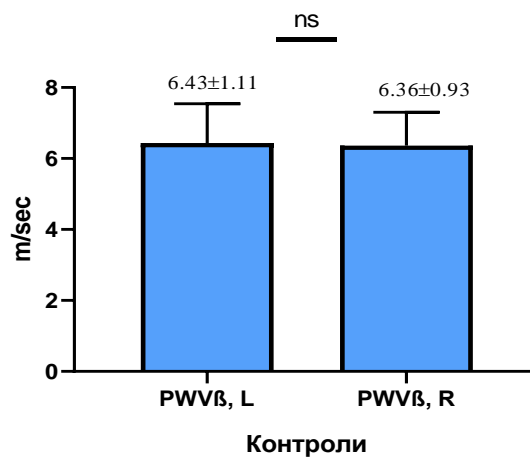
\*n=брой изследвани лица

Освен установяване наличието на значими разлики в PWV $\beta$  между лицата с Т23Д и здравите контроли, потърсихме отговор на въпроса, дали съществуват разлики в PWV $\beta$ , според това дали измерването е извършено на лявата или дясната каротидна артерия, както в групата с Т23Д, така и при здравите лица. В групата с Т23Д PWV(L) е  $7.37\pm 1.32$  m/sec, а PWV (R) е  $7.42\pm 1.33$  m/sec. Проведеният t-тест показва незначимост на тези разлики ( $t=0.56$ ;  $p= 0.57$ ) (диаграма 4). За контролната група съответно измерените от нас стойности са PWV(L)  $6.37\pm 0.94$  m/sec и PWV (R)  $6.43\pm 1.11$  m/sec ( $t=0.24$ ;  $p= 0.8$ ) (диаграма 5).

**Диаграма 4.** Paired t-тест неоткриващ значими разлики между PWV(L) и PWV(R) на участниците в изследваната група на Т23Д.



**Диаграма 5.** Paired t-тест неоткриващ значими разлики между PWV(L) и PWV(R) на участниците в контролната група.



Ехографските параметри на AP –  $\beta$ -stiffness index, модул на еластичност (E<sub>p</sub>), артериален кмплайънс (AC), аугментационен индекс (AI) показаха равномерно разпределение на данните. На таблица 5 са показани средните стойности, стандартните отклонения на двете групи и значимостта на разликите между тях (t-тест).

Резултатите от проведения t-тест, показват значимост на разликите при всички измерени ехографски параметри на AP с изключение на AI (t=-1.408; p=0.162) на дясна каротидна артерия. За разлика от него AI, измерен на лява каротидна артерия показва значима разлика с контролите (t=-2.651, p=0.009) (таблица 5).

**Таблица 5.** Средни стойности и стандартно отклонение на ЕТ показателите с равномерно разпределение на данните.

Дескриптивна статистика			t-test, p	95% CI, граници	
ЕТ показател	Група	Средна стойност ± станд. Откл.		Долна	Горна
β-stiffness index, R	T23Д (n=100)	10.48±4.08	0.001	1.07	4.31
	Контроли (n=30)	7.79± 2.6			
AI, R	T23Д (n=100)	13.36±10.73	0.009	-11.37	-1.65
	Контроли (n=30)	19.87±13.67			
Ep, L	T23Д (n=100)	149.25±58.09	0.001	17.85	63.35
	Контроли (n=30)	108.66±33.23			
AC, L	T23Д (n=100)	0.76±0.32	0.001	-0.39	-0.10
	Контроли (n=30)	1.00±0.44			
AI, L	T23Д (n=100)	12.87±11.94	0.16	-8.36	1.41
	Контроли (n=30)	16.35±9.89			

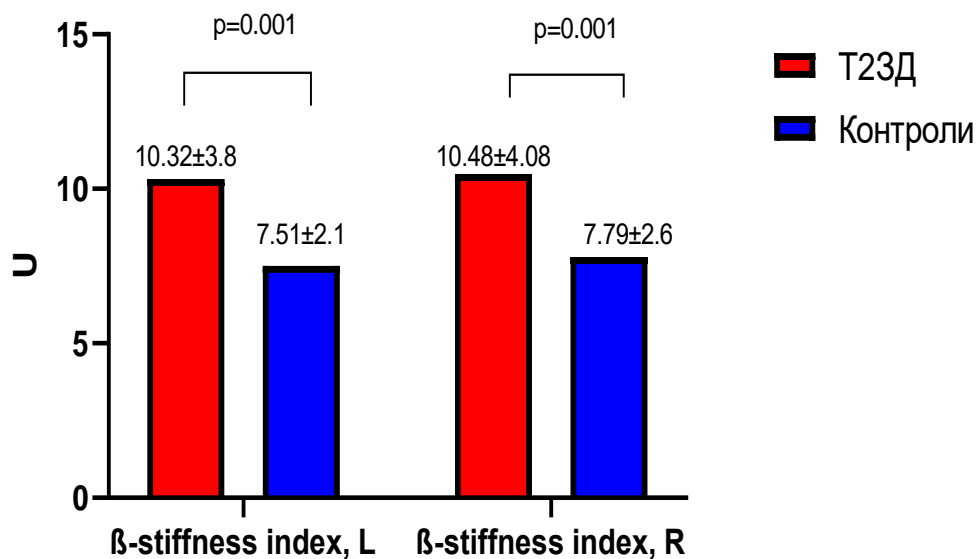
\*n= брой изследвани лица

Тестът на Колмогоров-Смирнов показва асиметрично разпределение на данните получени за Ep (R), AC (R), β-stiffness index (L). С непараметричния тест на Mann-Whitney тествахме за значимост на разликите в двете групи, тези три ехографски параметъра (таблица 6). Значимост на установените разлики се откри при два от показателите: Ep (R) (U=771.5; p=0.001) и β-stiffness index (L) (U=731.5; p=0.001). Стойностите на AC измерен на дясна каротидна артерия не достигна статистическа значимост (U=1090.5; p=0.113).

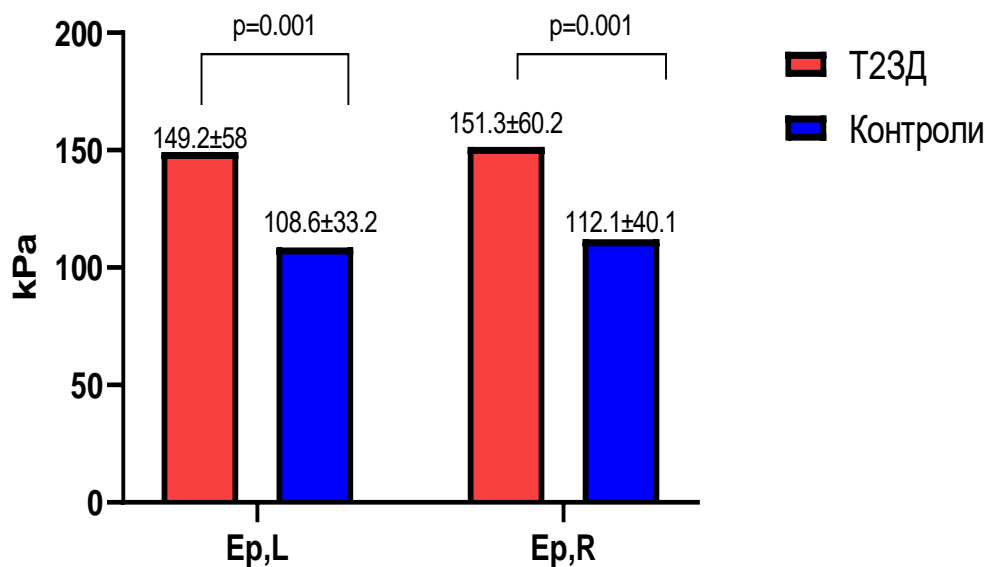
**Таблица 6.** Тест на Mann-Whitney за значимостта на разликите между ехографските показатели на AP, показващи неравномерна дистрибуция - Ep (R), AC (R), и β-stiffness index (L).

Ехографски параметри	Ер, R	АС, R	$\beta$ -stiffness index, L
Ман-Уитни, U	771.5	1090.5	731.5
Wilcoxon W	1177.5	5843.5	1137.5
Z	-3.473	-1.584	-3.807
p	0.001	0.113	0.001

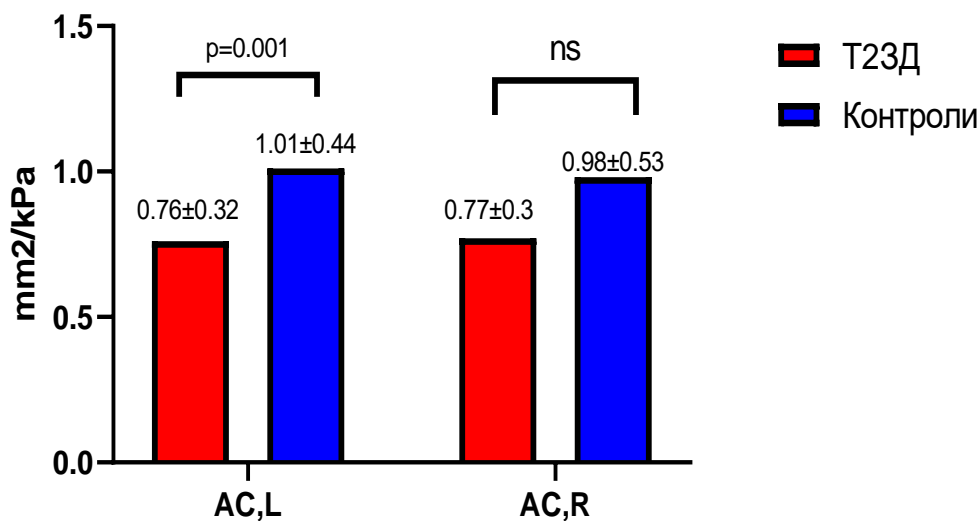
**Диаграма 6.** Статистически значими разлики между средните стойности на  $\beta$ -stiffness index на измерен на лява и дясна каротидна артерия при пациенти с Т23Д и контроли. И за двете артерии,  $p < 0.001$ .



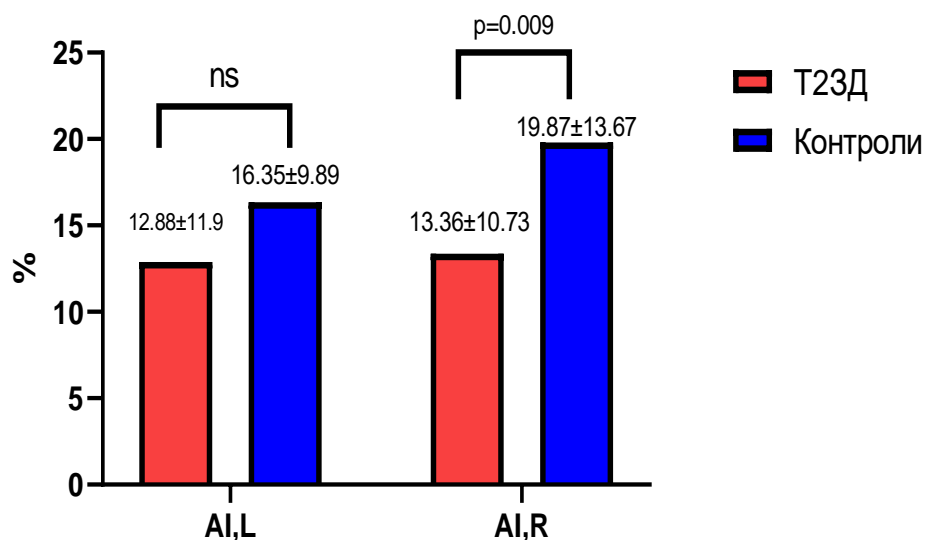
**Диаграма 7.** Статистически значими разлики между средните стойности на Ер (L) и Ер (R) при пациентите с Т23Д и контроли. И за двете артерии  $p < 0.001$ .



**Диаграма 8.** Разлики между средните стойности на AC(L) и AC(R) при пациентите с T23Д и контроли. За лява АСС разликата е статистически значима ( $t = -3.26$ ;  $p < 0.001$ ), докато за дясна АСС недостига значимост ( $U = 1090.5$ ;  $p = 0.11$ )



**Диаграма 9.** Разлики между средните стойности на AI (L) и AI (R) при пациентите с T23Д и контроли. При дясната АСС разликата е статистически значима ( $t = -2.65$ ;  $p = 0.009$ ), докато при лявата АСС не достига значимост ( $t = -1.4$ ;  $p = 0.16$ ).



#### 4. Резултати от изследването на серумните нива на остеокалцин.

Проведохме изследване на серумните нива на ucOC, cOC, и tOC при 47 пациенти от групата с T23Д и 18 лица от контролната група. Средните стойности и стандартното отклонение на серумните нива на cOC при пациентите с T23Д са  $7.84 \pm 2.41$  ng/ml и са по-ниски, сравнено с тези на контролите  $10.05 \pm 4.37$  ng/ml. Съотношението ucOC/tOC, също показва по-ниски средни стойности  $0.28 \pm 0.15$  при пациентите с T23Д, спрямо контролите  $0.34 \pm 0.17$  (таблица 8). Проведеният тест на Колмогоров-Смирнов разкрива равномерно разпределение на данните, както за измерените стойностите на cOC така и за съотношението ucOC/tOC. Тестът за независими извадки показва статистическа значимост на по-ниските серумните концентрации на cOC при пациентите с T23Д спрямо контролите ( $t = -2.604$ ;  $p = 0.011$ ) (таблица 7).

