

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА
КАТЕДРА „ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ“

Д-Р АСПАРУХ ГЕОРГИЕВ НИКОЛОВ

**КЛИНИКО-ИМУНОЛОГИЧНА ВРЪЗКА МЕЖДУ
ПРОМЕНЕТЕ В ОБМЯНАТА НА ЕЛАСТИН И КОЛАГЕН
ТИП IV И СЪДОВИТЕ УВРЕЖДАНЯ ПРИ БОЛНИ СЪС
ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ
БЕЗ ОРГАНИ УСЛОЖНЕНИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН 'ДОКТОР'

ПЛЕВЕН
2014

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-ПЛЕВЕН

КАТЕДРА „ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ“

Д-Р АСПАРУХ ГЕОРГИЕВ НИКОЛОВ

**КЛИНИКО-ИМУНОЛОГИЧНА ВРЪЗКА МЕЖДУ
ПРОМЕНТЕ В ОБМЯНАТА НА ЕЛАСТИН И КОЛАГЕН
ТИП IV И СЪДОВИТЕ УВРЕЖДАНЯ ПРИ БОЛНИ СЪС
ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ
БЕЗ ОРГАНИ УСЛОЖНЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

ЗА ПРИСЪЖДАНЕ ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН 'ДОКТОР'
ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „КАРДИОЛОГИЯ“, ШИФЪР 03.01.47

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ: ДОЦ. Д-Р ИВАН ЦИНЛИКОВ ДМ

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ

Проф. Д-р Здравко Каменов

Проф. Д-р Федя Николов

ПЛЕВЕН
2014

Изследванията по дисертацията са извършени в Клиника по Вътрешни болести и Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“ към Медицински Университет-Плевен

Дисертационният труд съдържа 142 машинописни страници, 15 таблици и 21 фигури. Литературната справка включва 188 заглавия от които на 13 на кирилица и 175 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра „ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ“, Факултет медицина, Медицински Университет-Плевен.

Дисертантът работи като асистент в катедра „ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ“ на Медицински Университет-Плевен в Клиника по Вътрешни болести „УМБАЛ- Д-р Георги Странски“ ЕАД гр. Плевен.

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на 29.04. 2014 от 12:00 часа в зала „Амброаз Парев“ МУ Плевен ул. „Св. Климент Охридски“ 1

Материалите по защитата са на разположение на сайта на МУ-Плевен www.mu-pleven.bg

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение.....	7
II. Цел и задачи.....	11
III. Материал.....	12
IV. Методи на изследване.....	14
IV.1 Клиничен метод-анамнеза и физикален статус.....	14
IV. 2 Лабораторни методи.....	15
IV. 3 Изолиране на еластин за имунологични изследвания.....	17
IV. 4 Аминокиселинен анализ на еластина.....	17
IV. 5 Получаване на водно-солеви екстракти.....	17
IV.6 Получаване на имунни серуми.....	17
IV. 7 Абсорбиране на имунните серуми.....	18
IV.8 Клинични параметри.....	18
IV.9 Имунологични методи за изследване на еластин и колаген.....	19
1. Метод за определяне на серумните ЕДП и КИВДП при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония.....	19
2. Метод за определяне на серумните анти-еластинови антитела (IgG, IgM, IgA) при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония.....	19
3. Метод за изследване на несвързаните анти-еластинови IgG антитела (free AEAbs).....	20
4. Метод за определяне на серумни анти-КИВ антитела (IgG, IgM и IgA) при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония.....	21
5. Метод за изследване на антитела срещу късните продукти на неензимното гликиране (анти-AGEs антитела).....	22
6. Метод за проучване на серумните AGE-ЕДП при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония.....	23
IV.10 Статистически методи.....	25
V. Резултати.....	27
V.1 Резултати от определяне на серумните ЕДП и КИВДП при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония.....	27
V. 2 Резултати от проучване на серумните анти-еластинови антитела(IgG, IgM, IgA).....	29
V. 3 Резултати от определянето на несвързани анти-еластинови IgG антитела.....	35
V. 4 Резултати от изследване на серумни анти-КИВ антитела (IgG, IgM и IgA).....	37
V. 5 Резултати от проучването на антитела срещу късните продукти на неензимното гликиране (анти-AGEs антитела).....	44
V. 6 Резултати от проучването на серумни AGE-еластин деградационни пептиди (AGE-ЕДП).....	46
VI. Обсъждане.....	48
VII. Изводи.....	63
VIII. Приноси.....	64
IX. Публикации във връзка с дисертационния труд.....	66
X. Научни съобщения във връзка с дисертационният труд.....	67

Използвани съкращения

1. **IDF**- International Diabetes Federation
2. **AEAbs**- анти-еластинови антитела
3. **AGEs**- късни продукти на неензимното гликиране
4. **α -еластин**- алфа-еластин
5. **ELISA**- ензим-свързана имуносорбентна проба
6. **IgA**- имуноглобулин от клас A
7. **IgG**- имуноглобулин от клас G
8. **IgM**- имуноглобулин от клас M
9. **ЕДП**- еластинови деградационни пептиди
10. **KIVДП**- колаген тип IV деградационни пептиди
11. **ЦИК**- циркулиращи имунни комплекси
12. **ММП**- матриксни металпротеази
13. **СЗО**- световна здравна организация
14. **IgG1, IgG2, IgG3, IgG4**- субкласове 1,2,3 и 4 на IgG
15. **ЕЦМ**- екстрацелуларен матрикс
16. **ММС**- моноцит-макрофагналната система
17. **БМ**- базална мембрана
18. **ВСДМ**- възрастово-свързана дегенерация на макулата
19. **ММ-12**- макрофагна металоеластаза 12
20. **РИМ**- радиоимунни методи
21. **РПХА**- реакция пасивна хемоаглутинация
22. **СЛЕ**- системен лупус еритематозус
23. **ПАП**-реакция- реакция пероксидаза-антипероксидаза
24. **к-еластин**- капа-еластин
25. **ПЕГ**- полиетиленгликол
26. **AER**- ниво на албуминова екскреция
27. **CIF**- комплемент инхибиращ фактор
28. **T2ЗД**- втори тип захарен диабет
29. **АХ**- артериална хипертония
30. **Анти-KIV Abs**- анти-колагенови тип IV антитела
31. **PCRs**- полимеразно-верижна реакция
32. **AGE-ЕДП**- AGE-еластинови деградационни пептиди
33. **free AEAbs**- несвързани анти-еластинови антитела

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет, наред със сърдечно-съдовите и онкологичните заболявания, влиза в триадата "болести на века", засягащи милиони хора и явяващи се най-честа причина за инвалидност и смърт в наше време. Броят на болните от диабет в света през 2003г. е около 171 млн. и техният брой значително нараства като Международната диабетна федерация (IDF) изчислява, че до 2030 година болните ще са приблизително 366 млн (IDF, 2003). Интересен е фактът, че през 2013 година IDF изнася данни, че в 2012 година, повече от 371 млн. пациенти имат захарен диабет- *Epidemiology and prevalence of diabetes mellitus worldwide; Atlas of diabetes mellitus 2012 update IDF 2013* [1]. Това е показателно за темповете на нарастване на заболяването в целият свят. Нещо повече-половината от болните от диабет са недиагностицирани, като годишно умират 4,8 млн хора с диабет.

Артериалната хипертония остава един от най-сериозните проблеми на здравоопазването на съвременния човек. Тя е най-мощният рисков фактор за повишен риск за коронарен инцидент. В България 64% от смъртните случаи са в следствие на сърдечносъдови заболявания, като страната е сред десетте с най-висока смъртност от ОМИ. Броят на пациентите с АХ е около 1 500 000.

АХ се среща по-често сред пациентите с тип 2 захарен диабет, отколкото сред хората от общата популация Drury PL, 1983 [2a]. Ранните клинични проучвания предполагат силна връзка между хипертонията и диабета Pacy PJ et al, 1985 [2b] Данните от тези проучвания, особено при хоспитализации в диабетни клиники показват, че 70% от пациентите с диабет на възраст имат артериална хипертония като придружаващо заболяване Lago et al, 2007 [3]. Хипертонията при диабетици се среща приблизително два пъти по-често отколкото при хората без диабет.

Изключително важно е, че хипертонията при пациентите с диабет води до сигнификантно повишение на риска за развитие на съдови увреждания при тази популация, а заедно двете състояния предразполагат към хронична бъбречна недостатъчност Wannamethee SG et al., 2005 [4].

Развитието на хроничните микроваскуларни усложнения започва след около 5-10 години от началото на диабета, когато те се проявяват в своите начални функционални и до голяма степен реверзиблени стадии. Ако не се предприемат своевременно терапевтични мерки, съдовите увреждания неотклонно прогресират и водят до инвалидизиране на болните.

Хипертонията или високото артериално налягане засяга около 600 млн. хора по целият свят. Артериалната хипертония се среща приблизително два пъти по-често при

пациентите със захарен диабет в сравнение с популацията без диабет: on behalf of the American Society of Hypertension Writing Group, The journal of clinical hypertension Bakris G et al., 2008 [36a]. Това подкрепя доказателството, че хипертонията свързана с диабет представлява рисков фактор за увреждане както на големите, така и на малките съдове Moser M, 2005 [36b].

Артериалната хипертония е едно от най-разпространените и социално значими заболявания в света. Въпреки че, до момента има множество данни за патогенезата на процеса, малко информация е налична относно ролята на имунната система в аспекта на съдовите лезии при пациентите със захарен диабет тип 2. Продължителността на живота при пациенти с артериална хипертония е значително намалена Barnett AN et al 1994.

Застъпването на артериалната хипертония със захарен диабет значимо повишава риска за исхемична цереброваскуларна болест, ретинопатия и сексуална дисфункция Najarian RM et al. 2006 [38]. Захарният диабет е независим рисков фактор за коронарна артериална болест, а рискът значително се повишава когато е налице и хипертония.

Ето защо трябва обърнем повече внимание на групата от диабетици с артериална хипертония, като се фокусираме не само върху двете заболявания поотделно, а отбележим, че при тяхното едновременно протичане общият кардиоваскуларен риск се повишава значително.

Съединителнотъканните протеинни компоненти- еластин и колаген са основни структурни елементи на артериалната стена и играят важна роля в съдовата функция както в норма, така и при патологични процеси. Съществуват данни, че структурните увреждания на тези елементи на екстрацелуларния матрикс играят важна роля в развитието на артериалните увреждания. Артериалната хипертония е свързана с намаление на съдовия еластичитет, увеличена съдова ригидност и абнормално повишение на отношението колаген/еластин. Това води до променено съдово съдържание на протеините еластин и колаген тип IV. В резултат на тези деградационни процеси, протичащи в екстрацелуларния матрикс, в серума се освобождават разтворими еластинови и колагенови пептиди, които се появяват в циркулацията.

Серумните нива на тези деградационни продукти оказват влияние както върху еластиновия, така и върху колагеновия метаболизъм, защото циркулиращите еластинови и колагенови пептиди имат имуногенни свойства и индуцират продукцията на специфични антитела: анти-еластинови и анти-колагенови антитела. Тези антитела могат да реагират с антигенните детерминанти на изменените еластинови и колагенни

фибри, като по този начин се формират антиген-антитяло комплекси *in situ* G. Nicoloff et al..

Етиологията на артериалната хипертония свързана с диабета, е непълно изяснена и проучена, като допълнително затруднение за това може да представлява факта, че патогенезата вероятно се различава при двата типа захарен диабет.

Чрез имунологични методи може да се съди за активността на еластиновата и колагеновата обмяна. Поради това, започнахме проучвания в нашата лаборатория, при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония.

Предвид тежестта на усложненията предизвикани от увреждането на съдовете при пациентите със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония са необходими методи за неинвазивна диагностика на микроваскуларните изменения при тази група от пациенти, които може да бъдат използвани както с прогностична стойност, така и за ранна и адекватна терапевтична намеса.

Обмяната на еластина и колаген тип IV при пациентите със ЗДТ2, все още не е добре проучена и резултатите се непоследователни и неубедителни. Еластиновият, колаген тип I и III и IV търновер е изследван поотделно при диабетици или при хипертоници, но при пациенти със ЗДТ2 и АХ обмяната на тези базалномембранны протеини да момента не са проучени. Известно е, че при пациентите със ЗД са ускорени процесите на еластинова и колагенова тип IV деградация и намалени тези на синтеза, докато при артериална хипертония- колагеновата тип I и III (типични за миокарда) синтеза е ускорена, а разграждането- забавено Laviades C . При пациентите с АХ до момента няма последователни изследвания за обмяната на ниво микроциркулация на типичния за малките артериални съдове колаген тип IV.

Едновременното наличие на ЗДТ2 и АХ значително дисбалансира ЕЦМ обмен и води до по-интензивно и усилено ремоделиране на съдовата стена. Предвид тежестта на усложненията предизвикани от увреждането на съдовете при пациентите със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония са необходими по-детайлни проучвания върху обмяната на съдовите протеинни еластин и колаген тип IV при тази високорискова група пациенти.

Обект на настоящият дисертационен труд са уврежданията на малките кръвоносни съдове (микроангиопатия) при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония без органични усложнения. Поради това изследвахме основните маркери характеризиращи еластиновата и колагеновата тип IV обмяна.

Изводи, мотивиращи целта и задачите:

1. Хроничните усложнения на захарният диабет тип 2 водят началото си твърде рано, а интервениране в ранните им стадии е от съществено значение за тяхната профилактика.
2. Застъпването на артериалната хипертония със захарен диабет значитимо повишава риска за исхемична цереброваскуларна болест, ретинопатия и ренална дисфункция.
3. Микроваскуларните компликации на диабета протичащ с хипертония, са значително по-чести, тежки и обширни в сравнение с диабета, без хипертония. Въпреки че, до момента има множество данни за патогенезата на микроваскуларните компликации, малко информация е налична относно ролята на имунната система.
4. Хипертонията е най-честото коморбидно заболяване при диабетичите в сравнение с общата популация и засяга приблизително 75% от пациентите със ЗДТ2.
5. Захарният диабет е независим рисков фактор за коронарна артериална болест, а рискът значително се повишава когато е налице и хипертония.
6. При пациенти със ЗДТ2 и АХ обмяната на базалномембранните протеини еластин и колаген тип IV до момента не са проучени.
7. Едновременното наличие на ЗДТ2 и АХ значително дисбалансира ЕЦМ обмен и води до по-интензивно и усилено ремоделиране на съдовата стена. Ето защо са необходими по-детайлни проучвания върху обмяната на съдовите протеинни еластин и колаген тип IV при тази високорискова група пациенти.
8. Предвид тежестта на усложненията предизвикани от увреждането на съдовете при пациентите със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония са необходими методи за неинвазивна диагностика на микроваскуларните изменения, които може да бъдат използвани както с прогностична стойност, така и за ранна и адекватна терапевтична намеса.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на изследването:

Основна цел на настоящата работа е да се проследят възможностите за преценка на съдовите увреждания чрез установяване вероятната корелация между серумните нива на матриксните протеини (еластин и колаген тип IV) и наличието на микроангиопатия при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония без органни усложнения.

За изпълнение на тази цел си поставихме следните задачи:

Задачи на изследването:

1. Определяне на серумните нива на еластин деградационни пептиди (ЕДП)
2. Определяне на серумните нива на колаген тип IV деградационни пептиди (К IVДП)
3. Определяне на серумните анти-еластинови антитела (IgG, IgM, IgA) при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония
4. Разработване на метод за определяне на несвързаните в имунни комплекси (свободни) анти-еластинови IgG антитела.
5. Определяне на анти-KIV антитела (IgG, IgM, IgA) при пациенти със захарен диабет тип 2 и есенциална хипертония
6. Изследване на антитела срещу AGEs
7. Проучване на серумните нива на гликиран еластин (AGE-ЕДП)

III. МАТЕРИАЛ

- *Антигени*

-Колаген - човешки плацентарен, тип IV /по SIGMA тип VIII, X, VI и IX/, производство на SIGMA CHEMICAL CO., USA

-С оглед тестиране специфичността на имунните серуми са използвани и разтворим алфа еластин, фибронектин и ламинин, производство на SIGMA CHEMICAL CO., USA и човешки албумин Difco Lab., USA. Антигенни препарати от човешки еластин. Материал за подготовка и приготвяне на еластинови антигени бе взет от аорта, бял дроб, черен дроб и слезка от индивиди, загинали при злополука. Антигени за доказване специфичността на серумите.

Използвани бяха водно-солеви екстракти от различни органи и тъкани на индивиди, загинали при злополука. Екстрактите бяха приготвени от следните органи: аорта, сърце, бял дроб, слезка, чер дроб, мозък, тестис, бъбрек, тимус, кожа и напречно набразден мускул.

- *Човешки серуми*

За контроли са използвани човешки серуми на 42 клинично здрави субекти, средна възраст $58,9 \pm 7,56$. Подбрани са индивиди, наследствено необременени с артериална хипертония, захарен диабет и атеросклероза. Без възпалителни процеси, склеродерма, ревматоиден артрит, системен lupus erythematosus, недиференцирани колагенози, хипертония, емфизем и да не са преболедували от хепатит. Техните рутинни параклинични изследвания, липидограма и серумни белтъци са без промени, а ЕКГ е нормална.

Освен клинически здравите лица са изследвани и 93 пациенти със захарен диабет тип 2 и неусложнена артериална хипертония, средна възраст $61,4 \pm 11,3$ и продължителност на захарният диабет тип 2: $9,88 \pm 3,12$ и артериална хипертония $9,28 \pm 4,98$ от региона на Медицински Университет гр. Плевен.

План за изследване на еластинов и колагенов метаболизъм при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония без усложнения

1. Да се идентифицират пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония без усложнения на таргетни органи
2. Идентифицираните диабетици да се разпределят в две групи:
Група 1 - които имат съдови увреждания
Група 2- без съдови увреждания
3. Да се изследват и проследят за период от една година маркери на съдова дисфункция – крайни продукти на гликирането (AGEs), AGE-ЕДП анти-AGEs антители; антиеластинови и антиколагенови IgG, IgM, IgA, несвързани еластинови IgG, ЕДП и КIVДП
4. Да се оцени контрола на захарния диабет чрез изследване нивото на HbA1c.
5. Да се изследва липидният профил: тотален холестерол, HDL, LDL, Триглицериди

Клиничен контингент

За периода октомври- 2011 до май 2012 от пациенти на региона на УМБАЛ „Г.Странски“; МУ- Плевен обяха подбрани 93 лица отговарящи на включващите и без изключващи критерии. Избрана бе и контролна група състояща се от 42 лица. Доброволното участие на всички изследвани лица е удостоверено с писмено информирано съгласие. Подбраните лица от основната група спазват следните включващи и изключващи критерии:

Включващи критерии:

- Възраст от 18 до 65г.
- Наличие на захарен диабет тип 2 по критериите на СЗО от 2006г.
- Наличие на артериална хипертония без орган усложнения по критериите на СЗО от 2009г.
- Подписано информирано съгласие одобрено от Етичната комисия към УМБАЛ „Г.Странски“ и МУ- Плевен

Изключващи критерии:

- Активен възпалителен процес
- Наследствено необременени с артериална хипертония
- Склеродерма
- Ревматоиден артрит
- Системен лупус еритематодес
- Недиференцирани колагенози
- Бъбречна недостатъчност
- Вторична артериална хипертония
- Бременност
- Доказана неоплазма
- Чернодробна недостатъчност
- Други ендокринологични нарушения
- Отказ да подпише информирано съгласие

Критерии за подбора на контролната група: Всички лица на възраст от 18до 65г., подписали информирано съгласие без захарен диабет тип 2 и артериална хипертония и нямащи изключващи критерии.

Лицата от основната група са разпределени в две подгрупи, в зависимост от наличието (Група 1); (n=67) или отсъствието (Група 2); (n=26) на съдови увреждания.

IV. МЕТОДИ

IV. 1 Клиничен метод-анамнеза и физикален статус

На всички лица бе снета подробна анамнеза за наличието на субективни оплаквания, сърдечно-съдови рискови фактори, придружаващи заболявания и терапия.

Анамнестични данни за наличие на захарен диабет: тип, давност, лечение, наличие на съдови усложнения.

Анамнестични данни за наличие на артериална хипертония: давност, максимално установявани стойности на артериалното налягане, провеждано лечение.

Осъществен бе физикален преглед състоящ се в:

-Измерване на ръста с ръстомер

-Измерване на телното с медицинска теглилка

-Измерване на артериално налягане според препоръките на СЗО: след десетминутен покой в седнало положение с маншет на мишницата. Използван е стандартен ръчен сфигмоманометър с разлика до 2mmHg. Направени са 3 измервания с 2 минутен интервал между тях. За референтна се приема средната стойност. Измерванията се правят на двете ръце, като за референтна се приема по-високата стойност.

-Всичките пациенти с диабет са изследвани от един и същи офталмолог чрез офталмоскопия на разширени зеници

-Гликираният хемоглобин беше измерен чрез използването на високо афинитетна течна хроматография (нормални граници 4-6%).

-За установяване на плазмената глюкоза, кръвта беше събрана в епруветки с гликолитичен инхибитор, и анализирана в рамките на 3-4 h в централна лаборатория чрез глюкозо-оксидазния метод GOD-PAP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) с Hitachi 705 автоанализатор (Boehringer Mannheim).

-Общият серумен холестерол и концентрациите на триглицеридите бяха измерени чрез ензимен анализ (Boehringer Mannheim).

-AER беше определена чрез нефелометрия използвайки кит съдържащ специфично анти тяло (Behringwerke, Marburg, Germany).

-Блокираща ELISA беше използвана за откриване на антитела срещу продуктите на късното гликиране (anti-AGE).

-Осъществяване на електрокардиография

IV. 2 Лабораторни методи

За получаване на неразтворим еластин приложихме метода на Barnard за екстрахиране чрез автоклавиране и обработка с гореща 0,1 нормална натриева основа, при което повечето от нееластиновите примеси хидролизират. Неразтворимият остатък бе изсушен с метанол/етер и смлян на фин прах. Така полученият продукт бе използван за получаването на разтворим алфа-еластин. За целта предпочетохме метода на Partridge, тъй като полученият по този начин еластин е характеризирани сравнително най-добре в биохимично и имунологично отношение. За солубилизирането на неразтворимия еластин използвахме третиране с 0,25 М оксалова киселина при висока температура. Полученият материал бе диализиран срещу дестилирана вода и концентрацията му бе доведена до желаното белтъчно съдържание чрез разреждане или чрез хипертонична диализа с ПЕГ 20 000.

Особено важен етап от получаването на еластинов антиген бе определянето на чистотата на получените еластинови препарати. При посочените сурови условия на обработка би могло да се очаква само известно замърсяване на препаратите с алкално разтворими фракции на колагена и някои високо устойчиви гликопротеини. Поради това трябваше да се изключи присъствието на последните в получените екстракти.

При решаване на поставените в дисертацията цели най-напред бе необходимо да се изолира достатъчно чист еластин, който да е подходящ за имунологични изследвания. Пречистването му се улеснява от неговата висока неразтворимост при сурови условия. При нашето изследване избрахме алфа-еластина, тъй като той е добре характеризирани, сравнително лесно се получава и според Mecham, Lange съдържа адекватно представителство на антигенни детерминанти от неразтворимия еластин. Този метод е доста груб, но при него се получава сравнително най-чист еластинов продукт. При проведеното тестване за определяне чистотата на получените еластинови препарати не установихме наличие на доловими количества колаген и гликопротеини. Получените данни ни дават основание да смятаме с голяма вероятност, че изолираният протеин е действително еластин.

-Тестиране за наличие на гликопротеини

За да се изключи наличието на гликопротеини бе използван методът на Trevelyan, Harrison за доказване на хектози. Този тест показва, че екстрактите не съдържат хектози, а следователно и гликопротеини или мукополизахариди.

-Тестиране чрез полиакриламидна електрофореза

При този опит също се доказва липсата на колагенови примеси в получените екстракти.

-Получаване на имунни серуми срещу еластин

Получихме високотитърни имунни серуми срещу еластин в млади овни и в отделни случаи в зайци. За определяне титъра на получените имунни серуми приложихме следните имунологични методи: реакция пасивна хемоаглутинация (РПХА) и ензим-свързана имуносорбентна проба (ELISA). Същите методи бяха използвани и за определяне имуноспецифичността на получените антиеластинови антитела. При това в нито един от случаите не бе наблюдавана реакция. Следователно имунните серуми не реагират с водно-солево-екстрахируемите компоненти на посочените органи, използвани за изолиране на еластин. Същите имунни серуми бяха тествани и с водно-солеви екстракти на различни органи на здрав индивид, загинал при злополука, посочени в раздела "Материал и методи". Отново в нито един от приложените три имунологични методи не бе наблюдавана реакция, докато тестирането при същите условия показва изразена реакция с хомоложните антигени. При тестирането на всички получени антиеластинови имунни серуми със стандартните колагенови препарати (посочени в раздела "Материал и методи") в нито един от приложените методи не бе наблюдавана реакция, което показва, че получените имунни серуми не реагират с колагени. Получените резултати говорят, че приложените имунологични методи не показват кръстосана реактивност на имунните серуми, а следователно получените от нас антиеластинови серуми в този случай, при тези условия, се проявяват като специфични спрямо еластин.

IV. 3 Изолитране на еластин за имунологични изследвания:

-Изолитране на алфа-еластин от аорта, бял дроб, чер дроб и слезка на човек

IV. 4 Аминокиселинен анализ на еластина

Неразтворимият еластин (1mg в 1ml вряща HCl на постоянна температура) беше хидролизиран на 110 C за 24h в херметически затворени стъклени епруветки под налягане на N₂. Беше извършен аминокиселинен анализ с помоща на Beckman 119 C1.

IV. 5 Получаване на водно-солеви екстракти

Водно-солеви екстракти бяха получени от посочените в раздела ‚материали‘ органи по следния начин:

Взетият материал се промива няколкократно с физиологичен разтвор и се хомогенизира в двоен обем от същия. Получените хомогенати няколкократно се замразяват и размразяват в продължение на 7 денонощия, центрофугират се на 6 000 g след което се отдела супернатантът. Всички получени екстракти се обезмасляват, като към определен обем екстракт се прибавят 3 пъти по-малък обем хлороформ. Сместа се разбърква енергично в продължение на 10 мин, престоява на стайна температура (22°C) за 30 мин и се замразява за 18 часа при - 20°C. След размразяването хомогенатът се центрофугира за 15 мин на 6 000 g при 4°C, като се отпипетира свободната от липиди надстояща течност. Така получените екстракти бяха съхранявани при -20°C с консервант 0,02% натриев азид.

IV. 6 Получаване на имунни серуми

Използвани бяха различни концентрации на въвеждания антиген, като най-удачна се оказа еднократна доза от 5 мг еластин в 0,5 мл разтвор. Това количество антиген, емулгиран в равен обем пълен адювант на Freund, се инжектира на 5-6 места подкожно в гръбната и шийна област на опитните животни. Всяко животно се имунизира 5 пъти през интервал от 1 седмица и 7-8 дни след последната апликация, ако се установи достатъчно висок титър на антиеластиновите антители, животните се обезкървяват. При овцете вземахме кръв от v. jugularis, при зайците - от общата каротидна артерия, а от морските свинчета взехме кръв чрез кардиална пункция. Серумите отделяхме по следния начин: взетата венозна кръв престоява на стайна температура 2-3 часа, като 30 min след образуването на коагулума последният се отлепва от стената на съда. След ретракцията на съсирека се отпипетира течността и серумът се отделя чрез центрофугиране на 1000g при стайна температура. Серумите се съхраняват при -20°C, с консервант 0,02% натриев азид. По същият начин отделяхме и съхранявахме и изследваните човешки серуми.

IV. 7 Абсорбиране на имунните серуми

Имунните серуми абсорбирахме с неразтворим еластин като към 0,3 мл серум се прибавят 1 мг еластин и суспензията се инкубира в термостат на водна баня за 1 час при 37°C. След това серумите се центрофугират за 30 мин при 15 000 g и надстоящата течност се тестира чрез ELISA

IV. 8 Клинични параметри

Всичките пациенти с диабет са изследвани от един и същ офталмолог чрез офталмоскопия на разширени зеници.

- Гликираният хемоглобин беше измерен чрез използването на високо афинитетна течна хроматография (нормални граници 4-6%).
- За установяване на плазмената глюкоза, кръвта беше събрана в епруветки с гликолитичен инхибитор, и анализирана в рамките на 3-4 h в централна лаборатория чрез глюкозо-оксидазния метод GOD-PAP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) с Hitachi 705 автоанализатор (Boehringer Mannheim).
- Общият серумен холестерол и концентрациите на триглицеридите бяха измерени чрез ензимен анализ (Boehringer Mannheim).
- Артериалното кръвно налягане беше измерено чрез стандартен анероиден сфигмоманометър с разлика до 2 mm Hg, на доминиращата ръка в супинация след най-малко 10 min почивка.
- AER беше определена чрез нефелометрия използвайки кит съдържащ специфично анти тяло (Behringwerke, Marburg, Germany).
- Блокираща ELISA беше използвана за откриване на антитела срещу продуктите на късното гликиране (anti-AGE).
- Осъществяване на електрокардиография на всички болни

IV. 9 Имунологични методи за изследване на еластин и колаген

За да изпълним съответната цел и задачи използвахме оптимизирани и адаптирани варианти на ELISA

1. МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЕДП и KIVДП В СЕРУМИ НА ПАЦИЕНТИ С ВТОРИ ТИП ЗАХАРЕН ДИАБЕТ И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ

За определяне на ЕДП и KIVДП беше използвана „сандвич“ вариант на ELISA. Заешки и овчи имунен серум срещу човешки α -еластин беше използван. За детектиране на ЕДП, полистиреновите плаки бяха натоварени със заешки анти-еластинови IgG (10 μ g/ml) чрез инкубиране за 3h на 37C и през нощта на 4C. 100 μ g от човешки серум (разреден 1:5) бяха поставени в кладенчетата, за да бъдат тествани и инкубирани за 1h на 37C. След инкубирането с анти-овчи IgG пероксидазен имуноконюгат (SIGMA, USA) разреден 1:1000, реакцията беше спряна с 50 μ g 8N сярна киселина. Нивата на абсорбиране бяха отчетени с апарата Microelisa Reader 210 (Organon Teknika, Belgium) при дължина на вълната от 492nm.

За детектиране на KIVДП, процедурата беше същата, като използвахме човешки колаген тип IV (тип IV според SIGMA, USA) от човешка плацента, миши моноклонални антитела срещу човешки колаген тип IV (разреден 1:2000) и кози анти-миши пероксидазен имуноконюгат (разреден 1:3000), всички произведени от SIGMA, USA.

2. МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АЕAbs (IgG, IgM и IgA) В СЕРУМИ НА ПАЦИЕНТИ С ВТОРИ ТИП ЗАХАРЕН ДИАБЕТ И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ

АЕAb (IgG, IgM и IgA) бяха определени чрез ELISA по следният начин:

- Сенсibiliзиране на полистироловите плаки с α -еластин от човешка аорта приготвен по описаният начин - Nicoloff et al. 2001a, (1 μ g еластин в 100 μ l от 0.05 M карбонатен буфер, pH 9.6).
- Блокиране на останалите “активни” центрове на полистироловите кладенчета чрез инкубиране на плаката за 24 h с 1% разтвор от говежди серумен албумин (BSA) (Sigma, USA) във фосфатен буфер (PBS), pH 7.4, съдържащ 0.05% Tween 20.
- Инкубация с човешки серум разреден 1:10 с PBS за 1 h на 37 °C.

- Инкубация с имуноконюгати (анти-човешки имуноглобулинови пероксидазни конюгати (Sigma) срещу тежката верига на IgG, IgM и IgA) за 1 h на 37°C. Всички имуноконюгати бяха разреждени 1:10 000 с PBS съдържащ 1% BSA и 0.05% Tween 20.
- Инкубация със субстратен разтвор (o-фенилендиамин 4 mg/ml в 10 ml 0,05 M цитратен буфер, pH 5,0+0,01% H₂O₂) за 1h на стайна температура в тъмна камера.

Реакцията се спира с добавянето на 4 M H₂SO₄ към всяко кладенче. Всички проби бяха тествани трикратно и периферните кладенчета не бяха използвани, за да се избегне т.нар. "граничен" ефект. Вариацията в рамките на експеримента беше по-малка от 6%, а вариацията между експериментите беше по-малка от 10%. Пациентите които бяха с по-високи нива на AEAb от средното $\pm 2SD$ на здравите контроли бяха приети за позитивни за AEAb.