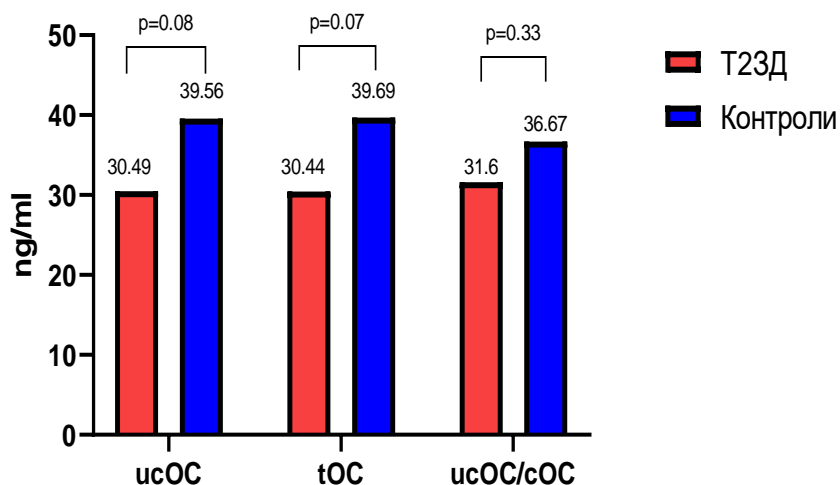
**Таблица 7.** Сравнение на средните стойности и стандартните отклонения на серумните нива на cOC и съотношението ucOC/tOC в двете изследвани групи.

Дескриптивна статистика			t-test, p	95% CI, граници	
	Група	Средна стойност ± станд. откл.		Долна	Горна
сОС, ng/ml	T23Д (n=47)	7.84 ± 2.41	0.01	-3.91	-0.51
	Контроли (n=18)	10.05 ± 4.37			
ucОС/tОС	T23Д (n=47)	0.28 ± 0.15	0.22	-0.14	0.03
	Контроли (n=18)	0.33 ± 0.17			

\*n= брой изследвани

Установените серумни концентрации на ucОС в групата на пациентите с T23Д показват по-ниски средни стойности  $3.81 \pm 5.12$  ng/ml сравнено с тези при здравите контроли  $4.37 \pm 3.0$  ng/ml. Тази тенденция се запазва и при сравняването на серумните концентрации на tОС в групата на пациентите с T23Д  $11.64 \pm 5.24$  ng/ml и контролите  $14.08 \pm 6.07$  ng/ml. Поради неравномерната дистрибуция на данните проведехме непараметричен анализ (Mann-Whitney), който разкри липса на статистическа значимост на по-ниските концентрации на ucОС ( $U=305$ ;  $p=0.08$ ) и tОС ( $U=302.5$ ;  $p=0.07$ ) в двете изследвани групи (диаграма 10). Поради по-ниските нива на двете форми на остеокалцина установени при пациентите с T23Д, тяхното съотношение също показва по-ниски стойности, като отново не достигна статистическа значимост ucОС/cОС ( $U=357$ ;  $p=0.33$ ) (диаграма 10).

**Диаграма 10.** Сравнение на средните ранкове, недостигащи статистическа значимост на разликите в серумните нива на ucОС и tОС, както и при съотношението ucОС/cОС при пациентите с T23Д и контроли (Mann-Whitney).



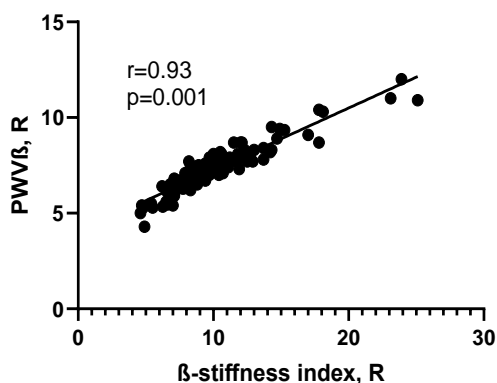
## 5. Корелационни зависимости в групата на пациентите с Т23Д.

### 5.1. Корелационни зависимости на ЕТ показателите на АР

5.1.1. Корелации между показателите на АР: PWV $\beta$ , Ep, AC, AI и  $\beta$ -stiff. index.

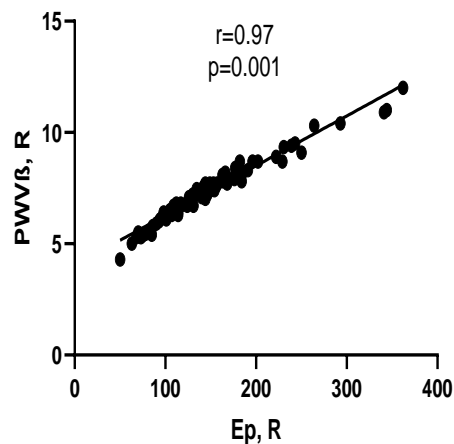
Оценката на силата на корелационната зависимост се базира на коефициента на Pearson ( $r$ ), като статистическа значимост се приема при стойност на  $p \leq 0.05$ . Потърсихме отговор на въпроса съществува ли корелация на основния показател PWV $\beta$  с останалите ехографски измерени показатели на АР. Такава много силна положителна корелационна зависимост установихме при измерванията на дясна каротидна артерия между PWV $\beta$  (R) и  $\beta$ -stiffness индекс(R) ( $r=0.93$ ;  $p=0.001$ ) (графика 1) и с Ep(R) ( $r=0.97$ ;  $p=0.001$ ) (графика 2). Отрицателна обратна корелационна зависимост се разкри между PWV $\beta$ (R) и AC (R) ( $r=-0.64$ ;  $p=0.001$ )(графика 3).

**Графика 1.** Корелационна зависимост между PWV $\beta$ (R) и  $\beta$ -stiffness индекс(R)

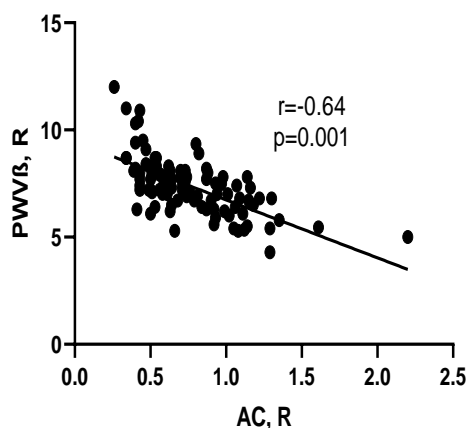


**Графика 2.** Корелационна зависимост между PWV $\beta$ (R) и Ep(R)





**Графика 3.** Корелационна зависимост между  $PWV\beta(R)$  и  $AC(R)$



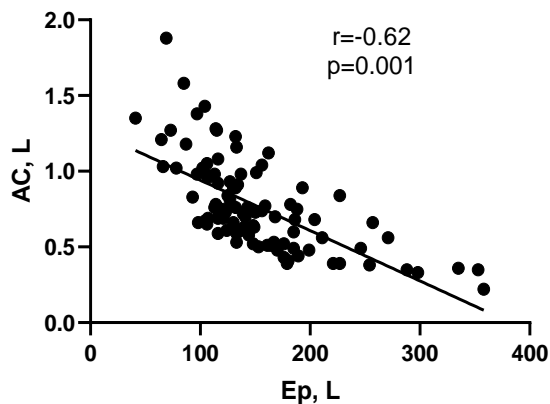
Освен между  $PWV\beta$  и  $AC$ , също така установихме корелационни връзки на  $AC$  с  $E_p$  и  $\beta$ -stiffness индекс на дясна АСС (таблица 8).

**Таблица 8.** Значими корелации между ЕТ показателите на дясна АСС при пациентите с Т2ЗД.

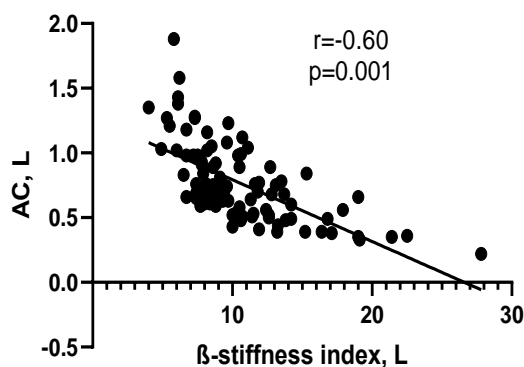
<b>Корелационен анализ</b>		<b><math>E_p (R)</math></b>	<b><math>\beta</math>-stiff. index (R)</b>
<b><math>AC, mm^2/kPa</math></b>	коэффициент на Pearson, $r$	-0.66	-0.64
	значимост, $p$	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>

На лявата АСС при пациентите с Т2ЗД установихме значителна отрицателна корелационна зависимост на  $AC (L)$  с  $E_p (L)$  ( $r=-0.62$ ;  $p=0.001$ ), и с  $\beta$ -stiffness индекса ( $L$ ) ( $r=-0.60$ ;  $p=0.001$ ) (графика 4 и графика 5).

**Графика 4.** Отрицателна корелационна зависимост на AC (L) с Ep (L)



**Графика 5.** Отрицателна корелационна зависимост на AC (L) с  $\beta$ -stiffness индекса (L)



AI измерен на лява каротидна артерия при пациентите с Т23Д показва слаба корелация с PWV $\beta$  (L) ( $r=0.19$ ;  $p=0.05$ ) и с  $\beta$ -stiffness индекс (L) ( $r=0.24$ ;  $p=0.01$ ) (таблица 9).

**Таблица 9.** Корелационни зависимости на AI с PWV $\beta$  (L) и с  $\beta$ -stiffness индекс (L)

Корелационен анализ		PWV $\beta$ (L)	$\beta$ -stiffness index (L)
AI, %	коэффициент на Pearson, r	0.19	0.24
	значимост, p	0.05	0.01

5.1.2. Корелации на показателите на AP с антропометрични, липидни и глюкозни показатели.

➤ Антропометрични показатели

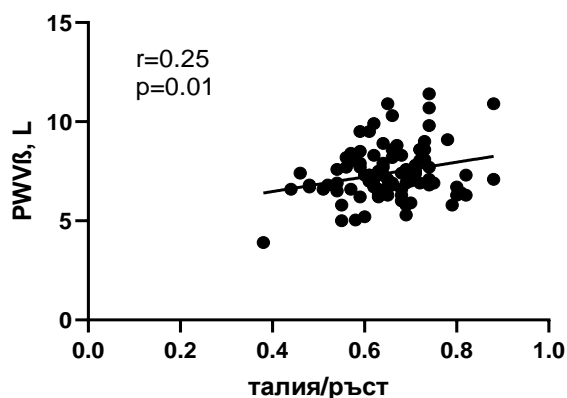
Разкриха се множество корелационни зависимости между обиколката на талията и ЕТ показателите на АР. От ехографските показатели измерени на лявата АСС талията умерено корелира с  $E_p(L)$  ( $r=0.27$ ;  $p=0.007$ ). При измерванията извършени на дясна АСС, наблюдавахме положителна корелация на обиколката на талията с  $PWV\beta(R)$  ( $r=0.24$ ;  $p=0.01$ ), с  $E_p(R)$  ( $r=0.23$ ;  $p=0.02$ ), и с  $\beta$ -stiffness index (R) ( $r=0.22$ ;  $p=0.02$ ). Отрицателна значима корелация се разкри между талията и AI (R) ( $r=-0.21$ ;  $p=0.04$ ) (таблица 10).

**Таблица 10.** Корелационни зависимости на показателите на АР с обиколката на талията в групата на пациентите с Т23Д.

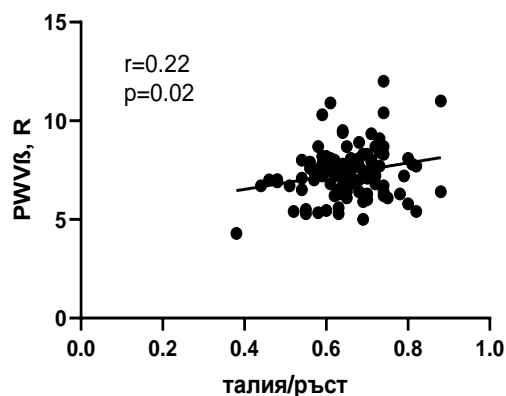
Корелационен анализ		$E_p(L)$	PWV (R)	$E_p(R)$	$\beta$ -stiff. Index (R)	AI (R)
Обиколка на талията (cm)	коэффициент на Pearson, r	0.27	0.24	0.23	0.22	-0.21
	значимост, p	0.007	0.01	0.02	0.02	0.04

Връзка на показателите на АР се установиха и със съотношението талия/ръст в изследваната група. Проведения корелационен анализ разкрива, сигнификантна положителна зависимост с  $PWV(L)$  ( $r=0.25$ ;  $p=0.01$ ) и  $PWV(R)$  ( $r=0.22$ ;  $p=0.02$ ) (графика 6 и графика 7).

**Графика 6.** Положителна корелационна зависимост на  $PWV(L)$  със съотношението талия/ръст при пациентите с Т23Д



**Графика 7.** Положителна корелационна зависимост на PWV (R) със съотношението талия/ръст при пациентите с Т23Д

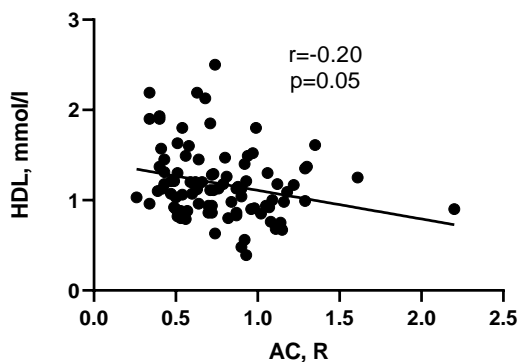


Не се разкриха връзки между измерените ЕТ показателите и ИТМ при изследваните пациентите с Т23Д.

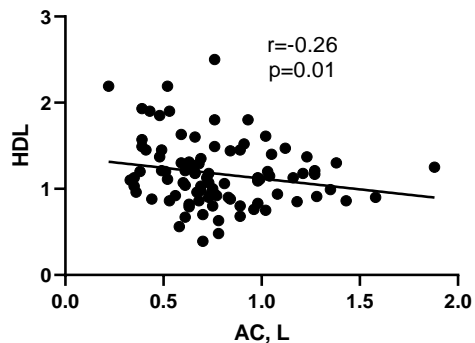
➤ Липидни показатели

В изследваната от нас група не се установяват корелации на показателите на АР с общия холестерол, триглицеридите и LDL-C. Сигнификантна отрицателна корелационна зависимост открихме между HDL и АС (L) ( $r=-0.26$ ;  $p=0.01$ ) и АС (R) ( $r=-0.020$ ;  $p=0.05$ ) в групата на пациентите с Т23Д. Подобна корелация на HDL не се установява в контролната група, както и при анализ на изследваната група в комбинация със здравите контроли.