Контроли:

- А. Субстратна - Към покритите с антиген кладенчета се прибавя директно субстратния разтвор. Цветна реакция не се отчита.
- В. Конюгатна - Към покритите с антиген кладенчета се прибавя първо имуноконюгат, а след това се инкубират със субстратен разтвор.
- С. Контрола на имунния серум - реакцията се провежда по гореописания начин, като имунния серум се заменя с нормален овчи серум (или с нормален серум от съответното животно, в което е получен имунния серум, който тестираме

3. МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НЕСВЪРЗАНИ АНТИ-ЕЛАСТИНОВИ IgG АНТИТЕЛА ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ

Антиген

Разтворим човешки аортен α -еластин беше изолиран от трупове на млади здрави индивиди (загинали при злополука) по описаният по-рано начин. Baydanoff S, 1987. Еластиновата чистота беше потвърдена чрез аминокиселинния анализ на Prof. R. Mecham (Washington University, St. Louis, USA).

Несвързаните AEAbs баха определени чрез използването на двустепенен метод включващ CIF-ELISA за отстраняване на имунните комплекси последван от еластин-специфична ELISA за определяне на AEAbs.

CIF-ELISA плаките бяха приготвени чрез инкубиране на кладенчетата с CIF (20 µg/ml в 0.2 М карбонат-бикарбонатен буфер рН 9.6 през нощта на 4°C). CIF беше изолиран от семената на паразитното растение *Cuscuta europea*. След няколко кратни промивки за отстраняване на несвързаният CIF, човешките проби (100 µl) бяха прибавени към плаките и инкубирани за 60 min на 37° С.

В края на инкубационния период, пробите бяха прехвърлени от CIF плаката към кладенчетата сенсibiliзирани с аортен α-еластин (1 µg от еластин в 100 µl от 0.05 М карбонатен буфер, рН 9.6) по описаният по-рано начин Nicoloff et al., 2005.

Тези проби бяха след това инкубирани за 1 h на 37 °С, няколкократно промити и свързаното антитяло беше открито с кози античовешки IgG пероксидазни конюгати разредени 1:10 000 с PBS съдържащ 1% говежди серумен албумин (BSA) и 0.05% Tween 20 и о-фениленедиамин, 4 mg/ml в 10 ml 0.05 М цитртен буфер, рН 5.0+0.01% H₂O₂ за 1 h на стайна температура в тъмна камера.

Реакцията беше спряна с добавянето на 4М H₂SO₄ към всяко кладенче. Оптичната плътност беше измерена чрез Microelisa Reader 210 (Organon Teknika, Turnhout, Belgium) при дължина на вълната 492 nm.

Контроли:

(1) Субстратна контрола: субстратният разтвор беше прибавен директно към плаките с еластин;

(2) имуноконюгатна контрола: IgG имуноконюгат беше тестван върху полистироловите кладенчета сенсibiliзирани с BSA и върху кладенчета сенсibiliзирани с други човешки имуноглобулини (IgM, IgA и IgD);

(3) инхибиране на ELISA: 10 серумни проби с най-високите нива на AEAbs бяха преинкубирани със 100 µg човешки α-еластин за 30 min на 37° С; сместа беше след това центрофугирана за 30 min на 15 000 g, и бяха използвани супернатанти за ELISA според обичайния протокол и

(4) CIF-ELISA контрола: след абсорбцията на IgG ЦИК от CIF, 100 µl от абсорбиран серум беше тестван за наличието на IgG ЦИК.

Всичките проби бяха трикратно тествани и периферните кладенчета не бяха използвани за да се избегнат граничните ефекти.

4. МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЕРУМНИ АНТИТЕЛА СРЕЩУ КОЛАГЕН ТИП IV (Анти-KIV Abs) (IgG, IgM и IgA) ПРИ ПАЦИЕНТИ С ВТОРИ ТИП ЗАХАРЕН ДИАБЕТ И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ

Чрез ELISA бяха измерени серумните антитела IgG, IgM и IgA срещу KIV. Всяка плака беше сенсibiliзирана със 100 μ l от 10 μ g/ml човешки KIV (SIGMA, USA) на стайна температура за 3h и последваща инкубация през нощта на 4°C. Плаката се промива с фосфатен буфер (PBS) съдържащ 0.05% Tween 20 и 1% говежди серумен албумин. Тогава 100 μ l серумна проба (разредена 1:10) се накапва във всяко кладенче и се инкубира за 1h на 37°C. След трикратно промиване към всяко кладенче се добавят 100 μ l от имуноконюгатите (анти-човешки имуноглобулинови пероксидазни конюгати (SIGMA) срещу тежката верига на IgG, IgM и IgA) за 1h на 37°C. Всички имуноконюгати бяха разредени 1:10 000 с PBS съдържащ 1% BSA и 0.05% Tween 20.

Плаката се инкубира за 1h на 37°C. о-фенилендиамин (0.4 mg/ml) се добавя към цитратният буфер и 100 μ l от този разтвор се накапват във всяко кладенче и се оставя да реагира за 30 min. Реакцията се спира с добавянето на 50 μ l 4 M H₂SO₄ към всяко кладенче и се измерва оптичната плътност с Microelisa Reader 210 (Organon Teknika, Belgium) при дължина на вълната 492 nm.

5. МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АНТИТЕЛА СРЕЩУ КЪСНИТЕ ПРОДУКТИ НА НЕЕНЗИМНОТО ГЛИКИРАНЕ (AGEs) ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ

Приготвяне на антигена

AGE-еластин е получен чрез инкубацията на α -еластин от човешка аорта (1,33mg/ml⁻¹) с 100 mmol/l⁻¹ глюкоза, в 0,2 M фосфатен буфер, pH 7,8, съдържащ 0,04% NaN₃ на 37°C за 30 дни по описания начин Baydanoff et al. 1996 [147].

Производство на имунния серум

Поликлонален имунен серум срещу AGE на Hemocyanin от Keyhole Limpets (AGE-KLH) беше произведен в морско свинче по описания начин.

Измерване на анти-AGE антитела в човешки серум

Блокираща ELISA е използвана за определяне на антителата срещу късните продукти на гликирането (анти-AGE) Baydanoff et al. 1996. Кладенчетата на

полистироловите плаки бяха сенсibiliзирани с AGE-еластин (5 µg/ml). След промивне кладенчетата бяха инкубирани с 100µl човешки серум (разреден 1:20) за 1h на 37°C. Плаките бяха промити и кладенчетата бяха инкубирани със 100 µl анти-AGE-KLH имунен серум от морско свинче (разреден 1:1000) за 1h на 37°C. След това плаките бяха промити и кози анти-морско свинче IgG пероксидазен имуноконюгат (SIGMA, USA) разреден 1:10 000 беше използван за инкубация за 1h на 37°C. Реакцията беше спряна с прибавяне на 50 µl 4 M H₂SO₄. Реактивността на имунния серум без прибавен човешки серум беше използвана като контрола.

Характеристика на имунните антитела

Антителата срещу еластиновите епитопите бяха блокирани чрез две абсорбционни стъпала. Анти-AGE антителата реагираха с епитопите на AGE по отношение на протеина. Например нашите антитела разпознават AGE-еластин, AGE-BSA, и AGE-KLH в ELISA. AGE-пептиди също се разпознават. Реакцията с AGE-еластин може да бъде премахната чрез преинкубация с AGE-еластин, AGE-BSA, и AGE-KLH.

6. МЕТОД ЗА ПРОУЧВАНЕ НА ГЛИКИРАНИ СЕРУМНИ AGE-ЕЛАСТИН ДЕГРАДАЦИОННИ ПЕПТИДИ (AGE-ЕДП) ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ

Приготвяне на антигена

AGE-еластин е получен чрез инкубацията на α-еластин от човешка аорта (1,33mg/ml-1) с 100 mmol/l-1 глюкоза, в 0,2 M фосфатен буфер, pH 7,8, съдържащ 0,04% NaN₃ на 37°C за 30 дни по описания начин Nicoloff et al. 2005 [165].

Продукция на имунния серум

Поликлонален имунен серум срещу AGE на Немосуанин от Keyhole Limpets (AGE-KLH) беше произведен в заек по описания начин Vaydanoff et al. 1996 [147]. Също така поликлонален имунен серум срещу α-еластин от човешка аорта беше произведен. Измерване на AGE-ЕДП в човешки серум

ELISA беше използвана за откриване на AGE-EDP. Кладенчетата на полистироловите плаки бяха сенсibiliзирани с 10 µg/ml заешки анти-AGE-KLH IgG в 0,05 M натриево-карбонатен буфер (pH 9,6) и бяха инкубирани за 3h на 37°C и

оставени през нощта на на 40C. След трикратно промиване с PBS съдържащ 0.01% Tween 20, кладенчетата бяха инкубирани с PBS съдържащ 0.02% NaN₃ и 0.5% говежди серумен албумин (BSA) за 1 h на 370C за да се блокира неспецифичното свързване. След промиване три пъти на кладенчетата, те бяха инкубирани със 100µl човешки серум (разреден 1:5) за 1h на 37° C Плаките бяха промити трикратно и кладенчетата бяха инкубирани с 10 µg/ml овчи анти-еластинови IgG за 1h на 370C. След това плаките бяха промити и инкубирани за 1h на 370C с магарешки анти-овчи IgG пероксидазен имуноконюгат (SIGMA, USA) разреден 1:10 000. След трикратно промиване о-фениленедиамин (0.4 mg/ml) се добавя към цитратният буфер и 100 µl от този разтвор се накапват във всяко кладенче и се оставя да реагира за 30 min. Реакцията се спира с добавянето на 50 µl 4 M H₂SO₄ и се отчита абсорбцията с Microelisa Plate Reader 210 (Organon Teknika, Belgium) при дължина на вълната 492 nm. Използвайки AGE-еластин получихме стандартна крива в граници от 1.25 ng/ml до 1 µg/ml.

Контроли

Три типа негативни контроли бяха използвани за потвърждаване имуноспецифичността на антителата имуноспецифичността на антителата

- ✓ Замяна на първото антитяло с овчи неимунен IgG
- ✓ Замяна на второто антитяло със заешки IgG
- ✓ Отстраняване на първото антитяло от процедурата
- ✓ Отстраняване на второто антитяло от процедурата
- ✓ Замяна на човешка проба с α-еластин
- ✓ Замяна на човешка проба с AGE-KLH
- ✓ Беше използван един тип позитивна контрола:
- ✓ Замяна на човешка проба с AGE-α-еластин
- ✓ Характеристика на имунните антитела

Анти-AGE антителата реагираха с епитопите на AGE по отношение на протеина. Например нашите антитела разпознават AGE-еластин, AGE-BSA, и AGE-KLH в ELISA Baydanoff et al. 1996 [147].

IV. 10 Статистически методи

Данните от проучванията са обработени с компютърните програми EXCEL (Microsoft Corporation, Redmond, WA) и STATGRAPHICS plus (Manugistics, Rockville, MD) за WINDOWS. Резултатите са описани чрез таблици, графики и числови величини (средна аритметична) $\pm 2D$; показатели за относителен дял и корелационни коефициенти). За изводи и заключения при нормално разпределение на случаите са използвани t – тест на Стюdent, F - тест на Фишер (ANOVA) и post-hoc тестовете (LSD, Tukey HSD, Scheffe, Bonferroni, Newman-Keuls, and Duncan) а при различно от нормалното разпределение. При различно от нормалното разпределение е използвана, също така и медианна стойност (M), заедно с първи и трети квантил Q1 и Q3 (двадесет и пети и седемдесет и пети перцентил P25 и 75P).

K-W (Kruskal-Wallis) – тест. Значимостта на резултатите е определена като $p < 0,05$.

Таблица 1. Клинични данни на пациентите с диабет и артериална хипертония

КЛИНИЧНИ ДАННИ	Група 1	Група 2	Контроли
Възраст	62,5±12,58	60,4±8,4	58,9±7,56
Пол (М/Ж)	26/41	11/15	20/22
Средна продължителност на диабет	9,30±5,36	9,16±7,59	N/A
Средна продължителност на хипертония	9,50±7,63	8,68±7,26	N/A
HbA1c	7,63±2,03	7,27±1,63	N/A
Систолично АН (mmHg)	142,83±18,05	140,58±20,51	114,29±15,74
Диастолично АН (mmHg)	82,23±11,52	81,35±11,96	72,5±10,4
BMI	29,62±4,99	28,42±3,96	22,61±2,27
Общ холестерол (mmol/l)	5,26±1,40	5,18±0,93	3,99±0,65
HDL (mmol/l)	0,88±0,30	0,93±0,30	0,96±0,20
LDL (mmol/l)	3,18±1,19	3,16±1,09	2,43±0,64
Триглицериди (mmol/l)	2,91±1,68	2,53±1,49	1,31±0,61
Инсулинова доза (U/kg/24h)	2,57±0,52	2,03±0,93	N/A
MAU (µg/min)	*78,94±52,87	8,53±4,69	N/A
MAU	(n=43)	-	
Ретинопатия	(n=20)	-	
Невропатия	(n=4)	-	
Пушачи	37/67	15/26	16/42
Процентно съотношение (мъже/жени)	55%/45%	58%/42%	47%/53%
Брой	67	26	42
Процентно съотношение (мъже/жени)	39%/61%	42%/58%	45%/55%

Група 1- пациенти със съдови усложнения (n=67)

Група 2- пациенти без съдови усложнения (n= 26)

Контроли (n=42) **Стойностите са средна ±SD**

V. РЕЗУЛТАТИ

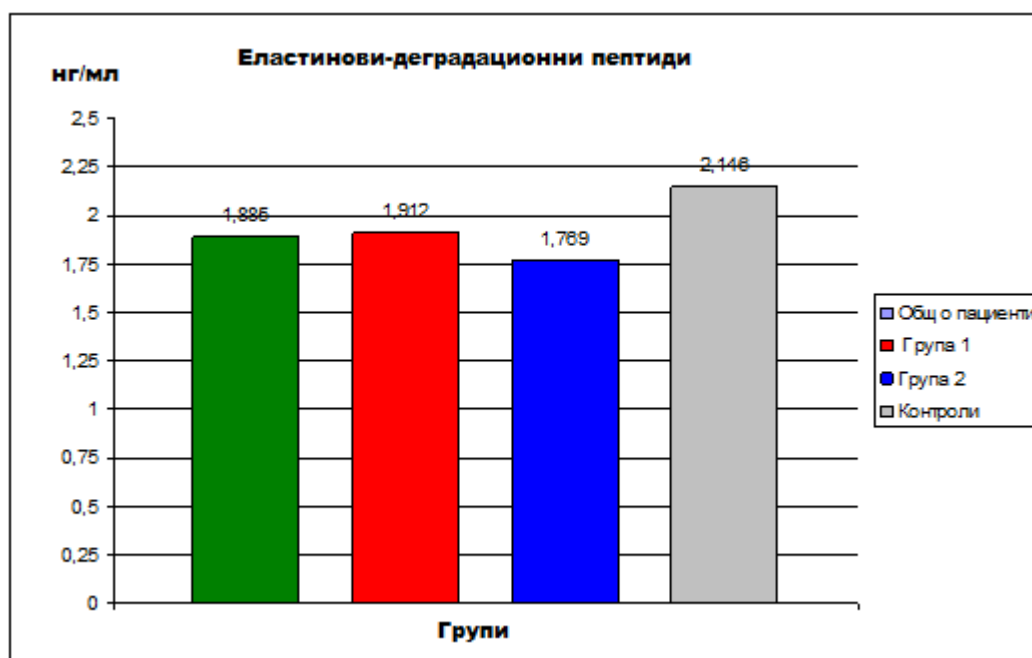
V. 1 РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЕРУМНИТЕ ЕДП И КИДП ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ

Проведените изследвания показват, че серумните нива на ЕДП при пациенти със ЗД тип 2 и АХ са по-ниски спрямо контролната група 1,885 (0,550÷3,662) vs. 2,146 (1,036÷4,216), като тези стойности не са значими ($p>0,05$). (Таблица 2; Фиг. 1)

Таблица 2. Стойности на серумни ЕДП при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	ЕДП (ng/ml)		Сравнение с други групи	
	M÷(Q1доQ3)	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	1,885 (0,550÷3,66)	NS	NS	-
Група 1	1,912 (0,550÷3,717)	-	NS	NS
Група 2	1,769 (0,754÷2,589)	NS	-	NS
Контроли	2,146 (1,036÷4,21)	NS	NS	NS

Фигура 1. Стойности на серумни ЕДП при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

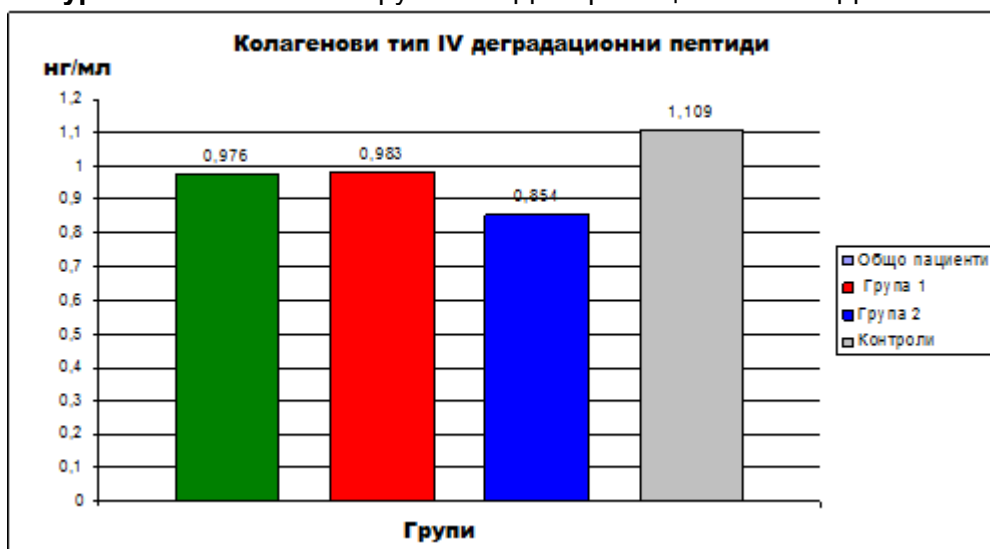


Проведените изследвания показват, че серумните нива на KIVДП при пациенти със ЗД тип 2 и АХ са по-ниски спрямо контролната група 0,976 (0,596÷0,918) vs. 1,109 (0,993÷1,258), като тези стойности не са значими ($p>0,05$). (Таблица 3; Фиг. 2)

Таблица 3. Стойности на серумни KIVДП при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	KIVДП (ng/ml)		Сравнение с други групи	
	M÷(Q1доQ3)	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	0,976 (0,596÷0,91)	NS	NS	-
Група 1	0,983 (0,582÷0,918)	-	NS	NS
Група 2	0,854 (0,639÷0,929)	NS	-	NS
Контроли	1,109 (0,993÷1,25)	NS	NS	NS

Фигура 2. Стойности на серумни KIVДП при пациенти със ЗД тип 2 и АХ



V. 2 РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЕРУМНИТЕ АНТИ-ЕЛАСТИНОВИ АНТИТЕЛА (IgG, IgM, IgA) ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ

Таблица 4. Стойности на серумни АЕAbs IgG антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	АЕAbs IgG (ng/ml)		Сравнение с други групи	
	М±(Q1доQ3)	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	0,682 (0,503÷0,962)	NS	NS	-
Група 1	0,646 (0,514÷1,002)	-	NS	NS
Група 2	0,633 (0,470÷0,867)	NS	-	NS
Контроли	0,695 (0,500÷0,819)	NS	NS	NS

***NS (Non-significant)- без статистическа значимост**

Проведените изследвания показват, че серумните нива на АЕAbs IgG антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ са по-ниски спрямо контролната група 0,682 (0,503÷0,962) vs. 0,695 (0,500÷0,819), като тези стойности не са значими ($p > 0,05$) (Таблица 4; Фиг.3).

Фигура 3. Стойности на серумни АЕAbs IgG антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

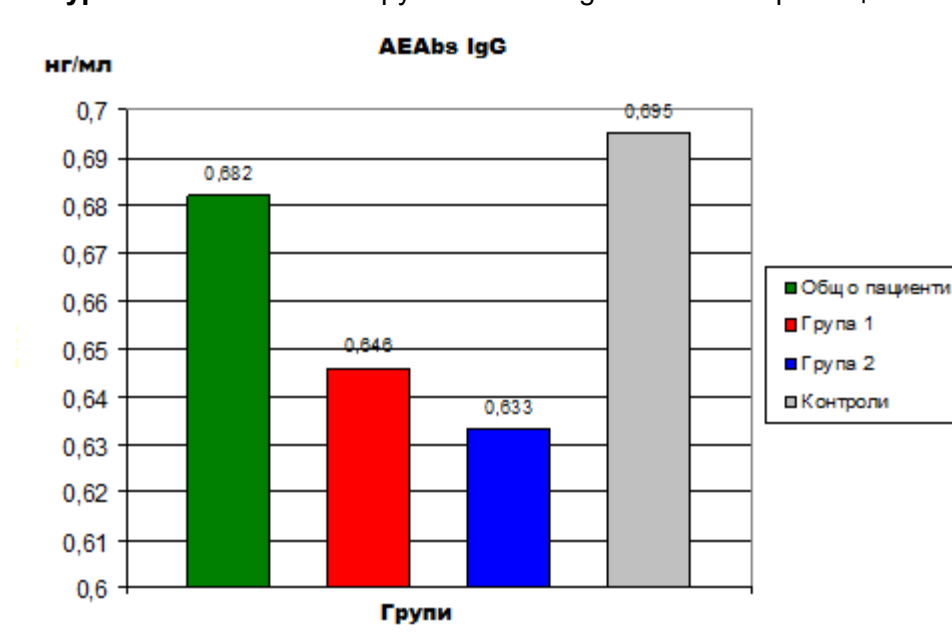


Таблица 5. Стойности на серумни АЕAbs IgM антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	АЕAbs IgM (ng/ml)		Сравнение с други групи	
	М±(Q1доQ3)	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	0,314 (0,175÷0,288)	NS	NS	-
Група 1	0,225 (0,176÷0,297)	-	NS	NS
Група 2	0,287 (0,172÷0,283)	NS	-	NS
Контроли	0,360 (0,305÷0,466)	NS	NS	NS

Проведените изследвания показват, че серумните нива на АЕAbs IgM антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ са по-ниски спрямо контролната група 0,314 (0,175÷0,288) vs. 0,360 (0,305÷0,466), като тези стойности не са сигнификантни ($p>0,05$). (Таблица 5) (Фигура 4).

Фигура 4. Стойности на серумни АЕAbs IgM антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

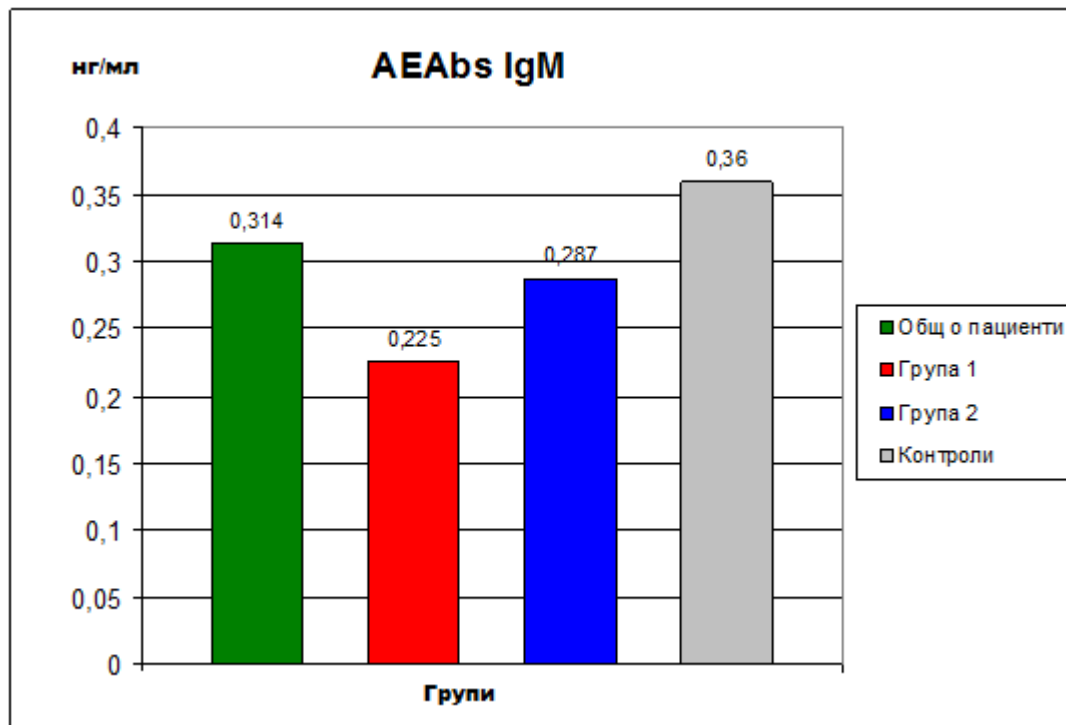
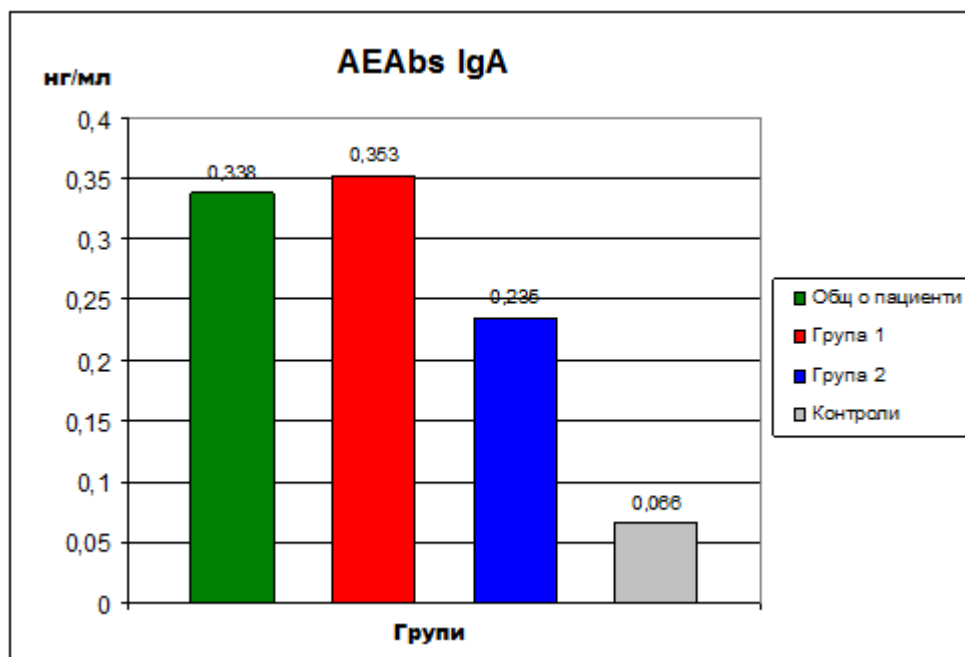


Таблица 6. Стойности на серумни АЕAbs IgA антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	АЕAbs IgA (ng/ml)		Сравнение с други групи	
	М÷(Q1доQ3)	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	0,338 (0,133÷0,452)	NS	NS	-
Група 1	0,353 (0,173÷0,471)	-	P=0,05	NS
Група 2	0,235 (0,098÷0,377)	P=0,05	-	NS
Контроли	0,066 (0,052÷0,068)	P<0.0001	P=0.003	P<0.0001

Установихме, че серумните АЕAbs IgA антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ са статистически значимо по-високи в сравнение с контролната група 0,338 (0,133÷0,452) vs. 0,006 (0,052÷0,068) (KW=19,54; P<0.0001). Пациентите, които имаха данни за микроваскуларни увреждания (Група 1) показаха сигнификантно по-високи стойности на АЕAbs IgA спрямо тези без 0,353 (0,173÷0,471) vs. 0,235 (0,098÷0,377) (KW=3,36; p=0.05) и спрямо контролите 0,353 (0,173÷0,471) vs 0,006 (0,052÷0,068) (KW=20,37; p<0,0001). Субектите без съдова увреда имаха също значимо по-високи нива на АЕAbs IgA спрямо контролите 0,235 (0,098÷0,377) vs. 0,006 (0,052÷0,068) (KW=8,54; P=0.003) (Таблица 6) (Фигура 5). Най-високите стойности на АЕAbs IgA се откриват при Група 1 (пациенти с васкуларни поражения).

Фигура 5. Стойности на серумни АЕAbs IgA антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

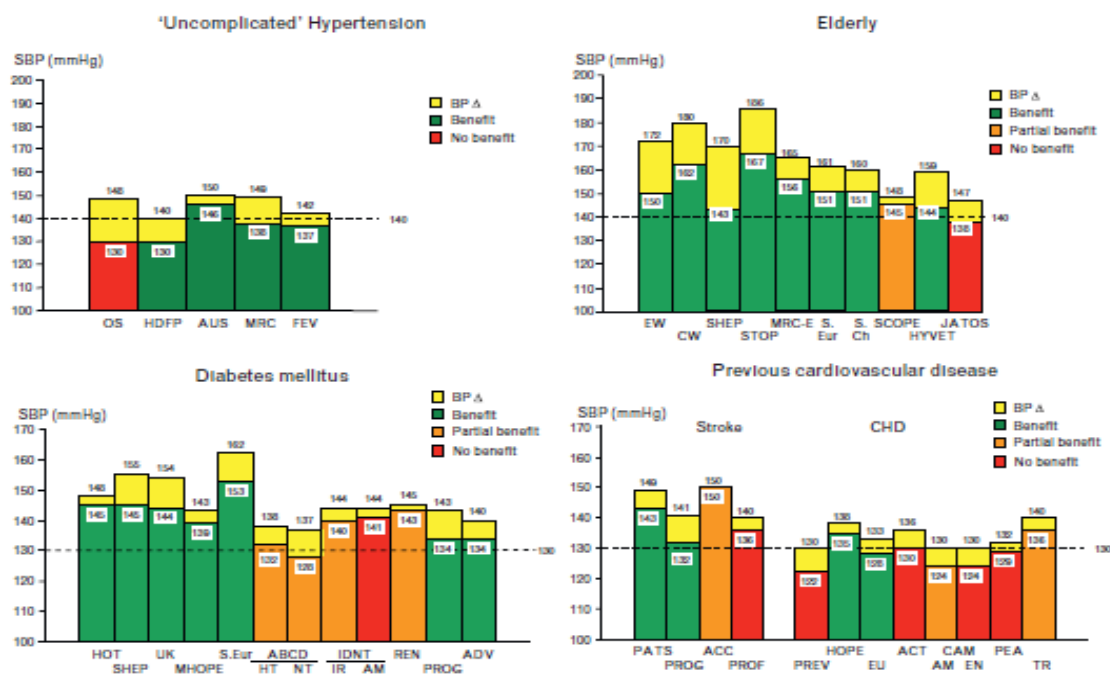


АЕAbs IgA антитела показаха корелация с инсулиновата доза ($r=-0.35$); ($p=0.01$), систоличното артериално налягане ($r=0.31$); ($p=0.001$), HbA1c ($r=0.21$); ($p=0.04$), BMI ($r=0.22$); ($p=0.01$).

Всичките пациенти ($n=93$) бяха разделени на две подгрупи в зависимост от контрола на АН: на такива с незадоволителен ($n=61$) и задоволителен ($n=32$) контрол според препоръките на Европейското дружество по хипертония (ESH) 2009 за прицелни стойности на АН (Фигура 6).

Стойностите на АЕAbs IgA антитела са статистически значимо повишени при диабетиците с незадоволителен контрол на АН ($\geq 140/90$) спрямо тези със задоволителен контрол (130-139/80-85); 0,381 (0,218÷0,480) vs. 0,191 (0,131÷0,344) (KW=4,69; $p=0,03$) (Таблица 7) (Фигура 7).