**Графика 8.** Отрицателна корелационна зависимост на HDL и АС(R) в групата на пациентите с Т23Д



**Графика 9.** Отрицателна корелационна зависимост на HDL и АС(R) в групата на пациентите с Т23Д



➤ Глюкометаболитни показатели.

Не установихме корелационни връзки между от ЕТ показателите и плазмената глюкоза на гладно (ПГГ), както в групата на пациентите и Т23Д, така и общо в двете групи. За разлика от ПГГ, значими корелационни връзки се разкриха между HbA1c и PWVβ, както на лява АСС, така и на дясна АСС при анализ на резултатите в двете изследвани групи (общо за Т23Д и контроли) (таблица 11). Когато анализът се проведе само в групата на лицата с Т23Д, такава корелационна зависимост не се наблюдава.

**Таблица 11.** Корелационен анализ показващ значима връзка на HbA1c с PWV(L) и PWV(R) при пациентите с Т23Д и контроли

Корелационен анализ		PWV(L) (n=130)	PWV (R) (n=130)
HbA1c,%	коефициент на Pearson, r	0.23	0.21
	значимост, p	0.01	0.01

\*n=брой изследвани лица

➤ Корелации с тютюнопушенето в групата на пациентите с Т23Д.

**Таблица 12.** Корелационен анализ показващ значима връзка на тютюнопушенето с PWV(L) и PWV(R) при пациентите с Т23Д и контроли.

Корелационен анализ	PWVβ (L)		PWVβ (R)	
	r	p	r	p
Цигари	-0.26	0,008	-0.27	0.006

### 5.1.3. Корелационни зависимости на параметрите на AP с хемодинамичните показатели.

Проведохме измерване на артериалното налягане на артерия брахиалис и на CASP посредством устройство Caspal A-pulse при 82 от пациентите в групата с T23Д. Установихме корелационни зависимости между болшинството от хемодинамичните и ехографските параметри в групата на пациентите с T23Д. Положителна корелационна зависимост наблюдавахме при САН с всички параметри на AP измерени на дясна АСС ( $p \leq 0.05$ ), и с Ер и АС измерени на лява АСС ( $p=0.001$ ). За ДАН, наблюдавахме положителна корелация с Ер(L) ( $p=0.001$ ) и отрицателна с  $\beta$ -stiffness индекс(L) ( $p=0.02$ ). Силни корелационни зависимости открихме при ПН с всички ехографски измерени показатели на AP на двете каротидни артерии, с изключение на AI. Тези корелации бяха положителни за PWV, Ер,  $\beta$ -stiff. индекса, и отрицателни при АС. За разлика от ПН, при Ср.АН положителна корелация открихме при PWV $\beta$  (L) ( $p=0.004$ ) и PWV $\beta$  (R) ( $p=0.004$ ), както и Ер (L) ( $p=0.04$ ) и Ер (R) ( $p=0.004$ ). Централното аортно систолно налягане показва положителни корелационни зависимости с PWV $\beta$ (L) ( $p=0.04$ ) и PWV $\beta$ (R) ( $p=0.01$ ), с Ер(R) ( $p=0.01$ ) и AI (R) ( $p=0.02$ ). Обратна значителна корелация наблюдавахме при CASP с АС (L) ( $p=0.007$ ) и АС (R) ( $p=0.05$ ). При стойностите на СЧ на пациентите с T23Д установихме отрицателна корелационна зависимост с AI измерен и на двете каротидни артерии AI (L) ( $p=0.007$ ) и AI(R) ( $p=0.006$ ) (таблица 13 и таблица 14).

**Таблица 13.** Корелационен анализ на параметрите на AP на лява АСС и хемодинамичните показатели в групата на пациентите с T23Д

		CASP	САН	ДАН	СЧ	ПН	Ср.АН
Брой изследвани пациенти	N	82	100	100	100	100	100
PWV (L), m/sec	r	0,222*	0,16	0,06	0,14	0,43**	0,28**
	p	0,045	0,10	0,52	0,15	0,0001	0,004
Ep (L), kPa	r	0,009	0,347**	0,443**	0,114	0,52**	0,2
	p	0,926	0,001	0,0001	0,259	0,001	0,04
AC (L), mm <sup>2</sup> /kPa	r	-0,295**	-0,341**	-0,082	-0,208*	-0,28	-0,18
	p	0,007	0,001	0,418	0,039	0,004	0,07
β-stiffness index (L)	r	0,15	-0,107	-0,23	0,1	0,44**	-0,08
	p	0,18	0,29	0,02	0,326	0,001	0,41
AI (L), %	r	0,075	0,057	-0,045	-0,278**	0,08	0,19
	p	0,504	0,578	0,660	0,005	0,39	0,05

**Таблица 14.** Корелационен анализ на параметрите на AP на лява АСС и хемодинамичните показатели в групата на пациентите с Т23Д

		CASP	САН	ДАН	СЧ	ПН	Ср.АН
Брой изследвани пациенти	n	82	100	100	100	100	100
PWV (R), m/sec	r	.286*	.427**	0,14	0,08	0,38**	0,35**
	p	0,011	0,001	0,18	0,44	0,001	0,004
Ep (R), kPa	r	.273*	.419**	0,02	0,05	0,52**	0,28**
	p	0,015	0,001	0,88	0,61	0,001	0,004
AC (R), mm <sup>2</sup> /kPa	r	-0,21	-0,291**	-0,08	-0,18	-0,33	-0,15
	p	0,05	0,004	0,43	0,08	0,0007	0,11
β-stiffness Index (R)	r	0,08	-0,195*	-0,10	0,05	0,39**	0,03
	p	0,48	0,06	0,29	0,62	0,001	0,71
AI (R) %	r	.256*	0,209*	0,17	-0,279**	0,06	-0,02
	p	0,02	0,04	0,10	0,006	0,52	0,84

Измерванията на хемодинамичните показатели в контролната група аналогично показаха корелационни зависимости с хемодинамичните показатели (таблица 15).

**Таблица 15.** Корелационен анализ на PWV $\beta$  на лява и дясна АСС с хемодинамичните показатели в контролната група

		CASP	САН	ДАН	ПН	Ср.АН
	n	26	26	26	26	26
PWV (L), m/sec	r		0.48		0.56	
	p	ns	0.008	ns	0.001	ns
PWV (R), m/sec	r	0.4	0.4		0.39	
	p	0.04	0.03	ns	0.03	ns

\*n- брой изследвани пациенти, ns- незначимост

#### 5.1.4. Корелационни зависимости на PWV $\beta$ с възрастта в групата на пациентите с Т23Д

Положителна умерена корелация на възрастта, се открива с Ер (R) (r=0.358; p=0.001) и Ер (L) (r=0.291; p=0.003), както и за PWV $\beta$  (R) (r=0.317; p=0.002) (таблица 16).

**Таблица 16.** Корелационни зависимости на възрастта на пациентите в групата на Т23Д с показателите за АР.

Възраст		Ер (R)	АС (R)	АІ (R)	PWV (R)	Ер (L)	АС (L)	АІ (L)	PWV (L)
	n	100	100	100	100	100	100	100	100
	коэффициент на Пийрсън, r	0.358**	-0.151	0.126	0.317**	0.291**	-0.012	0.188	0.01
	p	0.001	0.139	0.22	0.002	0.003	0.216	0.062	0.921

Анализирахме връзката на PWV $\beta$  с възрастта на изследваните пациенти по декади, разделени на три групи. Група 1 - пациенти на възраст 39-50 год., група 2 - от 51 до 61 годишна възраст; Група 3 - над 61 години.



Сравнихме групите с помощта на дисперсионен анализ - ANOVA (таблица 17).

**Таблица 17.** Средна стойност и стандартно отклонение на PWVβ в трите възрастови групи

	PWVβ (L)			PWVβ (R)		
	Средна стойност±SD	95% CI, граници		Средна стойност±S	95% CI, граници	
		Долна	Горна		Долна	Горна
Група 1	6.72±1.15	6.22	7.24	6.64±0.83	6.26	7.02
Група 2	7.0±1.28	6.73	7.39	7.09±1.26	6.77	7.42
Група 3	7.49±1.38	7.07	7.90	7.6±1.54	7.13	8.07

Проведохме дисперсионен анализ ANOVA, който разкри статистически значима разлика в стойностите на PWVβ (R) ( $p=0.01$ ), която е обща за трите възрастови групи. При лява АСС също се наблюдава повишаване на PWVβ (L) с възрастта, макар и без да достига значимост ( $p=0.06$ ).

За разкриване наличието на вътрегрупови разлики, използвахме ANOVA - post hot анализ на Tukey. Открихме статистически значима разлика в стойностите на PWVβ (R) между група 1 и група 3 ( $p=0.02$ ), следователно спрямо пациентите на възраст между 39-50 год. (група 1), тези над 61 години (група 3) имат значимо различаваща се по-висока стойност на PWVβ ( $p=0.02$ ) (таблица 18).

**Таблица 18.** Дисперсионен анализ ANOVA-post hot Tukey HSD разкриващ значими разлики на PWVβ(R) между различните възрастови групи.

ANOVA- post hot-Tukey HSD							
Зависима променлива: PWVβ (R)							
(I) декади общо	(J) декади общо	Средна разлика м/у декадите (I-J)	Станд. Грешка	p	95% CI, граници		
					Долна	Горна	
Група 1	Група 2	-0.45	0.33	0.37	-1.24	0.34	
	Група 3	-0.96	0.35	<b>0.02</b>	-1.78	-0.13	
Група 2	Група 1	0.45	0.33	0.37	-0.34	1.24	
	Група 3	-0.51	0.26	0.13	-1.12	0.11	
Група 3	Група 1	0.95*	0.35	<b>0.02</b>	0.13	1.78	
	Група 2	0.51	0.26	0.13	-0.11	1.12	

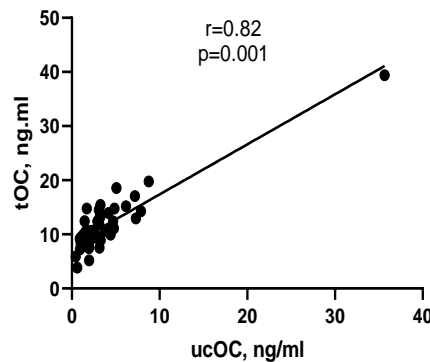
Същият анализ проведен при PWVβ (L), разкрива също голяма разлика между група 1 и група 3, без да достига значимост ( $p=0.07$ )

## 5.2. Корелационни зависимости на серумните нива на остеокалцин.

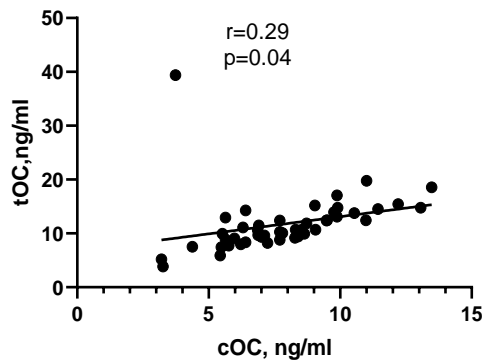
### 5.2.1. Корелация между различните форми на остеокалцин

Използвахме корелационен анализ за да изследваме зависимостта между различните форми на остеокалцин и да оценим силата на тяхното влияние. В научните публикации по-често изследван и съобщаван е tOC, без да разграничават неговите карбоксилирана и некарбоксилирана форма. Поради това проверихме съществува ли връзка между различните форми на OC в групата на пациентите с T23Д. Установихме положителна зависимост на tOC както с нивата на ucOC, така и с нивата на cOC. Между ucOC и tOC тази зависимост беше силна и значима ( $r=0.824$ ;  $p=0.001$ ) (графика 10). Серумните концентрации на cOC показаха, макар и по-слаба, но също положителна корелационна зависимост с tOC ( $r=0.299$ ;  $p=0.041$ ) (графика 11).

**Графика 10.** Корелационна зависимост на серумните концентрации на tOC и ucOC в групата на пациентите с T23Д



**Графика 11.** Корелационна зависимост на серумните концентрации на tOC и cOC в групата на пациентите с T23Д



### 5.2.2. Корелационни зависимости на ОС с антропометрични, липидни и глюкозни показатели.

#### ➤ Антропометрични показатели

Потърсихме корелационни зависимости на остеокалцин с ВМІ, обиколката на талията и съотношението талия/ръст. Статистически значими корелации с антропометричните измервания открихме за серумните концентрации на сОС и tОС, но не и за серумните нива на ucОС, когато се включат данни и за двете изследвани групи (n=65). Корелационен анализ само на антропометричните показатели в групата на пациентите с Т23Д (n=47) не разкрива връзка между тях и ОС.

**Таблица 19.** Корелации на сОС с антропометрични показатели при пациентите с Т23Д и контролите.

Антропометричен показател	сОС, ng/ml	
	r	p
<b>ВМІ (kg/m<sup>2</sup>)</b> n=65	-0.32	<b>0.007</b>
<b>Талия (см)</b> n=65	-0.4	<b>0.0009</b>
<b>Талия/ръст</b> n=65	-0.39	<b>0.005</b>

\*n = брой изследвани лица; r- коефициент на Pearson

**Таблица 20.** Корелации на tОС с обиколката на талията при пациентите с Т23Д и контролите

Корелационен анализ		tOC, ng/ml
<b>Талия (см) n=65</b>	r	-0.27
	p	<b>0.02</b>

\*n = брой изследвани лица; r- коефициент на Spearman

➤ Липидни показатели

Потърсихме корелационни зависимости на ОС с липидните показатели при 65 лица от изследваната и контролната група. Такива установихме между всички форми на ОС и HDL-C. Така положителна корелация се разкри при ucOC и HDL-C ( $r=0.25$ ;  $p=0.05$ ), при cOC и HDL-C ( $r=0.3$ ;  $p=0.01$ ) и при tOC и HDL-C ( $r=0.33$ ;  $p=0.008$ ) (таблица 21). Когато същият анализ проведохме само в групата на пациентите с Т23Д (n=47), зависимост наблюдавахме дори с по-голям корелационен коефициент с ucOC ( $r=0.42$ ;  $p=0.004$ ) и с tOC ( $r=0.48$ ;  $p=0.001$ ) (таблица 22). Разкрихме и сигнификантна корелационна зависимост между общия холестерол и tOC ( $r=0.3$ ;  $p=0.04$ ) само в групата на лицата с Т23Д.