Фигура 6. Препоръки за прицелни стойности на АН (ESH) 2009



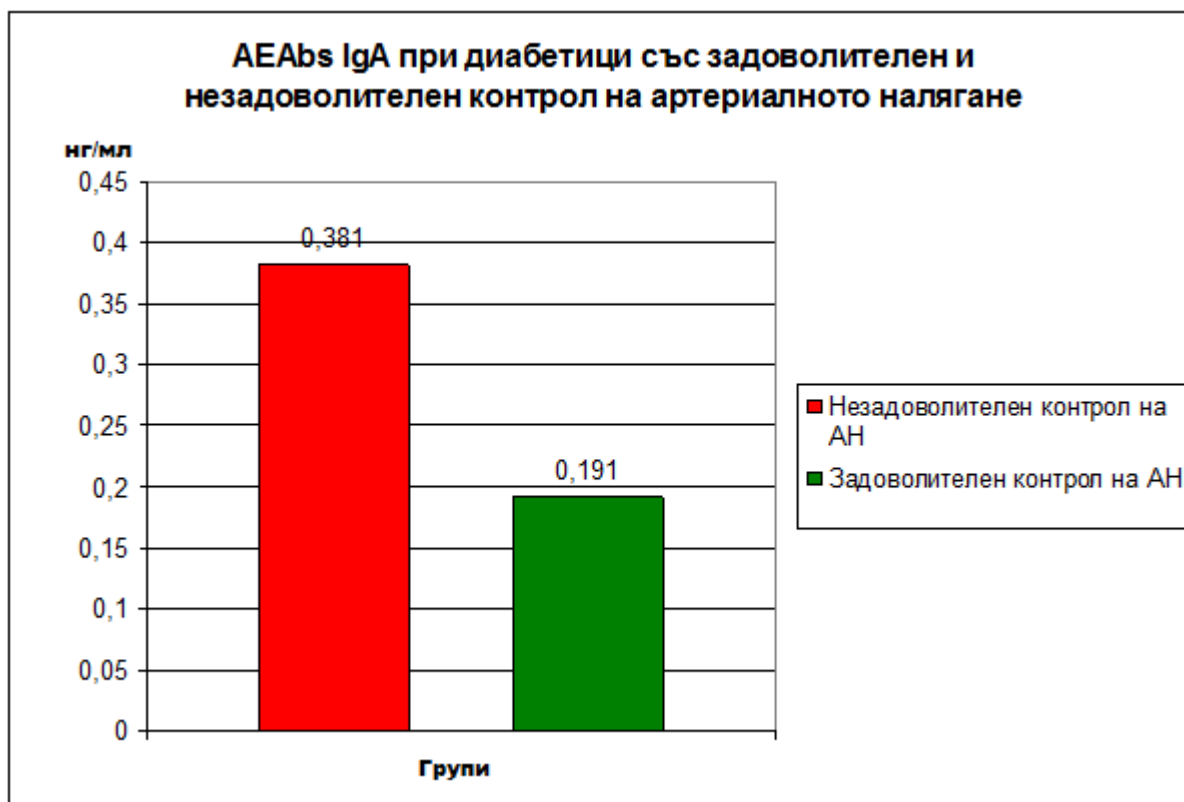
За разлика от препоръките за контрол на АН при пациентите от останалите групи ($\leq 140/90$ mmHg), контролът на АН при диабетиците трябва да се поддържа в граници (130-139/80-85 mmHg). Редукцията на систоличното артериално налягане под 130 mmHg не води до допълнителни ползи- напротив свързва се с повишен риск за развитие на коронарен инцидент (J-curve феномен).

Таблица 7. Стойности на АЕAbs IgA при диабетици с незадоволителен (Н) и задоволителен (З) контрол на АН.

Контрол на АН	Стойности на АЕAbs IgA (ng/ml) M÷(Q1доQ3)	Сравнение	
		(Н)	(З)
Незадоволителен (Н) (≥140/90 mmHg) (n=61)	0.381 (0,218÷0,480)	-	P=0.03
Задоволителен (З) (130-139/80-85 mmHg) (n=32)	0.191 (0,131÷0,344)	P=0.03	-

Стойностите на АЕAbs IgA антитела са статистически значимо повишени при диабетиците с незадоволителен контрол на АН (≥140/90) спрямо тези със задоволителен контрол (130-139/80-85); 0.381 (0,218÷0,480) vs. 0,191 (0,131÷0,344) (KW=4,69; p=0,03)

Фигура 7. Стойностите на АЕAbs IgA антитела са статистически значимо повишени при диабетците с незадоволителен контрол на АН ($\geq 140/90$) спрямо тези със задоволителен контрол (130-139/80-85); 0,381 (0,218÷0,480) vs. 0,191 (0,131÷0,344) (KW=4,69; p=0,03)



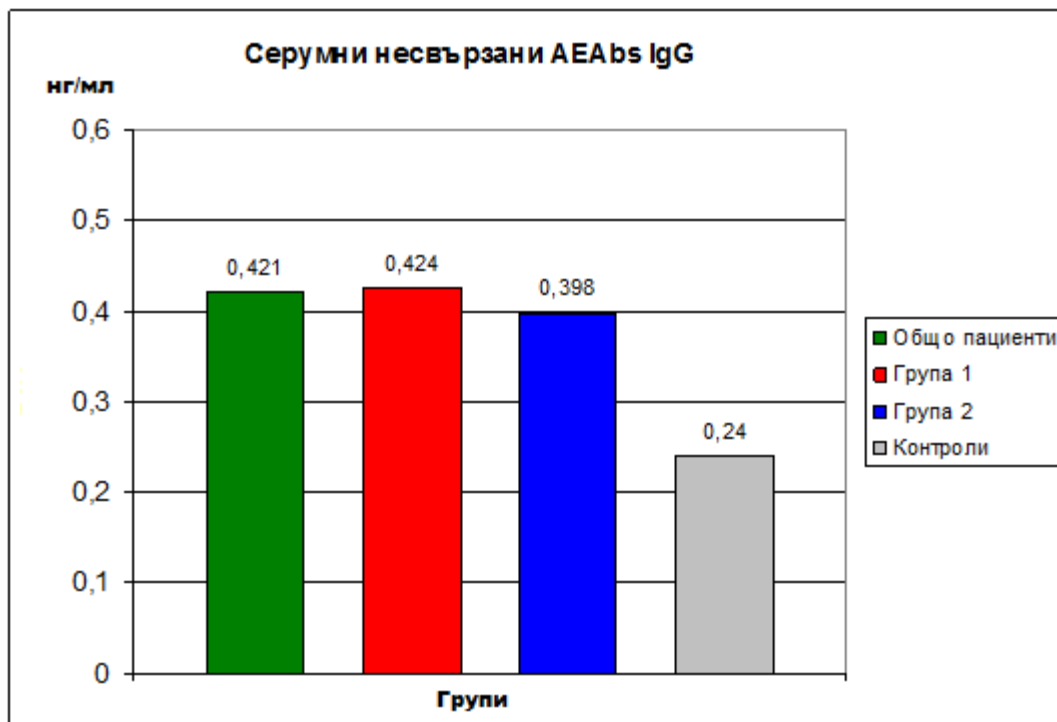
V. РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕ НА НЕСВЪРЗАНИТЕ АНТИ-ЕЛАСТИНОВИ IgG АНТИТЕЛА (free elastin Abs)

Таблица 8. Стойности на серумни несвързани АЕAbs IgG пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	серумни несвързани АЕAbs IgG (ng/ml)		Сравнение с други групи	
	М±(Q1доQ3)	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	0,421 (0,328÷0,572)	NS	NS	-
Група 1	0,424 (0,343÷0,591)	-	NS	NS
Група 2	0,398 (0,312÷0,467)	NS	-	NS
Контроли	0,240 (0,212÷0,305)	P<0.0001	P=0.003	P<0.0001

Несвързаните АЕAbs IgG при пациенти със ЗД тип 2 и АХ са статистически значимо по-високи в сравнение с контролите 0,421 (0,328÷0,572) vs. 0,240 (0,212÷0,305) (KW=19,64; p<0,0001). Група 1 показва сигнификантно завишение на несвързани АЕAbs IgG спрямо здрави индивиди 0,424 (0,343÷0,591) vs. 0,240 (0,212÷0,305) (KW=20,14; p<0,0001). Група 2 също показва завишение на серумни несвързани АЕAbs IgG спрямо контролната група 0,398 (0,312÷0,467) vs. 0,240 (0,212÷0,305) (KW=8,88; p=0,003) (Таблица 8) (Фигура 8). Най-високи стойности на изследваните антитела показаха пациентите със съдови увреждания. Не се установиха разлики между Група 1 и Група 2.

Фигура 8. Стойности на Серумни несвързани АЕAbs IgG пациенти със ЗД тип 2 и АХ



Несвързаните еластинови антитела корелират с нивата на HbA1c ($r=0.22$); ($p=0.04$), продължителността на диабета ($r=0.18$); ($p=0.05$), систоличното артериално налягане ($r=0.15$); ($p=0.05$), общият холестерол ($r=0.20$); ($p=0.03$), триглицеридите ($r=0.21$); ($p=0.02$).

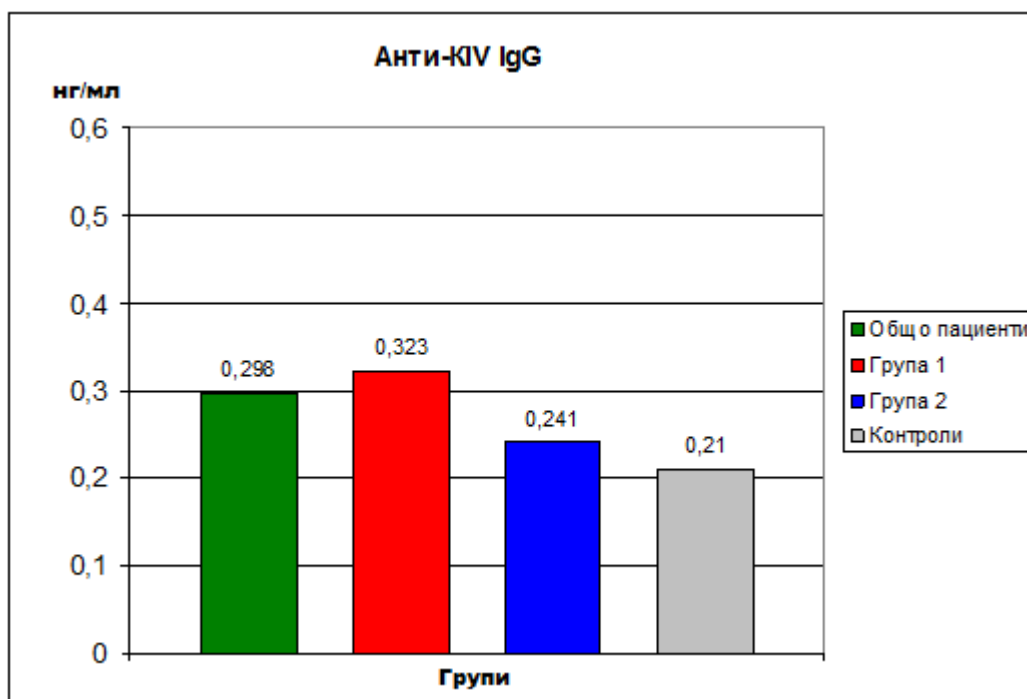
V. 4 РЕЗУЛТАТИ ОТ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СЕРУМНИ АНТИ-KIV АНТИТЕЛА (IgG, IgM и IgA) ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ

Таблица 9. Стойности на серумни Анти-KIV IgG при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	Анти-KIV IgG (ng/ml)		Сравнение с други групи	
	М±(Q1доQ3)	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	0,298 (0,237÷0,381)	NS	P<0.01	-
Група 1	0,323 (0,243÷0,391)	-	p=0.006	NS
Група 2	0,241 (0,207÷0,291)	p=0.006	-	P<0.01
Контроли	0,210 (0,149÷0,262)	P<0.0001	NS	P<0.0001

Установяват се статистически достоверно по-високи стойности на Анти-KIV IgG при пациенти със ЗД тип 2 и АХ спрямо здрави контроли 0,298 (0,237÷0,381) vs. 0,210 (0,149÷0,262) (KW=14,01; P<0.0001). Група 1 (пациенти със микроваскуларни усложнения) показва сигнификантно по-високи стойности на Анти-KIV IgG в сравнение с Група 2 (без съдови увреди) 0,323 (0,243÷0,391) vs. 0,241 (0,207÷0,291) (KW=7,66; p=0,006) и в сравнение със здравите контроли 0,210 (0,149÷0,262) (KW=17,52; P<0.0001). (Таблица 9) (Фигура 9). Най-високи стойности на Анти-KIV IgG се установиха при пациентите със съдови поражения (Група 1).

Фигура 9. Стойности на серумни Анти-KIV IgG при пациенти със ЗД тип 2 и АХ



Серумните Анти-KIV IgG корелират с продължителността на диабета ($r=0.49$); ($p=0.01$), ретинопатията ($r=-0.20$); ($p=0.04$) и BMI ($r=-0.24$); ($p=0.05$), систоличното артериално налягане ($r=0.16$); ($p=0.05$), общият холестерол ($r=0.20$); ($p=0.03$), триглицеридите ($r=0.31$); ($p=0.01$).

Пациентите от Група 1- индивиди с васкуларни усложнения ($n=67$) бяха разделени на две подгрупи в зависимост от наличието на ретинопатия: на такива с ретинопатия ($n=20$) и без ретинопатия ($n=47$) според International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Classification Scale (ICDRCS) 2002 в зависимост от наличието или отсъствието на абнормални нови съдове (Таблица 10).

Стойностите на Анти-KIV IgG антитела са статистически значимо повишени при диабетите с ретинопатия спрямо тези без ретинопатия $0,329 (0,276 \div 0,391)$ vs. $0,262 (0,225 \div 0,373)$ ($KW=3,83$; $p=0,05$) (Таблица 11); (Фигура 10).

Таблица 10. Международна клинична класификация за оценка степента на диабетната ретинопатия в зависимост от наличието или отсъствието на абнормални нови съдове според International Clinical Diabetic Retinopathy Disease Classification Scale (ICDRCS) 2002

<i>Международна клинична класификация за оценка степента на диабетната ретинопатия (ICDRCS) 2002</i>			
<i>Няма данни за ДР</i>			
<i>Непролиферативна ДР</i>	<i>Лека форма</i>	<i>Средно-тежка форма</i>	<i>Тежка форма</i>
<i>Пролиферативна ДР</i>			

Таблица 11. Стойности на серумни Анти-KIV IgG при пациенти със ЗД тип 2 и АХ. Пациентите са разделени на две групи в зависимост от наличието или отсъствието на ретинопатия

	Стойности на Анти-KIV IgG (ng/ml) M÷(Q1доQ3)	Сравнение	
		(С)	(БЕЗ)
С Ретинопатия (n=20)	0,329 (0,276÷0,391)	-	P=0.05
Без ретинопатия (n=47)	0,262 (0,225÷0,373)	P=0.05	-

Фигура 10. Стойностите на Анти-KIV IgG антитела са статистически значимо повишени при диабетците с ретинопатия спрямо тези без ретинопатия 0,329 (0,276÷0,391) vs. 0,262 (0,225÷0,373) (KW=3,83; p=0,05)

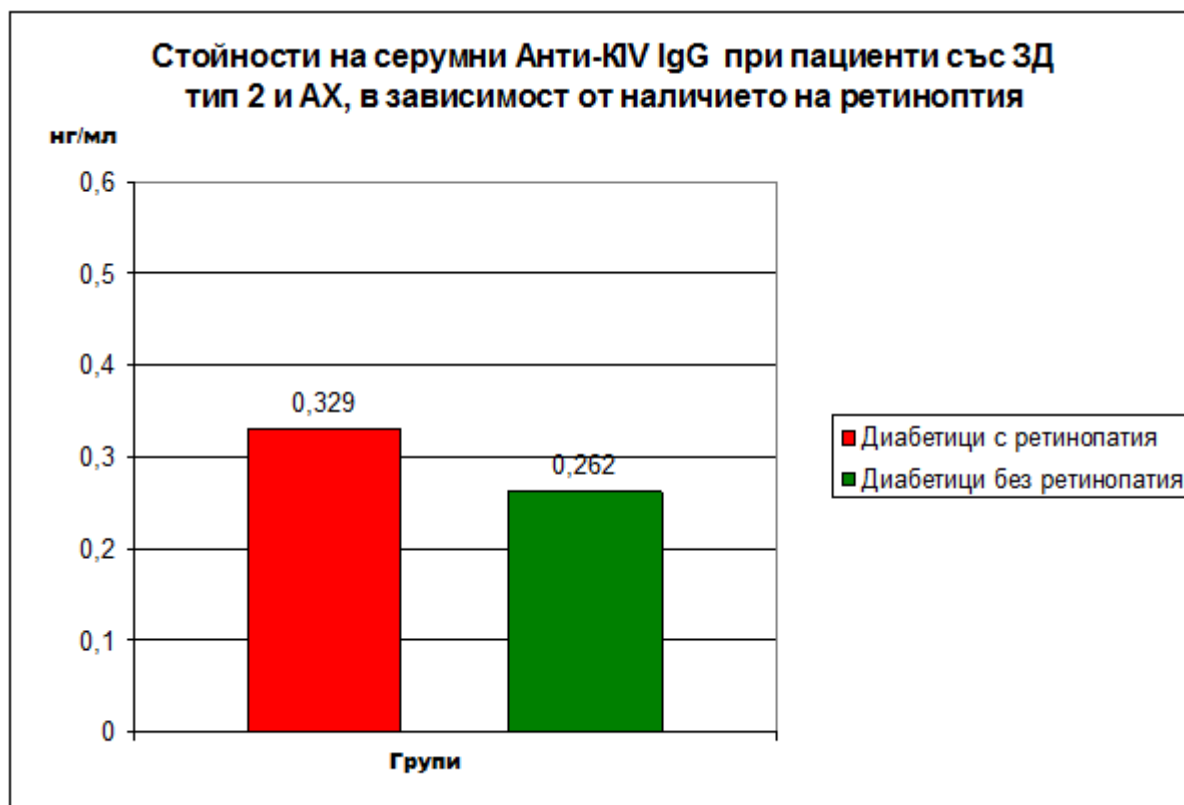
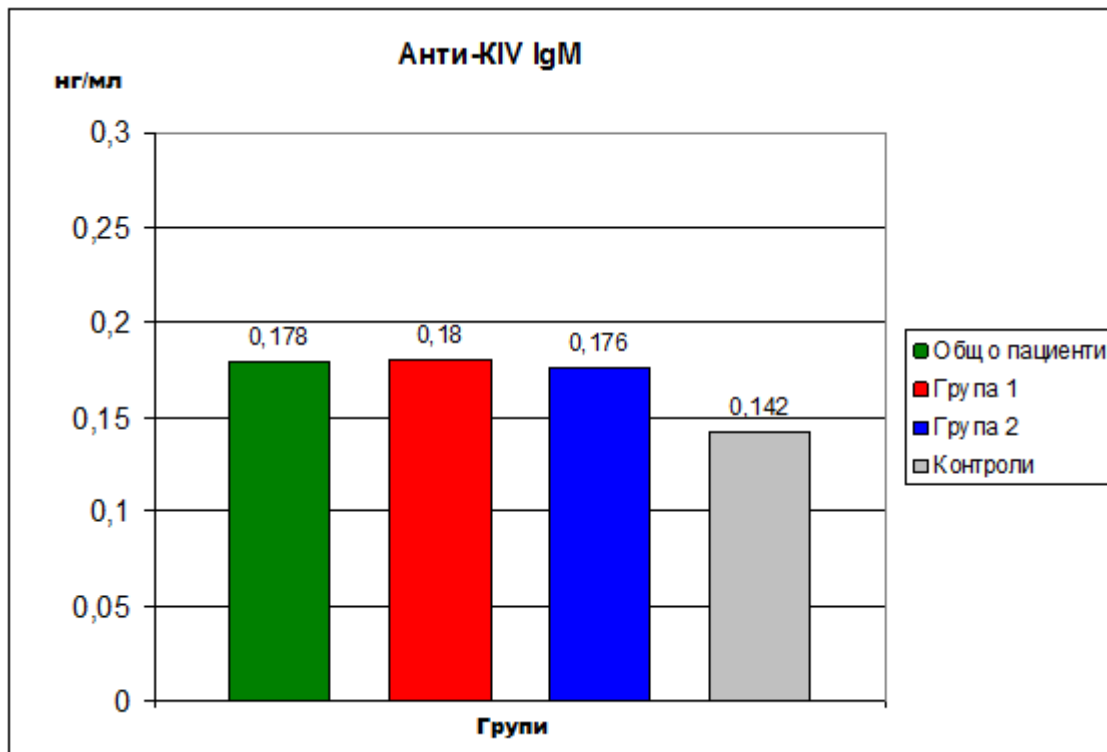


Таблица 12. Стойности на серумни Анти-KIV IgM при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	Анти-KIV IgM (ng/ml)		Сравнение с други групи	
	M÷(Q1доQ3)	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	0,178 (0,145÷0,220)	NS	NS	-
Група 1	0,180 (0,136÷0,223)	-	NS	NS
Група 2	0,176 (0,151÷0,202)	NS	-	NS
Контроли	0,142 (0,118÷0,173)	P=0,02	P=0,01	P=0,01

Проведените изследвания показват, че серумните нива на Анти-KIV IgM антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ са по-високи спрямо контролната група, като тези стойности са сигнификантни 0,178 (0,145÷0,220) vs. 0,142 (0,118÷0,173) (KW=6,31; p=0,01). Група 1 (пациенти със микроваскуларни усложнения) показва сигнификантно по-високи стойности на Анти-KIV IgM в сравнение със здравите контроли 0,180 (0,136÷0,223) vs. 0,142 (0,118÷0,173) (KW=5,03; P=0.02). Пациентите от Група 2, показаха значимо завишение на изследвания показател спрямо контролите 0,176 (0,151÷0,202) vs. 0,142 (0,118÷0,173) (KW=6,15; p=0,01). (Таблица 12) (Фигура 11). Най-високи стойности на Анти-KIV IgM се установиха при пациентите със съдови поражения (Група 1).

Фигура 11. Стойности на серумни Анти-KIV IgM при пациенти със ЗД тип 2 и АХ



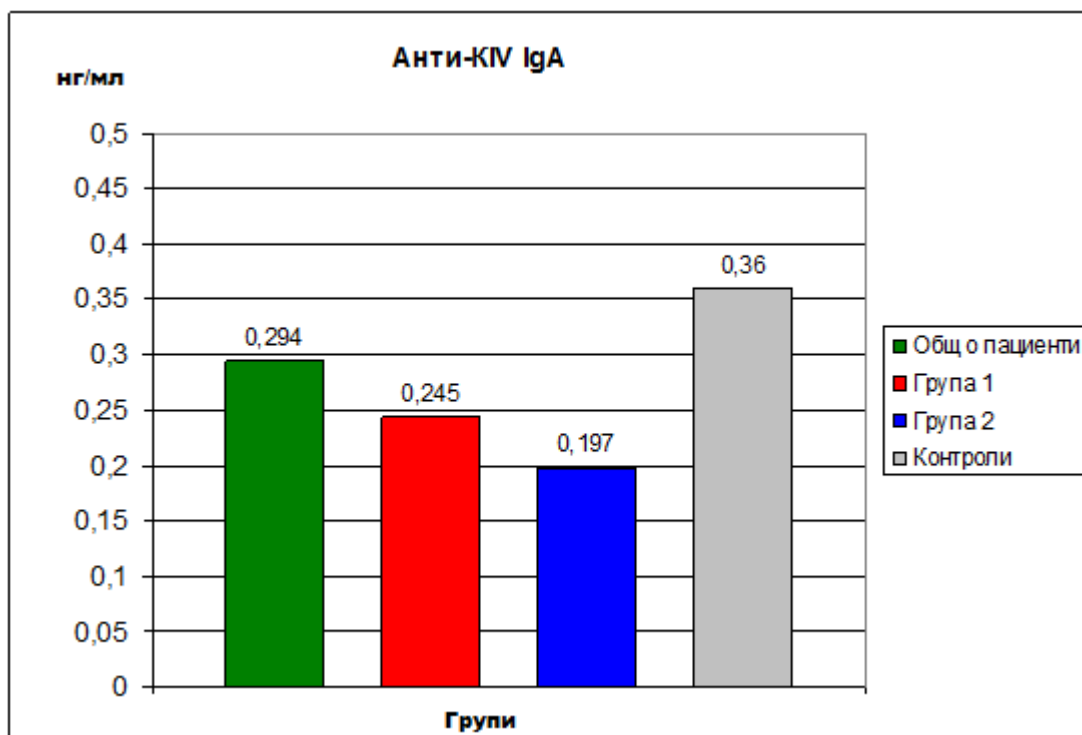
Серумните Анти-KIV IgM корелират с микроалбинурията ($r=0.18$); ($p=0.05$), ВМІ ($r=0.19$); ($p=0.04$)

Таблица 13. Стойности на серумни Анти-KIV IgA при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	Анти-KIV IgA (ng/ml)		Сравнение с други групи	
	М÷(Q1доQ3)	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	0,294 (0,135÷0,228)	NS	NS	-
Група 1	0,245 (0,136÷0,257)	-	NS	NS
Група 2	0,197 (0,178÷0,213)	NS	-	NS
Контроли	0,360 (0,205÷0,366)	NS	NS	NS

Серумните Анти-KIV IgA антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ бяха по-ниски отколкото тези при контролите 0,294 (0,135÷0,228) vs. 0,360 (0,205÷0,366). Разликите не са статистически значими ($p > 0,05$) (Таблица 13) (Фигура 12).

Фигура 12. Стойности на серумни Анти-KIV IgA при пациенти със ЗД тип 2 и АХ



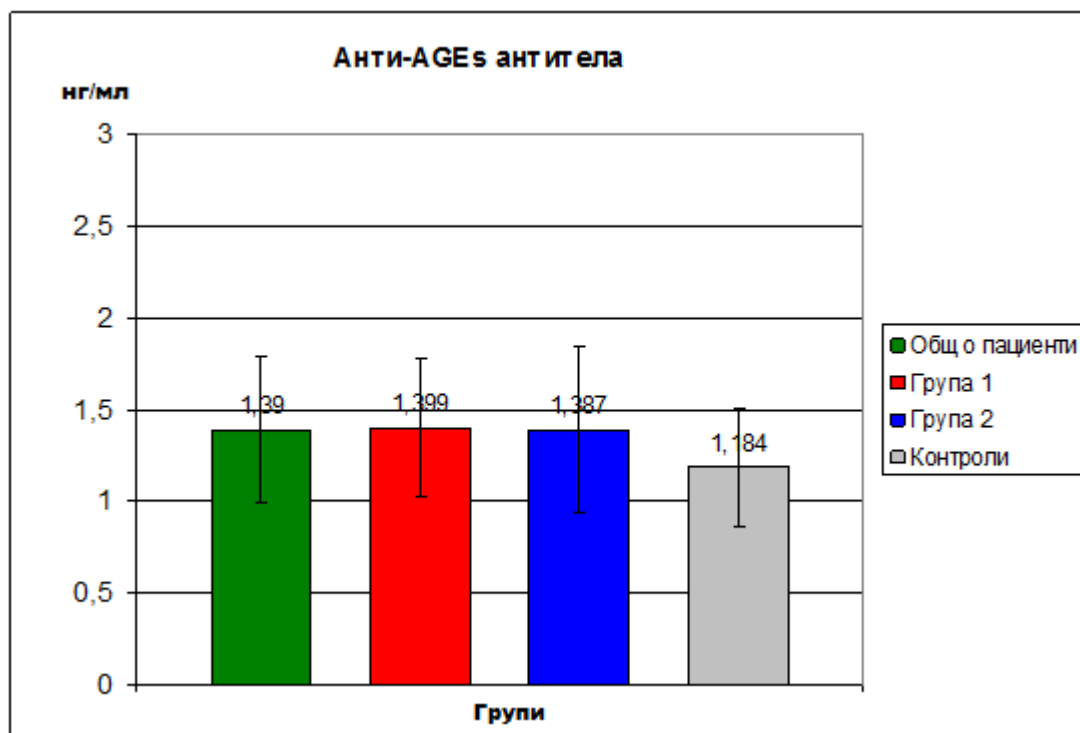
V. 5 РЕЗУЛТАТИ ОТ ИЗСЛЕДВАНЕ НА АНТИТЕЛА СРЕЩУ КЪСНИТЕ ПРОДУКТИ НА НЕЕНЗИМНОТО ГЛИКИРАНЕ (АНТИ-AGEs АНТИТЕЛА)

Таблица 14. Стойности на анти-AGEs при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	Анти-AGEs		Сравнение с други групи	
	Средна \pm SD	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	1.390 \pm 0.394	NS	NS	-
Група 1	1.399 \pm 0.376	-	NS	NS
Група 2	1.387 \pm 0.454	NS	-	NS
Контроли	1.184 \pm 0.325	P=0,03	P<0.05	P=0.03

Стойностите на анти-AGEs антителата при пациенти със ЗД тип 2 и АХ са достоверно завишени спрямо контролната група (1.390 \pm 0.394 vs. 1.184 \pm 0.325; F=4.72, P=0.03/. Група 1 показва сигнификантно по-високи стойности на анти-AGEs спрямо здравите индивиди (1.399 \pm 0.376 vs. 1.184 \pm 0.325; F=4,75 P=0.03). (Таблица 14) (Фигура 13). Стойностите на анти-AGEs антителата са по-високи при пациентите със съдови увреждания, в сравнение с тези на индивидите без васкуларни поражения (Група 2).

Фигура 13. Стойности на анти-AGEs при пациенти със ЗД тип 2 и АХ

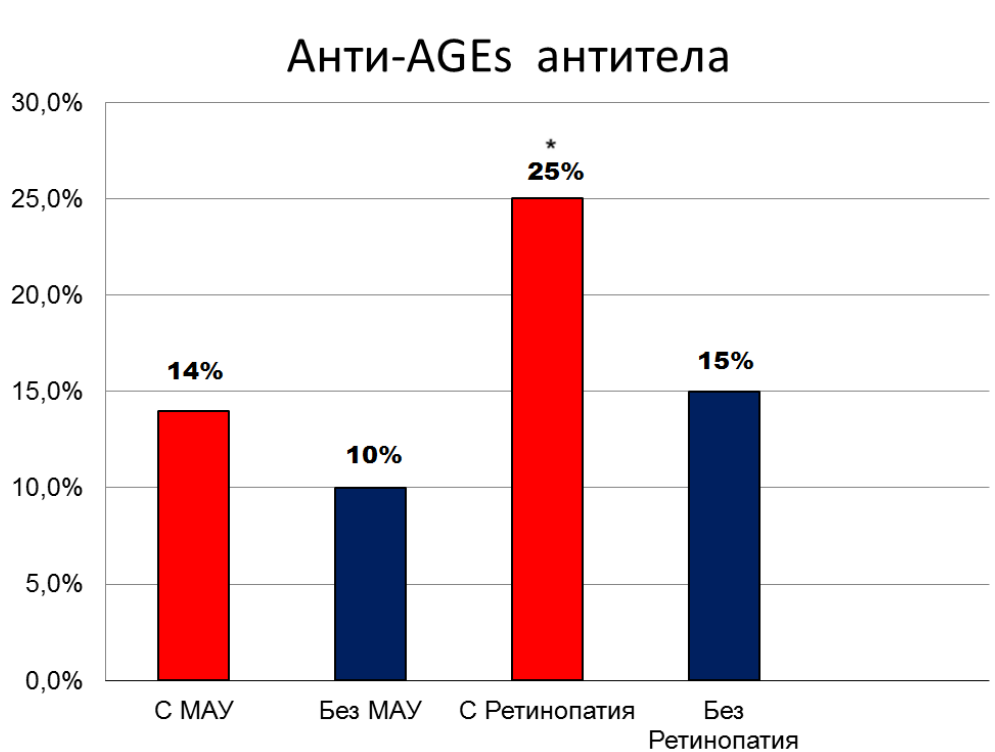


Антителата срещу AGEs корелират със систоличното артериално налягане ($r=0.17$); ($p=0.05$), BMI ($r=0.25$); ($p=0.01$), общият холестерол ($r=0.19$); ($p=0.04$).