**Таблица 21.** Корелационен анализ между HDL-C и остеокалцин в групата на пациенти с Т23Д и контроли (n=65)

Корелационен анализ	ucOC, ng/ml		cOC, ng/ml		tOC, ng/ml	
	r	p	r	p	r	p
<b>HDL-C, mmol/l</b>	0.25	<b>0.05</b>	0.3	<b>0.01</b>	0.33	<b>0.008</b>

**Таблица 22.** Корелационен анализ между HDL-C и остеокалцин вътре в групата на пациенти с Т23Д (n=47).

Корелационен анализ	ucOC, ng/ml		cOC, ng/ml		tOC, ng/ml	
	r	p	r	p	r	p
<b>HDL-C, mmol/l</b>	0.42	<b>0.004</b>	0.16	0.27	0.48	<b>0.001</b>

Не открихме зависимост на ОС с плазмената глюкоза на гладно и гликирания хемоглобин, както в групата на пациентите с Т23Д, така и общо за двете изследвани групи.

### 5.2.3. Корелационни зависимости на ОС с параметрите на АР.

Потърсихме връзка на серумните нива на ОС с ехографски измерените параметри на АР. Сигнификантна положителна корелация открихме при  $\beta$ -stiffness index ( $r=0.317$ ;  $p=0.03$ ) и  $E_p$  ( $r=0.291$ ;  $p=0.05$ ) на дясна каротидна артерия (таблица 23). При измерванията на лява АСС, наблюдавахме единствено слаба отрицателна корелационна зависимост между ucOC/tOC и AI (L) ( $r=-0.30$ ;  $p=0.02$ ) в групата на пациенти с Т23Д (таблица 24).

**Таблица 23.** Корелации на ЕТ показателите измерени на дясна АСС с различните форми на ОС в групата на пациентите с Т23Д

	$\beta$ -stiff. index, R	PWV, R	$E_p$ , R	АС, R	AI, R
<b>ucOC, ng/ml</b>	$r=-0.038$ $p=0.803$	$r=0.016$ $p=0.915$	$r= - 0.02$ $p=0.852$	$r= - 0.13$ $p=0.371$	$r=0.094$ $p=0.535$
<b>cOC, ng/ml</b>	$r=0.317$ <b><math>p=0.032</math></b>	$r=0.230$ $p=0.124$	$r=0.291$ <b><math>p=0.05</math></b>	$r= - 0.25$ $p=0.082$	$r=0.097$ $p=0.521$
<b>tOC, ng/ml</b>	$r=0.108$ $p=0.476$	$r=0.120$ $p=0.428$	$r=0.105$ $p=0.487$	$r= - 0.24$ $p=0.097$	$r=0.134$ $p=0.373$
<b>ucOC/tOC</b>	$r=-0.125$ $p=0.408$	$r= - 0.06$ $p=0.068$	$r=-0.112$ $p=0.457$	$r=-0.03$ $p=0.83$	$r=-0.061$ $p=0.686$
<b>ucOC/cOC</b>	$r=-0.52$ $p=0.731$	$r=0.000$ $p=0.999$	$r=-0.04$ $p=0.78$	$r=-0.103$ $p=0.496$	$r=0.089$ $p=0.554$

**Таблица 24.** Корелации на ЕТ показателите измерени на лява АСС с различните форми на ОС в групата на пациентите с Т23Д

	$\beta$ -stiff. index, L	PWV, L	Ep, L	AC, L	AI, L
<b>ucOC, ng/ml</b>	r=-0.173	r=-0.156	r=-0.158	r=-0.047	r=-0.245
	p=0.245	p=0.295	p=0.289	p=0.756	p=0.097
<b>cOC, ng/ml</b>	r=0.154	r=0.091	r=0.134	r=-0.183	r=0.243
	p=0.3	p=0.543	p=0.370	p=0.219	p=0.100
<b>tOC, ng/ml</b>	r=-0.097	r=-0.109	r=-0.092	r=-0.128	r=-0.127
	p=0.516	p=0.464	p=0.539	p=0.991	p=0.395
<b>ucOC/tOC</b>	r=-0.180	r=-0.164	r=-0.165	r=0.47	r=-0.30
	p=0.227	p=0.271	p=0.269	p=0.753	<b>p=0.024</b>
<b>ucOC/cOC</b>	r=-0.166	r=-0.145	r=-0.151	r=-0.043	r=-0.230
	p=0.264	p=0.331	p=0.310	p=0.774	p=0.119

## 6. Многофакторен регресионен анализ

Използвахме многофакторен регресионен анализ, за да конструираме модели на базата на всички променливи, които сигнификантно корелираха с PWV $\beta$  и  $\beta$ -stiffness index в проведените корелационните анализи. Когато използвахме PWV(L) като зависима променлива с каротидната ригидност независимо корелираха CASP, ПН, ср.АН и тютютопушенето (таблица 25). Когато за анализа използвахме PWV $\beta$  (R) за независима променлива с каротидната ригидност независимо корелираха САН, ПН,  $\beta$ -stiffness index, Ep и AC (таблица 26)

**Таблица 25.** Многофакторен регресионен анализ с зависима променлива PWV(L) в групата на пациентите с Т23Д

Модел		Стандартизиран коэффициент Beta	p	95.0% CI, за Beta	
				долна	горна
МОДЕЛ 1	CASP	-0.14	0.07	-0.09	0.001
	ПН	0.01	0.0002	0.03	0.1
	Ср.АН	-0.29	0.03	0.004	0.11
МОДЕЛ 2	CASP	-0.23	0.14	-0.09	0.01
	ПН	0.4	0.001	0.02	0.1
	Ср.АН	-0.11	0.08	-0.007	0.1
	Талия	-0.48	0.22	-0.007	0.03
МОДЕЛ 3	CASP	-0.21	0.16	-0.009	0.01
	ПН	0.14	0.001	0.02	0.1
	Ср.АН	-0.11	0.09	-0.008	0.1
	Талия	-0.48	0.28	-0.009	0.03
	AI (L)	-0.07	0.79	-0.03	0.02
	цигари	-0.15	0.005	-1.28	-0.22

**Таблица 26.** Многофакторен регресионен анализ с зависима променлива PWV(R) в групата на пациентите с Т23Д

Модел		Стандартизиран	p	95.0% CI, за Beta	
		коэффициент		долна	горна
		Beta			
	HBA1c	-0.07	0.35	-0.02	-0.009
Модел 1	CAPS	0.024	0.27	-0.004	0.01
	CAH	-0.047	0.52	-1.22	2.38
	ПН	0.047	0.51	-1.6	0.8
	Ср.АН	0.041	0.54	-2.36	1.24
	$\beta$ -stiffness ind	-0.816	0.02	0.02	0.27
	Ер, R	0.821	0.01	0.002	0.01
	АС, R	-0.211	0.0062	-0.47	-0.08
	талия	-0.053	0.32	-0.001	0.005
	възраст	-0.323	0.45	-0.004	0.009
Модел 2	HBA1c	1.548	0.13	-0.05	0.007
	CAPS	1.349	0.19	-0.004	0.023
	CAH	3.196	0.0034	0.012	0.054
	ПН	5.691	<0.0001	-0.044	-0.02
	$\beta$ -stiffness inc	3.742	0.0008	0.14	0.48
	Ер, R	0.1461	0.88	-0.01	0.01
	АС, R	1.91	0.07	-0.522	0.01
	талия	0.2055	0.84	-0.006	0.005
	възраст	0.2875	0.78	-0.013	0.01
Модел 3	HBA1c	0.8213	0.41	-0.025	0.01
	CAPS	1.242	0.22	-0.003	0.01
	CAH	3.216	0.002	0.009	0.04
	ПН	7.022	<0.0001	-0.04	-0.02
	$\beta$ -stiffness ind	2.754	0.007	0.046	0.29
	Ер, R	2.328	0.02	0.001	0.01
	АС, R	2.712	0.008	-0.417	-0.06
	възраст	0.4455	0.66	-0.004	0.007
Модел 4	HBA1c	0.795	0.43	-0.02	0.01
	CAPS	1.307	0.20	-0.003	0.01
	CAH	3.206	0.002	0.0092	0.04
	ПН	7.09	<0.0001	-0.03	-0.02
	$\beta$ -stiffness ind	2.768	0.007	0.047	0.29
	Ер, R	2.36	0.02	0.001	0.01
	АС, R	2.706	0.008	-0.413	-0.06
Модел 5	CAPS	0.4577	0.64	-0.008	0.01
	CAH	1.578	0.11	-0.003	0.02
	ПН	5.124	<0.0001	-0.031	-0.01
	$\beta$ -stiffness ind	0.6581	0.51	-0.08	0.15
	Ер, R	4.603	<0.0001	0.01	0.027
	АС, R	3.224	0.001	-0.502	-0.11
Модел 6	CAH	2.97	0.003	0.005	0.02
	ПН	5.748	<0.0001	-0.029	-0.01
	$\beta$ -stiffness ind	0.8681	0.38	-0.062	0.15
	Ер, R	4.853	<0.0001	0.011	0.02
	АС, R	2.864	0.005	-0.423	-0.07
	цигари	-1.48	0.14	-0.15	0.02



Зависимата променлива  $\beta$ -stiffness index (L) сигнификантно корелира с независимите променливи АС, ДАН и ПН в групата на пациентите с Т23Д (таблица 27)

**Таблица 27.** Многофакторен регресионен анализ с зависима променлива  $\beta$ -stiffness index (L) в групата на пациентите с Т23Д

Модел	Стандартизиран коэффициент	p	95.0% CI, за Beta	
	Beta		долна	горна
АС	-0.44	<0.0001	-9.95	-6.05
AI	0.05	0.11	-0.09	0.01
ДАН	-0.84	0.006	-0.13	-0.02
ПН	-0.56	0.0002	0.05	0.15

Зависимата променлива  $\beta$ -stiffness index (R) сигнификантно корелира с независимите променливи САН, ПН, Ер и сОС (таблица 28)

**Таблица 28.** Многофакторен регресионен анализ с зависима променлива  $\beta$ -stiffness index (R)

Модел		Стандартизиран коэффициент	p	95.0% CI, за B	
		Beta		долна	горна
МОДЕЛ 1	PWV	-0.84	0.38	-0.21	0.54
	Ер	0.8	0.0001	0.05	0.07
	АС	-0.51	0.2	-0.54	0.11
	САН	0.05	<0.0001	-0.09	-0.07
	ПН	-0.41	<0.0001	0.03	0.06
МОДЕЛ 2	PWV	-0.82	0.37	-0.21	0.56
	Ер	0.79	<0.0001	0.05	0.07
	АС	-0.47	0.27	-0.55	0.15
	САН	0.05	<0.0001	-0.09	-0.07
	ПН	-0.4	<0.0001	0.03	0.06
	Талия	-0.02	0.8	-0.006	0.005
МОДЕЛ 3	PWV	-0.82	0.03	0.04	1.23
	Ер	0.8	<0.0001	0.03	0.06
	АС	-0.58	0.32	-0.79	0.27
	САН	0.047	<0.0001	-0.1	-0.07
	ПН	-0.36	<0.0001	0.04	0.07
	Талия	0.027	0.53	-0.006	0.01
	сОС	-0.34	0.04	0.0005	0.1

## 7. Резултати от проведената суплементация с витамин К2.

Допълнително проведехме суплементация с витамин К2 за срок от 4 седмици при 18 пациента от групата на Т23Д, избрани на случаен принцип, които дадоха информирано съгласие за това и се явиха на контролен преглед. Витамин К2 беше назначен под формата на таблетки съдържащи менахинон-7 (Кинон®) в доза 75µg, приемани веднъж дневно. Целта на суплементацията беше да установят настъпили промени в концентрациите на cOC, ucOC и показателите на AP.

Контролна ехография за определяне на показателите на AP проведехме след 4 седмици на суплементация, сутрин на гладно, като едновременно с това се взеха серумни проби за нива на cOC и ucOC. Изходните характеристики на пациентите с Т23Д провели суплементация са показани на таблица 29.

**Таблица 29.** Изходни характеристики на пациентите с Т23Д провели суплементация с витамин К2.

Характеристика	ср. стойн.±станд. откл.	Характеристика	ср. стойн.±станд. откл.
Възраст (год.)	59.09±8.5	АС, L	0.85±0.28
Жени (мъже) (%)	61,2 (38.8)	PWVβ, R	7.01±1.22
Давност на Т23Д (год.)	5,1±6.6	β-stiffness index, R	10.07±3.41
Пушачи (%)	50	Ер,R	138.02±54.45
ВМІ (kg/m <sup>2</sup> )	31.5±7.5	АС,R	0.86±0.25
Талия(см)	105.2±17.8	PWVβ, L	7.0±1.43
Плазмена глюкоза mmol/l	8.0±2.6	CASP, mmHg	119.8±12.19
HbA1c, %	8.1±1.9	САН, mmHg	127.3±13.2
Chol, mmol/l	4.98±1.34	ДАН, mmHg	78.5±8.7
TG, mmol/l	2.17±2.19	ПН, mmHg	48.8±11.9
HDL-C, mmol/l	1.18±0.52	Ср. АН,mmHg	94.7±8.0
LDL-C, mmol/l	2.83±1.67	ucOC, ng/ml	4.2±2.4
β-stiffness index, L	9.97±4.17	cOC, ng/ml	8.08±2.06
Ер,L	136.1±53.03	tOC, ng/ml	12.2±3.2

➤ **Сравнителен анализ на промените в нивата на остеокалцин след проведена суплементация с витамин К2.**

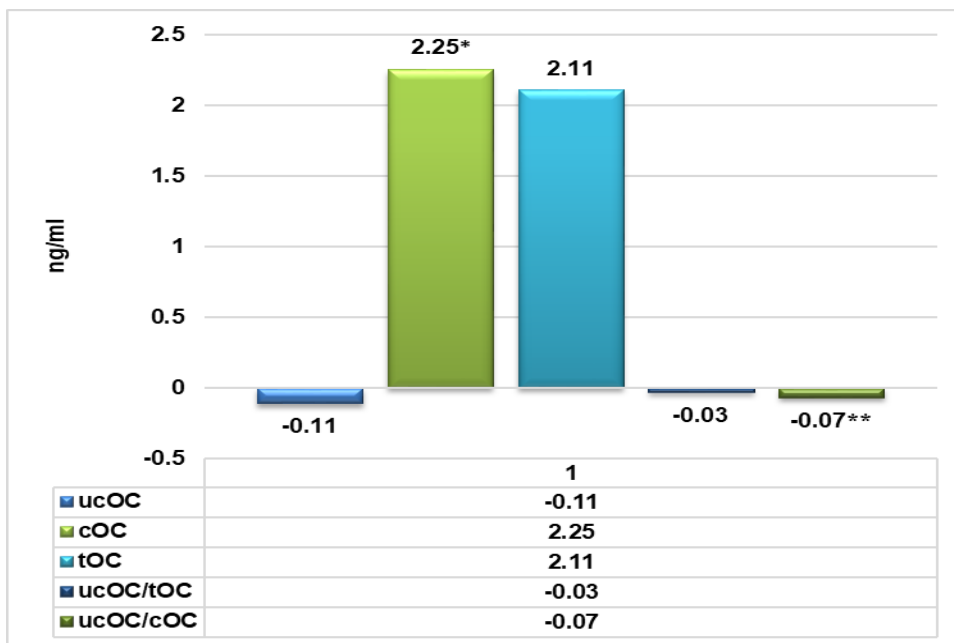
Сравнението на резултатите показва, че средните стойности на сОС са по-високи след провеждането на едномесечна суплементация с витамин К2, като нарастването е от  $8.16 \pm 2.11$  ng/ml на  $10.34 \pm 3.05$  ng/ml. За съотношението ucОС/tОС установихме намаляване от  $0.33 \pm 0.14$  ng/ml на  $0.29 \pm 0.22$  ng/ml. Значимостта на постигнатите разлики в техните серумни нива оценихме с paired t-тест. Резултатите показват значимост на промяната в посока повишение на серумните концентрации на сОС ( $t = -2.53$ ;  $p = 0.02$ ). Макар и дискретно намаляване се наблюдава в нивата на ucОС/tОС след суплементацията, което е от теоритична гледна точка очаквано да настъпи, но в случая не достига статистическа значимост ( $p = 0.26$ ).

**Таблица 30.** Сравнителен анализ на средните стойности на сОС и ucОС/tОС преди и след проведената суплементация (paired t-тест).

Преди/след суплементация		Средна ст. ± станд.откл.	p	95% CI, граници	
				Долна	Горна
сОС, ng/ml	преди вит.К2	8.08±2.06	0.02	-4.02	-0.33
	след вит.К2	10.3±2.9			
ucОС/tОС	преди вит.К2	0.33±0.14	0.26	-0.04	0.13
	след вит.К2	0.28±0.21			

Промените в серумните концентрации на останалите форми на остеокалцин оценихме с теста на Man-Whitney. Наблюдавахме намаляване на нивата на ucОС след проведената суплементация. Разликата в средните ранкове при ucОС и tОС са статистически незначими ( $p = 0.82$ , респективно  $p = 0.08$ ). За съотношението ucОС/сОС получихме статистическа значимост на промяната след суплементация ( $p = 0.05$ ) (диаграма 11).

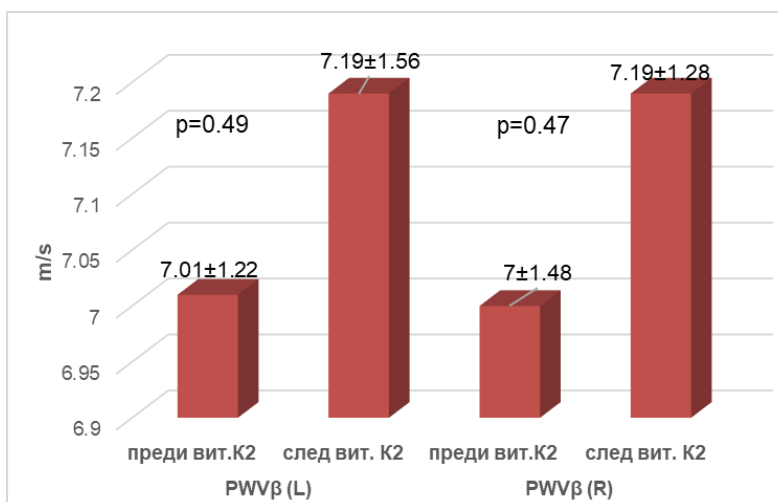
**Диаграма 11.** Графично изобразяване на промяната в серумните нива на остеокалцин, след суплементация с витамин К2 (\*  $p = 0.02$ ; \*\*  $p = 0.05$ )



➤ **Сравнително представяне на ЕТ показателите преди и след суплементацията с витамин К2.**

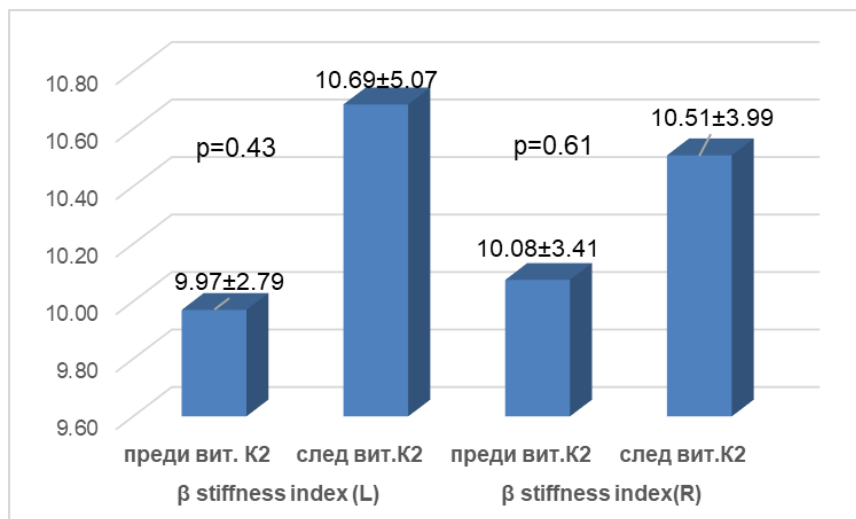
Наблюдавахме повишение на средните стойности PWV $\beta$  (L) от 7.01 на 7.19 m/sec, както и на PWV $\beta$  (R) от 7.00 на 7.19 m/sec. При проведения paired t-тест не се открива значимост на разликите настъпили след суплементация с витамин К2 (диаграма 12).

**Диаграма 12.** Сравнително представяне на стойностите на PWV $\beta$ (R) и (L) преди и след суплементация с витамин К2 при пациенти с Т2ЗД (paired t-тест).



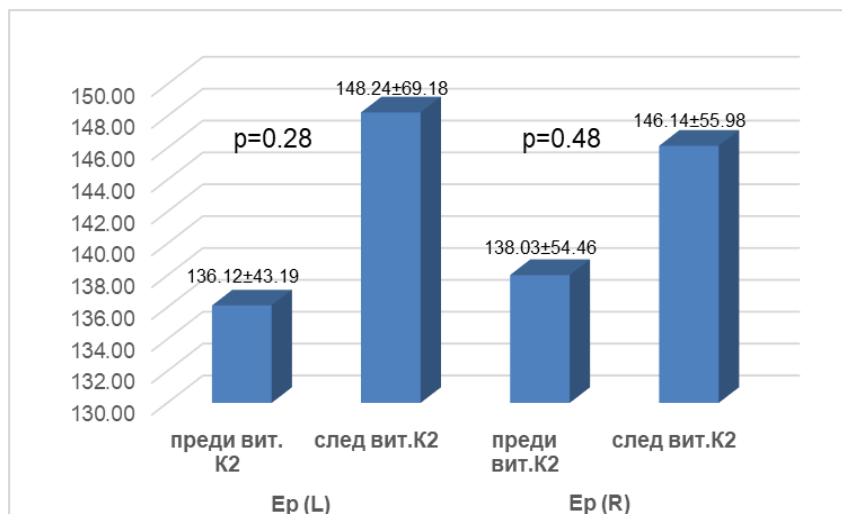
Промените в средните стойности на  $\beta$ -stiffness index следват същата посока на леко повишение при лява и дясна АСС (диаграма 13).

**Диаграма 13.** Сравнително представяне на стойностите на  $\beta$ -stiffness index (R) и (L) преди и след суплементация с витамин К2 при пациенти с Т23Д.



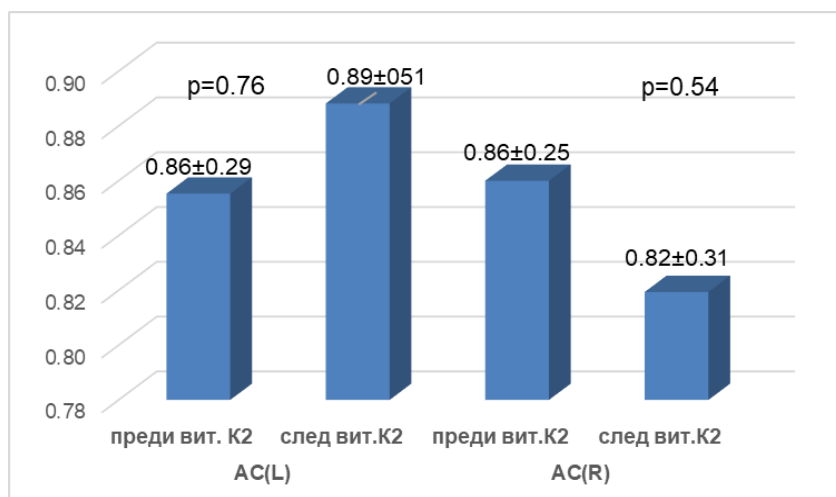
Повишение откриваме и при Ер на лява и дясна АСС. След проведения paired t-тест, обаче така установените разлики в ехографските параметри не достигнаха статистическа значимост (диаграма 14).

**Диаграма 14.** Сравнително представяне на стойностите на Ер (R) и (L) преди и след суплементация с витамин К2 при пациенти с Т23Д.



Измерванията на АС, показаха разнопосочни стойности, като повишение показва АС измерен на лява АСС, а понижение АС измерен на дясна АСС, отново без достигане на значимост на промяната (диаграма 15).

**Диаграма 15.** Сравнително представяне на стойностите на АС (R) и (L) преди и след суплементация с витамин К2 при пациенти с Т23Д (paired t-тест).



Потърсихме промяна в стойностите на хемодинамичните показатели преди и след суплементацията с витамин К2, поради тяхното теоретично влияние върху параметрите на АР. Всички показаха слаба тенденция на повишение като най-голямо открихме при CASP от 119 на 126 mmHg, което достигна статистическа значимост ( $t=-2.7$ ;  $p=0.01$ ). Сърдечната честота след един месец суплементация показва по-ниски стойности, но без те да достигат значимост (таблица 31).

**Таблица 31.** Сравнителен анализ на хемодинамичните показатели на пациентите с Т23Д провели суплементация с витамин К2 (paired t-тест).

Хемодинамични параметри преди/следа Vit. K2		Средна ст. ± станд.откл.	p	95% CI, граници	
				долна	горна
CASP	Преди	119.85±12.19	0.02	-12.62	-1.38
	След	126.84±11.42			
САН	Преди	127.55±13.1	0.10	-9.27	0.93
	След	131.72±12.9			
ДАН	Преди	78.55±8.7	0.19	-7.57	1.68
	След	81.5±7.4			
ПН	Преди	48.83±11.9	0.62	-7.33	4.55
	След	50.22±13.1			
Ср. АН	Преди	94.78±8.8	0.08	-7.30	0.44
	След	98.21±7.37			
СЧ	Преди	74.06±11.2	0.11	-1.00	8.78
	След	70.16±8.7			

## VI ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Анализ на характеристиките на изследваната група.

Идеята за настоящото проучване се породи от съществуващия научен интерес, към откриването и утвърждаването на нови съдови биомаркери при диагностицирането на субклиничната атеросклероза. Те биха помогнали заедно с вече известните традиционни рискови фактори за по-точното определяне на индивидуалния сърдечно-съдов риск, при пациенти с Т2ЗД. Друг аспект е и интереса към биологичното действие на витамин К2 и по-точно на витамин К-зависимите протеини, сред които е и остеокалцинът. Последните научни данни го определят като хормон действащ на ниво кост, глюкозна регулация и съдова хомеостаза.

В нашето проучване включихме пациенти с Т2ЗД, които нямат анамнеза за симптоматично или документирано атеросклеротично съдово заболяване, на средна възраст  $57.7 \pm 7.4$  год, с почти еднакво полово разпределение (52% жени и 48% мъже). Средната давност на диабета в

изследваната група беше  $6.75 \pm 6.3$  години, като 26% от пациентите бяха случаи на новодиагностицирано заболяване, а при 25% давността беше под 5 год. Половината от пациентите съобщаваха за липса на настъпили усложнения на диабета до момента на включване в изследването. Средната възраст на лицата в проучването е сходна с изнесените в литературата данни за проведени измервания на PWV при пациенти с Т2ЗД. По анамнестични данни жените с Т2ЗД са с настъпила менопауза и не провеждат хормонозаместителна терапия. Атеросклеротичните промени по съдовете, макар че започват още в ранна възраст, стават симптоматични след 5-та декада, а протекцията на женския пол осигурена от естрогените не се наблюдава, когато е налице съпътстващ Т2ЗД.