В нашето проучване установихме по-голям процент на позитивни пациенти (стойности средна+2SD) за анти-AGEs антитела в групата със съдови усложнения спрямо тези без усложнения (Фигура 14):

- 6 пациента от 43 (14%) от подгрупата с МАУ бяха позитивни за антитела срещу AGEs спрямо 3 от 26 (10%) без усложнения
- 5 пациента от 20 (25%) от подгрупата с ретинопатия бяха позитивни спрямо 4 от 26 (15%)

Фигура 14. Процент на позитивните пациенти за анти-AGEs антитела в групата със съдови усложнения спрямо тези без усложнения



За позитивни се приемат пациентите със стойности средна+2SD

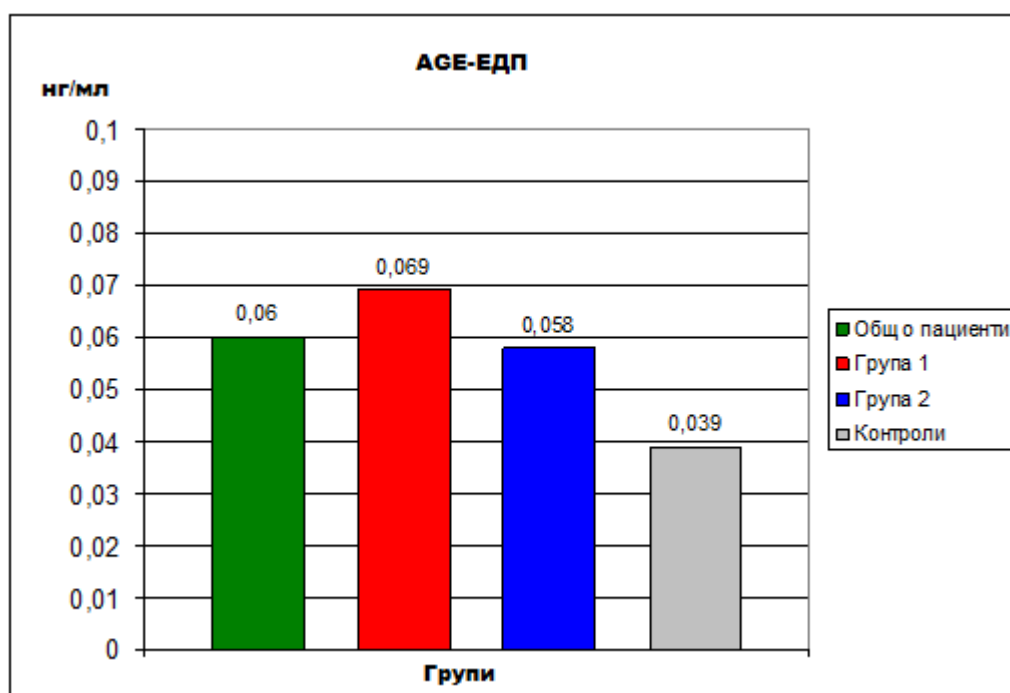
V. 6 РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОУЧВАНЕ НА СЕРУМНИТЕ AGE-ЕДП ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 2 И АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ

Таблица 15. Стойности на серумни AGE-ЕДП пациенти със ЗД тип 2 и АХ

Групи	AGE-ЕДП (ng/ml)		Сравнение с други групи	
	M÷(Q1доQ3)	Група 1	Група 2	Общо пациенти
Общо пациенти	0,060 (0,053÷0,065)	NS	NS	-
Група 1	0,069 (0,051÷0,070)	-	NS	NS
Група 2	0,058 (0,049÷0,064)	NS	-	NS
Контроли	0,039 (0,031÷0,044)	P<0.0001	P<0.001	P<0.0001

Установихме статистически значими по-високи стойности на серумни AGE-ЕДП при пациенти със ЗД тип 2 и АХ в сравнение с контролната група 0,060 (0,053÷0,065) vs. 0,039 (0,031÷0,044) (KW=35,2; p<0,0001). Група 1 показва сигнификантно повишение на серумни AGE-ЕДП спрямо контролните лица 0,069 (0,051÷0,070) vs. 0,039 (0,031÷0,044) (KW=33,0; p<0,0001). Пациентите от Група 2 са със значимо по-високи стойности на AGE-ЕДП спрямо контролните лица 0,058 (0,049÷0,064) vs. 0,039 (0,031÷0,044) (KW=22,1; p<0,0001) (Таблица 15) (Фигура 15). Най-високи стойности на гликиран еластин се откриват при пациентите с васкуларни увреждания.

Фигура 15. Стойности на серумни AGE-ЕДП пациенти със ЗД тип 2 и АХ



Серумните AGE-ЕДП корелират с инсулиновата доза ($r=-0.28$); ($p=0.05$), систоличното артериално налягане ($r=0.25$); ($p=0.01$), BMI ($r=0.39$); ($p=0.01$) и ретинопатията ($r=0.18$); ($p=0.05$).

VI. ОБСЪЖДАНЕ

Еластинът и колагенът са основни компоненти на ЕЦМ и отговарят както за еластичността, така и за здравината на съдовите стени. След формиране на еластичното влакно неговото ремоделиране и обмяна са изключително бавни. Тази обмяна обаче може да бъде значително ускорена при някои патологични процеси, засягащи еластичните структури. Пример за лица с патологична обмяна на еластина и колагена са пациентите със захарен диабет и артериална хипертония.

Базалните мембрани са главен фокус на научен интерес поради тяхната роля в развитието на различни заболявания. Захарният диабет е едно от тях поради удебеляването на капилярните мембрани, водещо до микроангиопатични лезии. За да се проучи метаболизма на базалномембрания протеин еластин и колаген тип IV са тествани чрез ELISA за наличие на серумни ЕДП и KIVДП колаген тип IV антитела /IgG, IgA и IgM/ пациенти със ЗД тип 2 и некомплицирана АХ.

Еластинът и колаген тип IV са основните протеини на базалните мембрани. Тези протеини могат да станат имуногени, в резултат от ендотелно увреждане, поради изменения от основният болестен процес,

При настоящето проучване, което представлява продължение на изследванията ни при индивиди със захарен диабет тип 1 и артериална хипертония проследихме възможностите за преценка активността на еластиновата и колагеновата обмяна чрез имунологични техники в серуми на пациенти със ЗД тип 2 и АХ.

Засилената колагенова и еластинова деструкция при захарния диабет тип 2 води до изменения в ЕЦМ протеини или до превръщането им в имуногени, чрез денатуриране на молекулата. Резултат на този процес е отделянето в циркулацията на колагенови и еластинови деградационни продукти. Отделянето в серума на тези антигеннопроменени еластинови и колагенови пептиди стимулира имунната система към производство на съответни антитела. Анти-еластините и анти-колагеновите антитела показаха асоциация със съдовото увреждане.

При пациентите със ЗДТ2 и АХ без органични усложнения, мониторирането на плазмените маркери на търновъра на съдовите протеини еластин и колаген тип IV, може да предстат важна прогностична информация по отношение на процеса на съдовото ремоделиране, развитие и прогресия на микроваскуларните увреждания.

Хуморални и клетъчни механизми участват в началото и прогресирането на атерогенезата. Ролята на автоантителата и имунните комплекси в този процес привличат все повече вниманието на изследователите. Еластиновата антигенност и циркулиращите АЕAbs са съобщени за първи път от Щайн и сътр. [140] и повърдени от няколко последващи проучвания [169-172]. Понастоящем, два главни антигенни класа са разпознати върху еластиновата молекула: единият вид е специфичен, а другият неспецифичен и се свързва с кръстосаната реактивност. Нормално при човека се установяват много ниски нива на АЕAbs IgG, а също така и на IgA, IgM и IgD [173]. АЕAbs от различни имуноглобулинови класове се установяват при патологични състояния, но в много по-големи стойности [174,175-178a]. α -еластинът е оксалокиселинен разтворим продукт на неразтворимият „майчин“ еластин. Оксаловата киселина разделя веригата на еластина по неспецифичен начин, образувайки хетерогенна популация от пептиди вариращи от 100 до 10 kDa. По този начин се оформят голям брой антигенни места за максимална реактивност.

Едновременното наличие на АХ и ЗД тип 2 повишава общият сърдечно-съдов риск. При диабетите морбидитета е главно свързан с наличието на късните усложнения. При пациентите със ЗДТ2 и АХ, промените в ЕЦМ, които предпоставят към фиброза имат важно значение за структурните съдови нарушения, причиняващи и нарушена съдова функция. При тези пациенти серумните нива на еластиновите и колагеновите антитела корелират с наличието на микроваскуларни компликации.

Тези данни предполагат, че при мониторирането на плазмените маркери на търновъра на съдовите протеини еластин и колаген тип IV, може да предостави важна прогностична информация по отношение на процеса на съдовото ремоделиране, развитие и прогресия на съдовите увреждания.

Това проучване повдига перспективата, че неинвазивни серологични маркери на еластиновият и колагеновият тип IV метаболизъм могат да бъдат използвани, за да разяснят абнорбитета в структура и функция на съдовата стена, отговорен за съдовото ремоделиране. Това се потвърждава и от корелацията между серумните стойности на анти-еластини и анти-колагенови тип IV антитела с наличието на съдовото увреждане.

Измерването на неинвазивни маркери на еластиновата и колагеновата тип IV синтез и деградация могат да бъдат полезни както при мониторинга на развитието на васкуларни увреди, така и за терапевтичната интервенция.

Нашето проучване повдига перспективата, че неинвазивни серологични маркери на еластиновият и колагеновият тип IV метаболизъм могат да бъдат използвани при диабетици с АХ без органични усложнения, за да разяснят нарушенията в структурата и функцията на съдовата стена, отговорни в следствие за нейното ремоделиране.

Нещо повече, в бъдеще такива маркери могат да са евентуално полезни и за оценка обратното повлияване на процеса (в момента се разработват медикаменти наречени ЕЦМ-модификатори, представляващи молекули инхибитори на матриксните металлопротеази). За съжаление, има много ограничения в развиването на тези медикаменти, поради странични ефекти като тендонит. Поради широко разпространената експресия на компонентите на ЕЦМ във всички тъкани, разработването на ЕЦМ медикаменти специфични за индивидуални органи е затруднено Berk C et al, 2007 [178d] .

1. Анализ на определяне на серумните ЕДП и KIVДП при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония без органични усложнения

Обмяната на еластина и колаген тип IV при пациентите със ЗДТ2, все още не е добре проучена и резултатите се непоследователни и неубедителни. Еластиновият, колаген тип I и III и IV търновер е изследван поотделно при диабетици или при хипертоници, но при пациенти със ЗДТ2 и АХ обмяната на тези базалномембранни протеини да момента не са проучени. Знае се, че ЕДП и KIVДП намерени *in vivo*, могат да са резултат както от деградация на еластични фибри, така и да са продукт на пост-синтезно разграждане на новообразуван тропоеластин. До този момент не е установена селективна детекция на тези два типа деградационни продукти Bizbiz, 1998 EVA study [93].

Нашите резултати по отношение на по-ниските серумни ЕДП при пациентите спрямо контролите съвпадат с тези на EVA проучването (за връзката между серумните нива на ЕДП и еластазните инхибитори и наличието на ССЗ и рисковите фактори за атеросклероза) в популация от 1389 пациенти. Авторите там също установява умерено понижаване на ЕДП концентрациите при пациенти с ИБС, инсулт и диабет. ЕДП корелират с HDL и аполипопротеин А1. Възможно обяснение е, че пациентите са във фазата на късният имнунен отговор и вероятно част от циркулиращите пептиди са консумирани в ЦИК, като по този начин те се елиминират. Съществува вероятност тези пептиди да са новосинтезирани.

При пациентите със ЗДТ2 и АХ понижаваните нива на ЕДП и KIVДП и повишените нива на АЕAbs и AKIV антитела (срещу денатуриран еластин и коллаген тип IV) предполагат нарушено отношение синтеза/деградация на еластична и колагенова тъкан. Тази група пациенти представляват патологичен модел за еластинов и колагенов метаболизъм, поради абнормално акцелериран ЕЦМ метаболизъм.

Установено е, че при нормални условия с възрастта се наблюдават следните промени в нивата на ЕДП: до 7г. сравнително високо ниво, след което постепенно намалява и се стабилизира при индивидите между 18-50г., след това се наблюдава повишаване на тяхното количество в серума с напредване на възрастта, като при патологични условия количеството на ЕДП рязко се повишава;

АЕAbs нива показват следната динамика- при децата се установява сравнително високо ниво на IgG и IgM, като достигат най-високо ниво до 20г. При здравите индивиди на възраст 30-50г. нивото на IgM се стабилизира, а при IgG и до 60г. IgM започва да се понижава малко по-рано от IgG (с 10 години). След 60г. и двата класа имуноглобулини се понижават значително. При клас IgA се наблюдават други тенденции. Тяхното ниво е най-ниско при деца и индивиди до 40г., след което се покачват постепенно, а значително при абнормални условия. Вероятно причината за тези промени са същите както при здравите възрастни хора-само че изразена в патологична степен Николов и сътр. 1988.

Някои автори (Бако напр.) обаче откриват високо ниво на АЕAbs при атеросклеротично болни и при пациенти с други съдови заболявания. Те използват хетероложен еластин, откривайки антителата насочени срещу кръстосанореагиращите напречни връзки.

Нашите данни представят занижени серумни нива на пептиди/повишени нива на антитела. Нарушена е т.н. реципрочна зависимост в отношението серумни пептиди/антитела. Причините за понижението на ЕДП и КIVДП могат да се крият в повишената консумация от активно отделящите се в циркулацията антитела с последващо свързване в ЦИК и елиминирание, както и от променени еластични структури, експониращи скрити досега антигенни детерминанти. Иммунната система вероятно не може да реагира адекватно на този стимул като това води до гореописаните промени. При тези пациенти патологичният процес води до още по рязко ускоряване на еластиновата обмяна, като участват принципно същите механизми както при здравите индивиди, но изразени в патологична степен.

Известно е, че при пациентите със ЗД са ускорени процесите на еластинова и колагенова тип IV деградация и намалени тези на синтеза, докато при артериална хипертония-колагеновата тип I и III (типични за миокарда) синтеза е ускорена, а разграждането- забавено Laviades C [178a]. При пациентите с АХ до момента няма последователни изследвания за обмяната на ниво микроциркулация на типичния за малките артериални съдове колаген тип IV.

Вероятно едновременното наличие на ЗДТ2 и АХ значително дисбалансира ЕЦМ обмен и води до по-интензивно и усилено ремоделиране на съдовата стена, като е възможно е маркерите на съдовопротеинна синтеза да се понижават или алтернативно да се повишават поради наличието на диабетни усложнения и/или поради съпътващата хипертония Inikai, Arkkila 200, 2001 [178b,c]. Възможно е при тази група пациенти да е включен не „първичен“ имунен отговор с IgM или „вторичен“ с IgG, а „третичен“ с продукция на IgA имуноглобулини. В подкрепа на това са установените от нас повишени нива на IgA клас антиталата. След включването на „третичният“ отговор да се наблюдава намалена активност на имунния отговор срещу еластин и колаген. Вероятно организмът се стреми да запази хомеостазата на друго ниво и понижава продукцията на имуногенни пептиди, Николов и сътр. 1988.

Поради явни причини, пациентите в нашето проучване не прекратиха тяхната анти-хипертензивна и анти-диабетна терапия. Предишни съобщения дават сведения, че анти-хипертензивните медикаменти могат да доведат до регресия на промените в ЕЦМ. В нашето проучване не намерихме значително взаимодействие между настоящата терапия и изследваните маркери. Всъщност, важноста на наблюдаваните от нас промени досега може да е била подценявана, поради съпътващата терапия.

2. Анализ на определяне на серумните анти-еластинови антитела (IgG, IgM, IgA) при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония без органни усложнения

Артериалнат хипертония и диабетните съдови увреждания са свързани с повишена деградация на еластична тъкан. Като резултат, разтворими ЕДП се освобождават в циркулацията и са патологичен стимул за повишена продукция на анти-еластинови антитела. Нашите данни предполагат връзка между активността на еластиновата обмяна (особено повишените нива на серумни анти-еластинови антитела клас IgA) и съдовите увреждания при диабетниците с артериална хипертония.

В нашето проучване установихме, че серумните нива на АЕAbs IgG и IgM са пониски при пациентите спрямо контролите. Вероятно част от продуцираните антитела са свързани с ЕДП (тъй като вече е активирана продукцията им) и съответните ЦИК са елиминирани. Това се дължи на физиологичното участие на еластиновите антитела в елиминирането на деградационните продукти на еластина от циркулацията и от огнището на активна обмяна. Вероятно това става чрез маркиране на остарелите или променени по някаква причина еластични структури, експонирани своите антигенни детерминанти. Не е изключено в този случай да има и повишена консумация на антигени.

Установените повишени стойности на АЕAbs IgA са следствие на късният имнунен отговор срещу ЕДП. При тези пациенти патологичният процес води до още по рязко ускоряване на еластиновата обмяна, като участват принципно същите механизми както при здравите индивиди, но изразени в патологична степен.

Серумните АЕAbs IgA при пациентите със ЗД тип 2 и АХ със съдови увреждания са статистически значимо по-високи в сравнение с контролната група. Установените от нас зависимости между активността на заболяването (наличие на съдови усложнения) и находката в серума (АЕAbs IgA) може да се използва за мониториране развитието на съдови промени на ниво микроциркулация при диабетници с АХ.