Измерените антропометрични показатели в изследваната група показаха очаквано по-високи стойности на ИТМ и КО спрямо контролите ( $p=0.05$ ,  $p=0.01$ ), което е част от съпътстващото диабета затлъстяване. Международната група по проблемите на затлъстяването (IOTF) дефинира наличие на наднормено тегло при европейската раса при  $ИТМ > 25 \text{ kg/m}^2$ , а затлъстяване при  $ИТМ > 30 \text{ kg/m}^2$ . Висцерално затлъстяване за европейската раса се приема при  $КО \geq 94 \text{ cm}$  за мъже и  $\geq 80 \text{ cm}$  за жени (IDF, 2005). Световните данни докладват 85.2% честота на наднормено тегло и затлъстяване при лица с Т2ЗД (183). Нашите резултати показват по-висока честота на наднормено тегло и затлъстяване, определена чрез ИТМ - 90%. Честотата на абдоминалното затлъстяване в изследваната група, достига дори по-високи стойности - 93%. За сравнение с данните за общата популация на Европейската асоциация за изучаване на затлъстяването (EASO, 2014) честотата на наднормено тегло и затлъстяване сред българското население възлиза на 58.2%.

При проведения анализ не открихме връзка между ИТМ и показателите на ригидност на каротидната артерия. Корелационна зависимост, обаче наблюдавахме между измерената КО и  $PWV\beta$  (R) ( $r=0.25$ ;  $p=0.01$ ). От останалите ET показатели, значими положителни корелации с КО открихме при  $E_p$  (R) ( $r=0.23$ ;  $p=0.02$ ) и  $\beta$ -stiffness index (R) ( $r=0.22$ ;  $p=0.02$ ) и отрицателна корелация с AI (R) ( $r=-0.21$ ;  $p=0.04$ ). При лявата АСС установихме единствено корелация с  $E_p(L)$  ( $r=0.27$ ;  $p=0.007$ ). Потърсихме дали съществува връзка между абдоминалното затлъстяване и ригидността на каротидната артерия при пациентите с Т2ЗД, когато използваме съотношението талия/ръст. Такава значима връзка се разкри както при  $PWV\beta$  (R) ( $r=0.22$ ;  $p=0.02$ ), така и при  $PWV\beta$  (L) ( $r=0.25$ ;  $p=0.01$ ). Редица автори считат, че съотношението талия/ръст е с по-добра предиктивна стойност за сърдечно-съдови събития сравнено с КО, тъй като преодолява недостатъка на последната свързано с влиянието на ръстта. Стойността на съотношението  $> 0.5$  е определена като



гранична, над която се наблюдава увеличение на метаболитния и сърдечно-съдовия риск. Анализирайки данните от нашата кохорта се вижда, че 94% от пациентите с T23Д имат абдоминално затлъстяване, установено чрез повишено съотношение талия/ръст  $>0.5$ , което корелира и с повишени стойности на PWV $\beta$  на двете артерии, и следователно с повишена локална каротидна ригидност.

Изследваната група показва средни стойности и стандартно отклонение на гликирания хемоглобин -  $9.1 \pm 2.4\%$ . Този лош гликемичен контрол свързваме с факта, че пациентите са хоспитализирани по повод T23Д или друго остро или хронично обострено заболяване, което е довело до декомпенсация. Установихме корелационна връзка на гликирания хемоглобин и стойностите на PWV $\beta$  (R) и PWV $\beta$ (L) при анализ проведен общо за групата на пациентите с T23Д и контроли. Ferreira и сътр. изследват ролята на гликемичния контрол върху cf-PWV при пациенти с T23Д и установяват, че стойности на HbA1c  $>7.5\%$  се свързват с двукратно по-висок риск за повишена cf-PWV. Според Ferreira, добрия гликемичен контрол, намалението на АН и СЧ са сред най-важните детерминанти за намаляване на прогресията на аортната ригидност при T23Д (184).

Не установихме връзка на средната стойност на ПГГ с ехографски измерените показатели на АР посредством ехотракинг. Нашите данни са подобни на тези докладвани от някои автори и в противовес с други. Fang и сътр. докладват липса на връзка между ПГГ и показателите на АР, измерени чрез ba-PWV (47). По-голям брой публикации обаче сочат за наличие на връзка между плазмената глюкоза и АР. Davies и съавт. изследват влиянието на показателите на глюкозния метаболизъм и откриват значима връзка между НГГ, НГТ и T23Д с показателите на АР, посредством измерване на cf-PWV (52). Натрупаната научна информация обхваща измерването на АР по различни техники и на различни артериални зони, като липсват данни за корелации с показателите на въглехидратната обмяна и ехотракинг базираното измерване на PWV $\beta$ . Проведеното от нас проучване за първи път в България докладва резултати за АР при T23Д. Ролята на хипергликемията за развитие на диабетната макроваскуларна болест понастоящем повечето автори считат за дискутабилна (54).

По отношение на нивата на липидните показатели - общ холестерол, триглицериди, HDL-C, LDL-C между изследваната и контролната група не открихме статистически значими разлики. Вероятно причината за липсата на такива е провежданото стандартно статиново лечение при пациентите с T23Д като прави впечатление, че средните стойности на LDL  $3.0 \pm 1.1$  са по-високи от препоръчаните при пациенти с висок сърдечно-съдов риск. Наблюдавахме

характерната за Т23Д констелация от повишени триглицериди и нисък HDL-C. Наличните данни в литературата относно връзката на липидите, затлъстяването и AP са неубедителни. Нашето изследване, подобно на други, не открива връзка между липидните показатели и PWV $\beta$ , измерена чрез ET. Установихме слаба отрицателна корелация на HDL-C с AC в дясно ( $r=-0.2$ ;  $p=0.05$ ) и AC в ляво ( $r=-0.25$ ;  $p=0.01$ ). Възможно обяснение за това е провежданата статинова терапия в групата на пациентите с Т23Д, която би повлияла на стойностите на HDL-C в посока повишение. Бразилско проучване установява връзка на cf-PWV с нивата на триглицеридите. Друго прочуване установява корелация между PWV $\beta$  и HDL-C при двата пола, с LDL-C при мъжкия пол и TG при женския пол (185). Тези и нашите данни предполагат по-значително участие на HDL-C, сравнено с LDL-C в развитието на AP при лица с Т23Д.

Известно е, че тютюнопушенето е сред традиционните сърдечно-съдови рискови фактори, имащо отношение и към съдовото здраве. В изследваната от нас група пушачите са 46%, а в контролната 40%, като тази разлика се оказва незначима при проведения непараметричен анализ ( $X^2= 0.33$ ,  $p= 0.56$ ). Открихме слаба корелация на тютюнопушенето с PWV $\beta$  измерена и на двете каротидни артерии при изследваните лица от двете групи. При многофакторния регресионен анализ тютюнопушенето сигнификантно и независимо корелира с PWV $\beta$ (L). Подобни данни докладват и други автори. Zhang и сътр. откриват значимо повишаване на AC и намаляване на PWV, Ер,  $\beta$ -stiffness индекс две години след спиране на тютюнопушенето (186).

Артериалната хипертония е сред традиционните сърдечно-съдови рискови фактори и по-литературни данни е по-честа при лицата с Т23Д като честотата ѝ се увеличава с напредването на възрастта. В систематичен преглед Colosia и сътр. докладват честота на съпътстваща ХБ при пациенти с Т23Д в диапазона 51.4-95% при европейска популация (187). В нашето проучване честотата на ХБ е 84% при пациентите с Т23Д, а при контролите 56.7%, а проведения тест кростабулация и  $X^2$ -квадрат показаха по-голяма вероятност за наличието на ХБ в групата на пациентите с Т23Д ( $X^2= 9.98$ ,  $p= 0.002$ ).

## **2. Анализ на резултатите от ехотракинг измерените показатели на AP на каротидните артерии.**

Артериалната ригидност е физична величина, която пряко зависи от компонентите на артериалното налягане. Поради това в нашето изследване пациенти с неконтролирана ХБ не бяха включени. Измерените САН, ДАН, ПН, ср.АН, CASP и СЧ показаха по-високи стойности в групата на Т23Д, но

разликите с контролите не достигнаха статистическа значимост. Това направи измерването на AP за двете групи при равни условия по отношение на артериалното налягане. Измерванията проведехме двустранно, на двете каротидни артерии, поради теоритичната възможност за различни резултати. Това произтича от факта, че двете артерии не са индентични от анатомична гледна точка. Тези наши предположения се потвърждават и от публикувани данни за по-високи стойности на ИМТ измерени на дясната ACC, сравнено с лявата (188). Dzeko и сътр. също докладват, че cf-PWV, измерена посредством Shygmocor показва по-високи стойности, когато е измерена на дясна ACC (189). В нашето проучване, подобно на горепосочените данни, измерихме по-високи средни стойности на PWV $\beta$  в дясно  $7.42 \pm 1.33$  m/s, спрямо тези на PWV $\beta$  в ляво  $7.37 \pm 1.32$  m/s. При контролната група наблюдавахме същата тенденция на по-висока стойност на PWV $\beta$  (R)  $6.43 \pm 1.11$  m/s, спрямо PWV $\beta$  (L)  $6.37 \pm 0.94$  m/s. Публикувани данни за директното сравняване на PWV $\beta$ , измерена чрез ET двустранно в каротидните зони, на този етап не са ни известни. Установените от нас разлики на PWV $\beta$  в ляво-дясно не достигнаха статистическа значимост, и при двете групи ( $p=0.57$ , респективно  $p=0.8$ ). Проведените последващи корелационни анализи установяват по-многобройни връзки на PWV $\beta$  измерена на дясна ACC с ехографски и хемодинамични показатели, сравнено с тези измерени на лявата.

Скоростта на пулсовата вълна е основния ехотракинг параметър, който при cut-off  $>6.65$  m/s е маркер за повишена AP. Получените от нас данни за средните числови стойности на PWV $\beta$  на пациентите с Т23Д показаха статистически значими разлики както за PWV $\beta$  (R) ( $p=0.001$ ), така и за PWV $\beta$  (L) ( $p=0.001$ ), спрямо здравите контроли. Alvim и сътр. в проучване проведено сред бразилска популация установяват по-високи стойности на cf-PWV при лица с Т23Д, независимо от наличието или липсата на артериална хипертония (95). Множество проучвания изследват cf-PWV при различни високорискови кохорти, като такива с хронична бъбречна недостатъчност, КБС, като придружаващ Т23Д са имали само част от изследваните лица. Захарният диабет недвусмислено се свързва с ускорена съдова увреда и като такъв бива изключен от повечето анализи. За разлика от измерването на AP с апланационна тонометрия (cf-PWV), данните получени с ET методика (PWV $\beta$ ) са оскъдни при лица с Т23Д. Нашето проучване освен за PWV $\beta$  установява сигнификантни разлики между Т23Д и здравите контроли при всички измерени чрез ET параметри на каротидна ригидност:  $E_p$ ,  $\beta$ -stiffness, AC(L), AI(R). Изключение правят само AC(R) и AI (L) при които не се установи сигнификантност. Повишените стойности на ехотракинг показателите дават информация за повишена артериална ригидност в групата на пациентите с

T23Д. Тези пациенти са с повишен риск от развитие на последващи макроваскуларни усложнения.

Корелационният анализ разкри много силна позитивна връзка между PWV $\beta$  (R) и Ер ( $r=0.97$ ;  $p=0.001$ ) и между PWV $\beta$  (R) и  $\beta$ -stiffness индекса ( $r=0.93$ ;  $p=0.001$ ) и силна отрицателна корелация между PWV $\beta$  (R) с АС ( $r=-0.71$ ;  $p=0.001$ ). Такива зависимости не открихме при лявата АСС.

Параметърът  $\beta$ -stiffness индекс е естествен логаритъм от съотношението систолно/диастолно налягане, отнесено към относителната промяна на съдовия диаметър. Той е независим от артериалното налягане при индивиди без артериална хипертония. В нашата изследвана група средният  $\beta$ -stiffness индекс (R) е статистически значимо по-висок спрямо контролите ( $p=0.001$ ). Корелационният анализ показва положителна връзка на  $\beta$ -stiffness индекс (L) с AI ( $r=0.24$ ;  $p=0.01$ ) и силна отрицателна връзка с артериалния къмплайънс АС ( $r=-0.60$ ;  $p=0.001$ ), измерени на същата артерия. Измереният, чрез ET на дясна АСС,  $\beta$ -stiffness индекс показва някои различия. При него установихме много силна корелационна връзка с PWV $\beta$  ( $r=0.93$ ;  $p=0.001$ ) и Ер ( $r=0.71$ ;  $p=0.001$ ). Подобно на лявата АСС, между  $\beta$ -stiffness индекс и АС съществува обратна корелация ( $r=-0.64$ ;  $p=0.001$ ).

В нашето проучване установихме и редица корелационни връзки между хемодинамичните и ехографските показатели. САН показва значима положителна корелация с Ер и отрицателна с АС. Само за дясна АСС, значима корелация на САН, установихме с PWV $\beta$  ( $p=0.001$ ) и AI ( $p=0.04$ ). Действително, от една страна, повишеното САН води до по-голям стрес за съдовата стена и спомага за развитие на AP, а от друга AP води до повишена PWV и по-ранно връщане на отразената вълна в асцендентната аорта и така повишава САН и намалява ДАН. За разлика от САН, при ДАН не откриваме връзка с ехографските параметри при дясна АСС. За лявата установихме значима отрицателна връзка между ДАН и  $\beta$ -stiffness индекса ( $p=0.02$ ). Тези резултати са в съгласие с други автори, които докладват връзка на ниските стойности на ДАН и развитието на AP при възрастни пациенти (190).

Между ПН и всички ехографски показатели установихме значителни корелационни връзки и за двете артерии, като изключение прави само AI. За PWV, Ер,  $\beta$ -stiffness индекс те са положителни (за всички  $p=0.001$ ), а за АС са отрицателни ( $p=0.0007$ ). Известно е, че ПН и AP се увеличават със стареенето на артериите. Тази забележителна връзка на ПН с AP може да се обясни с това, че с повишаването на ригидността на артериите отразената вълна се връща в аортата по-рано в началото на систолата причинява изолирана систолна хипертония и увеличение на ПН. Редица доклади съобщават ролята на ПН

като независим предиктор за ССЗ и сърдечно-съдова смъртност (191). В проучването Hoorn, ПН при пациенти с Т23Д се асоциирало с висок сърдечно-съдов риск. Всяко повишение на ПН с 10 mmHg увеличавало релативния риск (RR 1.27), дори след стратификация на другите рискови фактори (192). В нашето проучване, след многофакторния регресионен анализ единствено ПН от всички хемодинамични параметри, показва независима корелационна връзка с PWV $\beta$  (L), PWV $\beta$  (R),  $\beta$ -stiffness index (L) и  $\beta$ -stiffness index (R).

Модулът на еластична деформация (Er) е чувствителен към ефекта на пулсовото налягане. Бета-stiffness индексът като логаритъм от съотношението систолно/диастолно налягане, е относително независима от налягането величина (193). Това обяснава защо средното АН значително корелира с PWV и Er, но не и с  $\beta$ -stiffness. В изследваната от нас група с Т23Д средното АН показва значими корелации с PWV $\beta$  и Er двустранно, но не и с  $\beta$ -stiffness индекса.

Сърдечната честота е рутинен показател от клиничната практика, като в някои студии се докладва нейната връзка с AP. В нашата извадка ние установихме обратна корелационна зависимост между СЧ и AI (L и R) и AC (L). Връзка между AP и СЧ е възможно да се дължи на намаляване на еластинното съдържание в съдовата стена с времето, при увеличен брой сърдечни контракции, на които е изложено съдовото русло. От друга страна, повишаването на СЧ се свързва с повишена активност на симпатиковата нервна система, което по различни механизми би могло да индуцира повишаване на ригидността.

Известно е, че CASP е по-силно свързан с атеросклерозата показател от брахиалното АН. CASP физиологично е с по-високи стойности от САН. В нашето проучване CASP показва същите корелационни зависимости с ET показателите като САН за дясна ACC. Така, CASP значимо позитивно корелира с PWV $\beta$  (p=0.01), Er (p=0.01), AI (p=0.02) и значимо отрицателно с AC (p=0.05). За лявата ACC открихме положителна корелация на CASP с PWV $\beta$  (p=0.04) и отрицателна с AC (p=0.007). Скорошен доклад на Theilade показва връзка на CASP със ССЗ и развитието на микроалбуминурия при пациенти с Т13Д, като е налице стъпаловидно покачване на риска с увеличението на CASP (194).

Известно е, че абдоминалното затлъстяване се съчетава с нарушения във въглехидратния метаболизъм. С нарастване на обиколката на талията и съотношението талия/ръст на пациентите в групата на Т23Д наблюдавахме и сигнификантно повишаване на болшинството от показателите на AP –PWV $\beta$  (R) (p=0.01),  $\beta$ -stiffness индекс (R) (p=0.02), Er (R) (p=0.02), Er (L) (p=0.007) и

AI (R) ( $p=0.04$ ). Такава зависимост между абдоминалното затлъстяване и каротидната ригидност не наблюдавахме в контролната група.

Възрастта е сред главните физиологични детерминанти за увеличаване на ригидността на артериалната стена при здрави лица. При нашата кохорта от лица с Т23Д, наблюдавахме корелационна връзка на възрастта с  $PWV\beta$  (R) ( $p=0.002$ ), но не и за  $PWV\beta$  (L). Субанализът, при който пациентите с Т23Д са разпределени в три възрастови групи, разкри разлики между тях. Така статистически значима разлика в стойностите на  $PWV\beta$ , измерена отново на дясна АСС, установихме между най-младата и най-възрастната група ( $p=0.02$ ). Възрастта показва връзка и с  $Er$  (R) ( $p=0.001$ ) и  $Er$  (L) ( $p=0.003$ ). Много проучвания докладват нелинейно повишаване на  $PWV$  с възрастта, като акцелерация се наблюдава след 5-тата декада (195). Framingham Heart Study също показва повишаване на  $AP$  с напредване на възрастта. Повишаването на  $PWV$  води и до повишаване на  $CC$  риск и това се наблюдава както при хипертензивни, така и при нехипертензивни лица (196). Данните от нашето проучване получени чрез методиката ехотракинг потвърждават, че  $AP$  се увеличава с напредване на възрастта при пациентите с Т23Д, подобно на данните в литературата получени при използването на други методики, като апланационната тонометрия.

Въз основа на множеството статистически значими корелации на параметрите на  $AP$  с различните горепосочени показатели проведохме многофакторен регресионен анализ. Той показва независима корелация на каротидната ригидност при пациенти с Т23Д с  $САН$ ,  $ПН$ ,  $\beta$ -stiffness индекс,  $Er$  и  $АС$ , когато за зависима променлива е използвана  $PWV\beta$  (R). Със стойностите на  $PWV\beta$  (L) сигнификантна независима корелация имаха  $СASP$ ,  $ПН$ ,  $Ср. АН$  и тютюнопушенето. Когато за зависима променлива използвахме  $\beta$ -stiffness индекс значими корелации се наблюдаваха при  $САН$ ,  $ПН$ ,  $Er$  както и с нивата на карбоксилирания остеокалцин. Така можем да обобщим, че  $САН$ ,  $ПН$ ,  $ср.АН$ , тютюнопушенето, както и с  $ОС$  са сред най-важните детерминанти водещи до повишаване на каротидната ригидност при пациенти с Т23Д.

### **3. Обсъждане на резултатите от изследваните серумни нива на остеокалцин.**

Данните за серумните нива на  $ОС$ , получени при нашето изследване, показваха по-ниски средни стойности за карбоксилираната му форма -  $cOC$   $7.84\pm 2.41$  ng/ml при пациентите с Т23Д, спрямо тези при контролите  $10.05\pm 4.37$  ng/ml, като тази разлика беше статистически значима ( $p=0.01$ ).

Същата тенденция за по-ниски стойности при лицата с Т2ЗД наблюдавахме, както за ucOC  $3.81 \pm 5.2$  ng/ml ( $p=0.08$ ), така и за tOC  $11.64 \pm 5.24$  ng/ml ( $p=0.07$ ), но без да достигат значимост спрямо контролите. Това би могло да се дължи на неголемия брой изследвани пациенти ( $n=47$ ) и при увеличаване на броя на изследваните лица, значимост биха достигнали и ucOC и tOC. Нашите данни кореспондират с Dawod и сътр., които докладват по-ниски нива на ucOC и tOC при пациенти с Т2ЗД.

Важно е да се отбележи, че болшинството от изследванията на ОС при хора не използват ELISA методиката и следователно не различават отделните форми, а дават обобщена информация за нивата на tOC. Данните от различни проучвания посочват ниските нива на tOC като рисков фактор за развитието на инсулинова резистентност, метаболитен синдром и Т2ЗД (129). Няколко студии свързват ниските стойности на tOC и ucOC с повишен риск за развитие на захарен диабет (137) (141) (142). Kanazawa и сътр. установяват повишаване на стойностите на tOC при пациенти с известен и лекуван диабет след един месец оптимизация на антидиабетната терапия.

В корелационен анализ не установихме връзка между серумните нива на ucOC и cOC. Поотделно обаче и двете форми корелираха с tOC. За ucOC тази корелация е много силна ( $r=0.82$ ;  $p=0.001$ ), докато за cOC е по-скоро слаба ( $r=0.29$ ;  $p=0.04$ ). Booth и съавт. установяват силна корелация между абсолютните стойности на концентрациите на ucOC и tOC, докато изразени в проценти такава корелация не се наблюдавала (122).

Ролята на ucOC остава дискутабилна по отношение на въглехидратния метаболизъм. Нашето проучване не установи корелации на ПГГ, HbA1c с различните форми на ОС. Докладваните данни за връзката на ucOC с плазмената глюкоза, HbA1c и мастната маса от едни автори не се потвърждават от други (144). Sanchez-Enriquez и сътр. откриват по-ниски нива на ucOC при Т2ЗД спрямо здрави контроли, както и отрицателна корелация с ИТМ, позитивна корелация с ДАН (197). Изследване, проведено при 2966 мъже без остеопороза, установява, че по-високите стойности на ucOC се свързват с намален риск за диабет (OR 0.64) (25).

Изследваните от нас жени с Т2ЗД показаха статистически значимо по-ниски стойности на cOC спрямо контролите жени ( $p=0.02$ ). Възможна причина за тази разлика е отпадането на ефекта на естрогените и увеличението костен търновър при жени в настъпила менопауза, каквато е нашата изследвана група. Пациентките нямат установена остеопороза и не приемат хормонозаместителна терапия. Съществуваполова разлика в метаболитния ефект на ОС при хора. Ниските циркулиращи нива на ОС е по-вероятно да са

свързани с хипергликемия и хиперинсулинемия при жени, отколкото при мъже (119).

Като хормон, ОС освен въглехидратната обмяна, повлиява липидния и енергийния метаболизъм. В тази насока потърсихме корелации с общия холестерол, HDL-C, LDL-C и TG. Такава установихме за HDL-C. Най-силна положителна корелационна връзка HDL-C имаше с tOC ( $p=0.008$ ) и ucOC ( $p=0.05$ ). Корелация между HDL-C и cOC също се наблюдава общо за двете изследвани групи ( $r=0.3$ ;  $p=0.01$ ). Общият холестерол установихме, че корелира единствено с tOC ( $r=0.3$ ;  $p=0.04$ ) в групата на лицата с T23Д. За разлика от опитите с животински модели, които показват участие на ucOC в липидния метаболизъм, данните при хора са твърде оскъдни. Alfadda и сътр. установяват сигнификантна позитивна корелация между ucOC и HDL и негативна между tOC и TG.

Знае се, че остеокалцинът увеличава секрецията на адипонектин. Пациентите с T23Д от своя страна се характеризират с абдоминално затлъстяване и ниски стойности на адипонектин. В нашата изследвана група, установихме отрицателни корелации на BMI с cOC ( $r=-0.32$ ;  $p=0.007$ ), с обиколката на талията ( $r=-0.4$ ;  $p=0.0009$ ) и съотношението талия/ръст ( $r=-0.39$ ;  $p=0.005$ ). Отрицателна корелация с обиколката на талията показва и tOC ( $r=-0.27$ ;  $p=0.02$ ).

Хипотезата за връзката на ОС с атеросклерозата и развитието на AP е обект на научен интерес през последните години. Millar и сътр. публикуват метаанализ на проучвания, търсещи връзка на ОС с атеросклерозата, резултатите от който показват голяма разнопосочност (163). Нашето проучване имаше за цел да потърси връзка на нивата на ОС с показателите на AP. Такава значима положителна корелация наблюдавахме единствено между cOC и  $\beta$ -stiffness индекса (R) ( $r=0.31$ ;  $p=0.03$ ) и между него и Ер (R) ( $r=0.29$ ;  $p=0.05$ ). След провеждането на многофакторен регесионен анализ тази връзката между  $\beta$ -stiffness индекс (R) и cOC остава значима и независима ( $B=-0.32$ ;  $p=0.04$ ). При лявата АСС обратна корелация се намери между съотношението ucOC/cOC и AI ( $p=0.02$ ). Данните за връзка на ОС с cf-PWV, като основен параметър на AP са много малко, предимно при пациенти на хроничен диализ. Csiky и съавт. в свое проучване при пациенти на хроничен диализ, откриват значима отрицателна корелация на ОС с cf-PWV и аугментационния индекс (AI) (198).

Проучвания, включващи изследване на връзката на ОС с PWV $\beta$ , измерена чрез ET методика по наше знание, към този момент не са известни.



#### 4. Обсъждане на резултатите от проведената суплементация с витамин К2.

В нашето изследване след проведената суплементация с витамин К2 наблюдавахме промяна в средните стойности на  $ucOC$  в посока намаляване от 4.2 на 4.09 ng/ml ( $p=0.26$ ). Серумните нива на  $cOC$  показаха обратна тенденция на повишение спрямо изходните си нива преди приема на витамин К2 (МК-7) от 8.08 ng/ml на 10.33 ng/ml, което достигна статистическа значимост ( $p=0.02$ ). Тоталният остеокалцин също повиши нивата си от 12.2 на 14.4 ng/ml, но тази промяна не достигна значимост ( $p=0.08$ ). Получените от нас резултати са в съгласие с биологичното действие на витамин К2. Той действа като кофактор на карбоксилазата, която превръща некарбоксилираната форма на остеокалцин ( $ucOC$ ) в карбоксилирана ( $cOC$ ). Така  $ucOC$  се увеличава при дефицит на витамин К2 и се намалява при витамин К2 суплементация. Като цяло проучванията показват разнопосочни данни за повишаване, намаляване или неутралност на  $tOC$  след прием на витамин К2. Теоретично витамин К2 променя съотношенията между карбоксилираната и некарбоксилираната форма и не би трябвало да има ефект върху нивата на  $tOC$ . Повишаването на серумните нива на  $tOC$  под влияние на витамин К2, би могло да се обясни с повишаване на остеобластната активност. В тази връзка в нашата изследвана група съотношенията показаха намаляване в числовите си стойности след суплементацията. За  $ucOC/tOC$  тази промяна не беше значима ( $p=0.26$ ), докато при  $ucOC/cOC$  се достигна значимост ( $p=0.05$ ).

Както бе посочено по-горе,  $ucOC$  корелира с  $tOC$ . Изразяването на  $ucOC$  като процент от  $tOC$ , според някои автори обаче, може по-адекватно да отрази витамин К статуса, сравнено с абсолютната стойност на  $ucOC$ . Така  $ucOC >20\%$  се счита за показател за дефицит на витамин К2. В нашата изследвана група изходно е налице недостиг на витамин К2 -  $ucOC$  е 34.1% от тоталния остеокалцин. След проведената суплементация отчитаме, че дефицитът е намалял на 28%, но все още процентът на  $ucOC$  не е достигнал до норма. Като причина за това отчитаме краткия период на проведената суплементация. Проучвания включващи оценка на  $OC$  след суплементация с витамин К2, са налични главно за пациенти на хроничен диализ, поради известната им склоност към съдова калцификация. При болшинството от тях е установен висок процент на  $ucOC$ , израз на витамин К дефицит (199).

Некарбоксилираният остеокалцин се счита за хормон. Той действа на ниво бета клетка на панкреаса и стимулира инсулиновата секреция. Освен това под негово действие се повишава адипонектинът секретирани от мастната

тъкан и така се подобрява инсулиновата чувствителност. След приложението на витамин К2 и последващо намаляване на нивата на ucOC теоретично очакваме влошаване на въглехидратния метаболизъм. Такива резултати на практика не са наблюдавани и описани в литературата. Yoshima и съавт. прилагат суплементация с витамин К за период от три години и така намаляват нивата на ucOC. Едновременно с това установяват протективен ефект срещу прогресията на ИР при мъже (200). Choi и сътр. провеждат суплементация с витамин К2 (МК-4) 30 mg за 4 седмици отчитат намаляване на ucOC, без промяна в глюкозните нива (201). Суплементация с витамин К2 (МК-4) - 45mg продължила 36 мес. също отчита намаление на ucOC, без промяна в глюкозния метаболизъм (202).

След установените промени на биохимично ниво в различните форми на ОС и техните концентрации от проведената суплементация потърсихме разлики и при функционалните ехографски показатели на АР. Известно е, че повишаването на tOC се свързва с позитивни ефекти върху артериалната стена. В скорошно проучване на постменопаузални жени ниските нива на tOC се свързвали с риск за развитие на бъдещ Т23Д и негативно корелирали с ba-PWV и каротидната ИМТ (141). Fulton и сътр. публикуват резултати за проведена суплементация с витамин К2 под формата на МК 7 в доза 100 µg дневно за 6 мес. при възрастни пациенти с анамнеза за ССЗ. Те установяват подобрене в ендотелната функция, оценена с флоу-медирана вазодилатация на брахиалната артерия и ba-PWV, макар и разликите да не са достигнали значимост (203). Kurnatowska и сътр. провеждат суплементация с МК-7 с 90 µg за период от 9 мес при пациенти с ХБЗ 3-5 степен и установяват сигнификантно по-ниска каротидна ИМТ и значимо намаление на tOC (204).

Кнареп и сътр. провеждат суплементация с витамин К2 (МК-7) 180 µg дневно за 36 месеца при здрави постменопаузални жени и докладва подобрене в показателите на АР, измерени чрез cf-PWV и чрез локална PWV (205). Еластичните свойства на каротидната артерия в отговор на МК-7 се подобряват, но само при тези жени, които изходно са били с висок  $\beta$ -stiffness индекс на каротидната артерия. В нашата изследвана група на пациенти с Т23Д провели суплементация с 75 µg дневно витамин К2 (МК-7) отчитаме повишаване на средните стойности на всички ЕТ показатели, измерени на лява АСС. Така PWV $\beta$  повишава от 7.01 на 7.19 m/s, а  $\beta$ -stiffness index от 9.97 на 10.69. Най-голямо повишение откриваме при Ер от 136.12 на 148.2, следвано от АІ от 9.82 на 12.65. След проведенния paired t-тест тези разлики не бяха значими. Дясната АСС показва аналогична тенденция на повишаване на показателите на АР. Отново при проведеният paired t-тест не открихме значимост на тези разликите. Тези наши резултати са в противовес на

докладваните от Кпареп и сътр., но проведената от тях суплементация е за значително по-дълъг период и въпреки това установява значими разлики само в  $\beta$ -stiffness индекса. Данните от скоросен систематичен анализ на Lees и сътр., публикуван през 2018 г за ефекта от суплементацията с витамин К2 върху АР, показват значителна редукция на ucOC, докато промените в АР не достигат значимост (206). На този етап липсват данни от интервенционални проучвания за оценка ефекта на витамин К2 върху съдови крайни цели. Също така много малък е броят на проучванията, които използват cf-PWV или локалната PWV за оценка на ефектите на витамин К2.

Една от възможните причини за повишаването на ЕТ показателите в посока увеличена АР при нашето проучване е краткият период на суплементация, през който е възможно още да не са налице настъпили функционални промени в съдовете. Друга причина потърсихме в хемодинамичните показатели. От проведения анализ установихме повишаване на средните стойности на CASP (+5mmHg), САН (+4.1mmHg), ДАН (+2.9mmHg), ПН (+1.4mmHg) и ср. АН(+3.4mmHg) след суплементацията. Статистически значимо повишение се отчете само при CASP ( $p=0.01$ ). Така влошеният контрол на АН, би могъл да обясни повишаването на АР. На този етап не са много ясни причините, които биха могли да доведат до по-лошия контрол на АН, както и дали те имат връзка с витамин К2 суплементацията. Streit и сътр. изследват пациенти с артериална хипертония, като част от тях са получавали варфарин (антагонист на  $\gamma$ -карбоксилазата, намаляващ действието на витамин К) и установяват, че пациентите на антикоагулант имат по-ниско САН и ДАН. Lim проследява 116 пациенти с диабет, лекувани с варфарин за 36 мес и не установява промяна в АН. Някои полиморфизми на гена на витамин К епоксид редуктаза комплекс субединица 1 (VKCOR1) са открити при хипертензивни пациенти и се свързват с повишен риск за развитие на есенциална хипертония (207). Епоксид редуктазата участва в цикъла на витамин К и води до неговото рециклиране и така повишава концентрацията му. Като друга причина за влошаването на АН и тенденцията към по-високи стойности на ЕТ-показателите, би могло да се обсъжда и влошен кмплайънс на пациентите по отношение на антихипертензивната терапия след дехоспитализацията.

## **VII. ИЗВОДИ**

1. Пациентите с Т23Д имат значимо повишена локална АР на каротидните артерии, изразено чрез по-високи стойности на PWV $\beta$ , Ер и  $\beta$ -stiffness индекс и по-ниски АС и АІ, спрямо здрави контроли
2. Артериалната ригидност при пациентите с Т23Д се повишава с напредване на възрастта.
3. С увеличаването на обиколката на талията, при пациентите с Т23Д, се наблюдава значимо нарастване на стойностите на PWV $\beta$ , Ер и  $\beta$ -stiffness индекс. По-високото съотношение талия/ръст при тях се свързва с повишена каротидна PWV $\beta$ .
4. Нивата HDL показват обратна корелационна зависимост с артериалния къмплайънс, и позитивна зависимост със серумните нива на ucOC и tOC в групата на пациентите с Т23Д
5. По-високите стойности на гликирания хемоглобин се свързват със значимо по-висока каротидна PWV $\beta$  в изследваните групи.
6. CASP, ПН, Ср.АН и тютюнопушенето независимо корелират с PWV $\beta$ (L), а САН и ПН независимо корелират с PWV $\beta$  (R) при пациентите с Т23Д.
7. Пулсовото налягане при пациентите с Т23Д, сигнификантно и независимо корелира с PWV $\beta$  (R), PWV $\beta$ (L),  $\beta$ -stiffness index (R) и  $\beta$ -stiffness index (L).
8. Серумните концентрации на cOC, ucOC и tOC при пациентите с Т23Д са по-ниски спрямо контролите, като за cOC тази разлика е значима.
9. Карбоксилираният остеокалцин положително и независимо корелира  $\beta$ -stiffness index (R).
10. Карбоксилираният остеокалцин значимо повишава серумните си концентрации след четири седмична суплементация витамин К2.
11. При пациентите с Т23Д провели суплементация с витамин К2 се наблюдава тенденция за повишение на хемодинамичните показатели и ET параметрите на АР. Значимост на тези промени се достигна при CASP.

## **VIII. ПРИНОСИ**

### **1. Приноси с научно-теоритичен характер**

1. За първи път в България се измерва артериална ригидност при пациенти с Т23Д посредством ехотракинг методика

2. За първи път в България се изследва остеокалцин, като маркер за артериална ригидност при пациенти с Т23Д
3. За първи път в България се провежда интервенционално проучване търсещо промяна на каротидната ригидност след суплементация с витамин К2 при пациенти с Т23Д.

## **2. Приноси с научно-практичен характер**

- Определянето на повишената каротидна ригидност, чрез ехографската методика ехотракинг при пациенти с Т23Д, е неинвазивно, бързо и надеждно и подходящо за клиничната практика.
- Ранна диагноза на етап субклинична съдова увреда би позволила вземането на навременни терапевтични решения с цел намаляване на сърдечно-съдовите усложнения при пациентите с Т23Д.
- Независимо, че липсват статистически значими разлики в  $PWV\beta$  измерена на лява и дясна АСС, при дясната се установяват по-голям брой корелационни зависимости, което я определя като по-подходяща за провеждане на изследването.

## **3. Приноси с потвърдителен характер**

4.  $PWV$  нараства с напредване на възрастта
5. Тоталният и некарбоксилирания остеокалцин са в по-ниски концентрации при пациенти с Т23Д.

## **IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Проведеното проучване установява повишени стойности  $PWV\beta$  при изследваните пациенти с Т23Д, без проява на атеросклеротична съдова болест спрямо здрави контроли. Разкрива повишени стойности на  $\beta$ -stiffness индекса, еластичния модул и намалени аугментационния индекс и артериалния къмплайънс. Известно е, че  $AP$  нараства при здрави лица с напредване на възрастта, като тази тенденция се наблюдава и при нашите пациенти с диабет. Между различните  $ET$  показатели се откриват значителни корелационни връзки, но основния параметър за ригидност остава  $PWV$ . Различията при измерванията на  $PWV$  проведени на лява и дясна каротидна артерия са незначителни, но съществуват по-голям брой корелационни зависимости при дясна АСС. Това би следвало да се има предвид за клиничната практика.

Очерта се връзка между стойностите на  $HDL$  и повишената ригидност. С повишаването на показателите на абдоминално затлъстяване като талия и съотношението талия/ръст нараства  $PWV$  на двете каротидни артерии и следователно и сърдечно-съдовия риск при изследваните лица. Наблюдава се сигнификантна корелационна връзка на стойностите на гликирания

хемоглобин и PWV $\beta$ . Не се откри корелация с нивата на плазмена глюкоза на гладно, което е в съгласие с известния в науката факт, че макроваскуларните усложнения започват преди диагностицирането на диабета и преди развитието на хипергликемията.

С нарастването на CASP, както и на САН, ДАН и ПН измерени на брахиалната артерия се повишават и PWV, Ер,  $\beta$ -stiffness индекс, AI, и намалява артериалния кълмплайънс. Сърдечната честота показва обратна корелация с аугментационния индекс. Тези данни подкрепят важността от корекция и таргетен контрол не само на кръвната захар, но и на артериалното налягане, липидния профил и абдоминалното затлъстяване при индивидуалния подход свързан с пациентите с T23Д.

Остеокалцинът като хормон замесен в регулацията на въглехидратната хомеостаза, показва по-ниски стойности на всичките си форми при пациентите с T23Д, като значимост постигна само сОС. По отношение на съдовата функция положителна корелация отново единствено показва сОС с  $\beta$ -stiffness index (R) и Ер (R). Въпреки че едномесечната суплементация с витамин К2 доведе до значително повишаване на серумните концентрации на сОС, това не се отрази положително на ЕТ показателите и хемодинамичните параметри, които показаха макар и незначителна тенденция към увеличение. Това би могло да се дължи на генетични и молекулярни механизми в който участва витамин К2, имащи отношение към артериалното налягане или на един влошен пациентски кълмплайънс, което още веднъж подкрепя важността на превенцията. Превенция на ниво рискови фактори, ранна съдова увреда, и подкрепа на активното участие на пациента в намаляването на сърдечно-съдовия му риск. Веднъж диагностицирана повишената АР при пациентите с T23Д, тя се определя като нетрадиционен рисков фактор, независим от останалите СС рискови фактори.

Захарният диабет е сред социално-значимите заболявания, а настъпването на усложненията му водят до преждевременна смърт или влошено качество на живот. Знае се, че макроваскуларните усложнения на диабета започват много рано в хода на заболяването и изграждането на превантивни стратегии е от особена важност. Една от тези стратегии е измерването на артериалната ригидност посредством ехотракинг.

## **Х. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.**

### **Публикации:**

Е. Маринова, М.Бояджиева, Бр. Каназирев. Артериална ригидност и тип 2 захарен диабет. Наука кардиология; 2020 (3), 5-9

Marinova E., Boyadzhieva M., Hvarchanova N., Kanazirev B. Type 2 diabetes mellitus is associated with increased arterial stiffness measured by echo-tracking method. Scripta Scientifica Medica, 2020 Vol 52 Online first

Marinova E. Ultrasound measurement of local arterial stiffness through one-point echo-tracking technique. Varna Medical Forum. Vol 9. 2020, 41-45

### **Участия в научни конференции:**

Vitamin K2 and its role in diabetic macrovascular complications. E. Marinova, B. Kanazirev, M. Boyadzhieva, Y. Bocheva. 29<sup>th</sup> Annual Assembly of international medical association Bulgaria 9-12 may 2019 Resort Golden Sands

Biological effects of vitamin K2. E. Marinova, B. Kanazirev, M. Boyadzhieva, L. Stoyanova. Poster. 29<sup>th</sup> Annual Assembly of international medical association Bulgaria 9-12 may 2019 Resort Golden Sands

## **Благодарности**

На научните ми ръководители, проф. д-р Б. Каназирев, д.м. и доц. д-р М. Бояджиева, д.м. за подкрепата, насоките и идеите за това проучване.

На проф. д-р К. Христозов, д.м., за подкрепата и съдействието.

На гл. ас д-р С. Ганчева, д.м за прецизното лабораторно изследване проведено в катедрата по Фармакология, клинична фармакология и терапия, МУ-Варна

На гл.ас.С. Николова, за статистическата обработка на данните.

На медицинските сестри от клиниката по ВБ и клиниката по Ендокринология УМБАЛ „Св. Марина“

На колегите от Клиниката по вътрешни болести

На инж. Хр. Симеонов

На семейството ми