При разделяне на диабетниците с артериална хипертония на две субгрупи, в зависимост от контрола на артериалното налягане според препоръките на Европейското дружество по хипертония (ESH) за прицелни стойности на АН при диабетници установихме статистически значимо повишение на стойностите на АЕAbs IgA при пациентите с незадоволителен контрол спрямо тези със задоволителен контрол ($p=0,03$). Тези данни предполагат съществуването на вероятна връзка между

промените в серумните нива на АЕAbs IgA и контрола на артериалната хипертония при диабетици.

Понижените нива на АЕAbs IgG и IgM може да се обясни с активността на фагоцитите, които претежават главно рецептори за Fc-фрагментите на IgG и IgM. По този начин елиминирането на IgG свързано със специфичен антиген ще бъде по-голям от това на IgA през късните нива на развитие на съдови увреждания. По време на “хроничната” фаза на съдови лезии серумните нива на IgM и IgG АЕAbs се понижават, а стойностите на IgA АЕAb се повишават. Присъствието на IgA може да доведе до множество от патологични процеси като формиране на имунни комплекси, активиране на комплемента и К-клетъчна медирана антияло-зависима клетъчно-медирана цитотоксична активация като всичко това допринася за прогресията на еластиновата деструкция на артериалната стена. Нещо повече, еластиновият антиген презентиращ се при местата на съдови увреди остава селективно антиген специфичен за Т- и В-лимфоцити, които биха агравирали имунният отговор. При пациентите с микроваскуларни усложнения може би това води до промяна имуногеността на еластина и чрез фиксиране на циркулиращите липиди еластина да загуби своята еластичност.

Нашите резултати показаха най-високи стойности на АЕAbs IgA при пациентите с микроваскуларни усложнения. Това подкрепя връзката между нивата на анти-еластинови IgA антитела и развитието на съдови лезии. Определянето на нивата на АЕAbs IgA може да представлява индикатор за усилен еластинова деградация и развитие на микроваскуларни усложнения. Вероятно АЕAbs IgA може да се използва като маркер за съдово увреждане, който предшества промените установяващи се със съвременни неинвазивни методи като каротидна ехография, скорост на пулсовата вълна (PWV) или ankle-brachial blood pressure index и High Resolution CT.

В заключение, тези маркери могат да предоставят средство за изучаване на еластиновият метаболизъм и потенциалната клинична роля на анти-еластиновите антитела в патогенезата и развитието на съдовите увреждания.

3. Изследване на несвързаните анти-еластинови антитела (free AEAbs)

В настоящето изследване използвахме способността на C1F-ELISA за откриване и абсорбиране на ЦИК съдържащи различни имуноглобулинови изотипове като по този начин се отстраняват ЦИК от серумните проби. След това може да бъде използвана ELISA за определянето на AEAbs които не са свързани в имунни комплекси.

Иновационна е връзката между определяне на серумните нива на несвързаните анти-еластинови антитела IgG при пациенти със захарен диабет тип 2 и есенциалната хипертония и микроваскуларните увреждания. Несвързаните анти-еластинови антитела IgG бяха определени чрез използването на двустепен метод включващ C1F-ELISA за отстраняване на имуните комплекси, последван от еластин-специфична ELISA за определяне на AEAbs.

Еластинови антитела са установени в серуми на болни и здрави лица и представляват индиректен маркер за еластиновата синтеза и деградация. Чрез ELISA установихме връзка между AEAbs IgA и развитието на микроангиопатия при пациенти със ЗД тип 2 и АХ. При тази методика обаче се определят не само “несвързаните”, а и свързаните в циркулиращи имунни комплекси /ЦИК/ антитела. Цел на настоящето проучване е да се определят нивата на “несвързаните” серумни AEAbs IgG.

За целта е приложен комбиниран вариант на ELISA, включващ два етапа – консумиране на свързаните в ЦИК AEAbs и последващо определяне на “несвързаните” серумни AEAbs. Пациентите показаха статистически значими по-високи нива на “несвързаните” серумни AEAbs спрямо контролите ($p < 0.0001$). Нивата на “несвързаните” серумни AEAbs корелират с HbA1c ($r = 0.22$); ($p = 0.04$), продължителността на диабета ($r = 0.18$); ($p = 0.05$), систоличното артериално налягане ($r = 0.15$); ($p = 0.05$), общият холестерол ($r = 0.20$); ($p = 0.03$), триглицеридите ($r = 0.21$); ($p = 0.02$).

Еластиновите фибри могат да играят определена роля при акумулацията на липиди в артериите Podet E, et.al. 1991 [166]. Нашите резултати подкрепят това твърдение. Например “несвързаните” серумни AEAbs показаха корелация с триглицеридите и общия холестерол. Значимостта на липидният профил (повишена концентрация на триглицериди и общ холестерол) също трябва да бъде взета под внимание Poulsen P, et.al 1994 [167]. Повишение в нивата на плазмените триглицериди, които са с атерогенни свойства разширява картината на диабетната дислипидемия. Това е най-честата абнормалност, срещаща се при лошо контролиран

диабет. При пациенти с микроваскуларни усложнения, отлагането на триглицериди по стените на артериите може би трансформира еластина в имуногенна форма.

Развитието на микроваскуларното заболяване е асоциирано с висок процент на HbA1c. В това изследване несвързани IgG AEAbs при диабетците от Група 1 корелираха с HbA1c ($r=0.22$); ($p=0.04$).

В това проучване стойностите на несвързаните IgG AEAbs в серумите на пациентите със съдови усложнения (Група 1) бяха отчетливо по-високи, отколкото тези на здравите контроли. AEAbs са маркери за еластиновата деградация Karapanos et al. [168] Продукцията на AEAbs от имунната система е динамична, при което част от тези антитела се свързват с ЕДП, докато други остават несвързани в циркулацията. Образуването на ЕДП, несвързани AEAbs, и еластин-антиеластин имунни комплекси може да играе важна роля в началото и прогресията на късните усложнения на диабета.

В наше предишно проучване при диабетци установихме, че повишаването на AEAbs IgM предполага инициална патологична автоимунизация към човешкия еластин, докато повишаването на AEAbs IgA- по-късна ускорена еластинова деградация и развитие на съдови увреждания. При тези изследвания, обаче не беше възможно да специфицираме кои от определените AEAbs са компоненти на имунни комплекси и кои са свободни в циркулацията. Причината е, че не всички паратопи на AEAbs са свързани със съответни еластинови епитопи. Ето защо, някои от незаетите паратопи на AEAbs, инкорпорирани в еластин-антиеластин ЦИК, реагират с човешки аортен α -еластин при стандартна ELISA за определяне на AEAbs. Имуноконюгатите, използвани за определяне на AEAbs са специфични към тежката верига на имуноглобулина, и не възможно да се определи дали установените AEAbs не са включени в ЦИК.

В настоящето проучване използвахме свойството на CIF-ELISA да открива и абсорбира ЦИК съдържащи различни Ig изотипи, като по този начин се премахват всички ЦИК от серумните проби. След това се използва ELISA за измерване на AEAbs, които не са били включени в имунни комплекси.

Нашите резултати показват, че стойностите на несвързаните AEAbs IgG на пациентите със съдови увреждания са повишени в сравнение с тези без васкуларни усложнения и здравите контроли. Значението на тази разлика е, че диабетците от Група 1 показват патологично повишен имуноен отговор към еластина и развиват васкуларни усложнения. Въпреки че, данните за пациентите от Група 2 показват нива на free AEAbs IgG по-високи от тези на контролите, тези нива са по-ниски от

измерените при пациентите със съдови увреждания. От голямо значение е да се проследи дали групата от пациенти с повишени нива на free AEAbs IgG ще развие съдови увреждания преди пациенти без такива повишени нива.

Данните, че еластинът има антигенни свойства довежда до хипотезата, че ЕДП намерени *in vivo*, като резултат от деградация или синтез, могат да стимулират автоимунен отговор Peterszegi G., 1997 [179,180]. Възможно е, някои free AEAbs детектирани от нас да формират със съответни ЕДП имунни комплекси. Еластинът може да стане субстрат за формиране на неразтворими имунни комплекси (образувани на тъканно ниво) или разтворими ЦИК в серума. Пациентите от Група 1 вероятно представляват “вторична“ активна фаза в развитието на съдови увреждания поради повишена синтеза на free AEAbs IgG. Беше установена връзка между free AEAbs IgG и HbA1c. Ние интерпретирахме корелацията между free AEAbs IgG и HbA1c в Група 1 по следният начин: Известно е, че продължителността на диабета и възрастта корелират с развитието на съдови усложнения. Гликирането на хемоглобина води до образуване на HbA1c, който е описан като продукт на Amadori, но не е продукт на късното неензимно гликиране Kennedy L., 2003 [181]. HbA1c е индикатор за гликемията от предшестващите 6-12 седмици, докато късното неензимно гликиране отразява процес продължил по-дълъг период от време Singh R., 2001 [182].

AEAbs и ЕДП са маркери за еластинова деградация. Образуването на AEAbs от имунната система е динамичен процес, като част от тези антитела се консумират чрез свързване с ЕДП докато другите се намират несвързани в циркулацията. Ние наблюдавахме най-високи нива на free AEAbs IgG при пациентите със съдови усложнения и поради това формулирахме хипотезата, че free AEAbs IgG отбелязват по-късна “вторична“ активация на деградационния процес.

Образуването на ЕДП, free AEAbs IgG и еластин-антиеластин имунни комплекси може да играе важна роля в началото и прогресирането на късните усложнения на захарният диабет. В заключение, ние предполагахме че повишените нива на free AEAbs IgG са свързани с развитието на съдови усложнения при диабетици с артериална хипертония.

4. Определяне на серумни Анти-KIV антитела (IgG, IgM и IgA) при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония без органични усложнения

В нашето проучване установихме статистически достоверно по-високи стойности на AKIV IgG при пациентите със ЗД тип 2 и АХ спрямо контролите ($p < 0.0001$), като Група 1 показва сигнификантно по-високи стойности на AKIV IgG в сравнение с пациентите без съдови увреждания ($p < 0.001$) и контролите ($p < 0.0001$). Серумните AKIV IgG корелират с наличието на ретинопатия. Този факт се потвърждава и при разделянето на диабетиците с васкуларни усложнения на две подгрупи в зависимост от наличието на ретинопатия. Пациентите с ретинопатия показват статистическо значимо повишение на AKIV IgG ($p = 0.05$).

Проведените изследвания показват, че серумните нива на Анти-KIV IgM антитела при пациенти със ЗД тип 2 и АХ са по-високи спрямо контролната група, като тези стойности са сигнификантни ($KW = 6,31$; $p = 0,01$). Група 1 (пациенти със микроваскуларни усложнения) показва сигнификантно по-високи стойности на Анти-KIV IgM в сравнение със здравите ($KW = 5,03$; $P = 0.02$). Най-високи стойности на Анти-KIV IgM се установиха при пациентите със съдови поражения (Група 1).

Известен факт е, че при артериална хипертония- колагеновата тип I и III синтеза е ускорена, а разграждането- забавено Laviades C [178a]. Колаген тип IV метаболизма при АХ не е достатъчно проучен. Установените от нас повишени антиколагеновите антитела от клас IgM и IgG вероятно са асоциирани с развитието на патологична аутоимунизация спрямо колагена. Завишените нива на AKIV IgG и IgM вероятно са белег на ускорена колагенова деградация. Тези промени доказват интензификацията на колагеновата обмяна и обясняват промените в съдовата стена. Установените промени демонстрират напреднал аутоимунен процес със завишаване на имуноглобулините от IgG и IgM-клас. Нашето проучване показва връзка между серумните нива на AKIV IgG и IgM и развитието на диабетна микроангиопатия.

Тези промени в нивата на колагеновите антитела, говорят за интензифициране на колагеновият метаболизъм, предимно в по-малките артериални съдове, съдържащи колаген тип IV и формиране на анти-колагенови антитела срещу техните разпадни продукти, които са стимул за продукция на Анти-KIV IgM и IgG антитела.

В нашето проучване установихме сигнификантно по-високи стойности на Анти-KIV IgG при диабетиците с микроваскуларни усложнения спрямо контролите. Стойностите на изследваните антитела бяха значително повишени и при пациентите със съдови поражения спрямо тези без усложнения. Добре известно е, че IgM е първият

имуноглобулинов клас синтезиран при имунният отговор, като повишените нива на колагенови IgM са ранен индикатор за колагенова деградация. Нещо повече, пациентите със съдови увреждания показваха и значително по-високи нива на Анти-KIV IgG от контролите. Това е потвърждение, че имунната система превключва имуноглобулиновата продукция от IgM към IgG клас.

Гликирането на базалномембрания KIV е главен процес, водещ до диабетни микроваскуларни усложнения. В нашето проучване открихме корелация между повишените нива на Анти-KIV IgG и развитието на диабетна ретинопатия.

Повишеното протеиново гликиране допринася за колагеновото акумулиране чрез повишена резистентност на колагеназите. Интензифицираният ЕЦМ метаболизъм води до повишаване на KIV деградационни пептиди, които са силен патологичен стимул за продуциране на специфичните антитела открити в това проучване, главно при пациентите с ретинопатия.

5.Изследване на антитела срещу късните продукти на неензимното гликиране (анти- AGEs антитела)

Редица проучвания показват, че атеросклеротичните промени при тип 2 захарен диабет предхождат диагностицирането на заболяването. Измерването на различни плазмени гликирани протеини с по-дълъг живот би позволило на клиницистите да идентифицират пациентите с дисгликемия много преди изявата на диабета и би подобрило мониторирането на ефекта от провежданото лечение.

Нашите резултати получени от изследването на пациенти със захарен диабет и артериална хипертония демонстрират, че при тях анти-AGEs антителата значително са завишени в сравнение с контролната група. Най-високи нива на анти-AGEs антитела се установяват в Група 1. В предишни изследвания е установена връзката между микроваскуларните увреди и серумните нива на анти-AGEs антителата Baydanoff S, et al. 1996 [147], Shibayama R. et al 1999 [183, 184]. Този факт поставя предположението, че повишението на анти-AGEs антителата може да бъде асоциирано с развитието на диабетни микроваскуларни увреждания. В подкрепа на това е и резултатът, че нивото на анти-AGEs антителата бе статистически значимо по-високо при пациентите с микроваскуларни увреждания спрямо контролните здрави лица. Тези данни потвърждават патогенетична роля на AGEs и анти-AGEs антителата за развитието на васкуларни увреди. Анти-AGE антителата показва корелация със систоличното артериално налягане, BMI, и нивата на общият холестерол.

Измерваните от нас анти-AGEs антитела са статистически значимо по-високи и при пациентите без съдови поражения, спрямо контролите. Тези данни подкрепят тезата за вероятна предиктивна стойност на анти-AGEs антителата при развитието на съдови увреждания.

Анти-AGEs антителата показва корелация с HbA1c. Засиленото неензимно гликиране на протеините може да бъде причина за формирането на нови AGEs епитопи на протеиновите молекули. Тези нови антигенни детерминанти могат да бъдат по-антигенни. Повишеното гликиране и формирането на AGEs по време на диабета индуцират увеличено генериране на тези антитела. Те се включват в микроваскуларното заболяване чрез формиране на имунни комплекси *in situ* и свързването на комплемента Singh R. et al 2001, 2002 [185,186], Turk, Z. 2001, 2003 [187,188].

До момента, обаче липсват мащабни проучвания в тази област. Неензимното гликиране е ускорено в условия на хипергликемия, но също така протича и при отсъствие на захарен диабет. Самият процес на късното гликиране, не причинява увреждания, а неговите продукти водят до промени в съдовата стена. В допълнение, не само серумните концентрации, но и нивата на акумулиране на тези крайни продукти са свързани с тежестта на наблюдаваните поражения. Поради тази причина може да се разсъждава, че не само тъканното AGEs ниво на отлагане допринася за съдова увреда, но и степента на тази акумулация е също от голямо значение.

Ето защо, измерването на серумните анти-AGEs антитела може да е важен индикатор за установяването на повишен риск от развитие на микроваскуларни усложнения при диабетици с хипертония.

6. Проучване на серумните AGE-ЕДП при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония

Съдовият екстрацелуларен матрикс и специално еластиновите нишки участват в процеси на деградация при стареенето и атеросклерозата. Сред параметрите, които имат роля в този процес са серумните концентрации на ЕДП и AGEs. Предишни изследвания Nicoloff et al [97,147]; Turk et al, [187,188] съобщават увеличени нива на анти-еластинови антитела, анти-AGEs антитела, ЕДП и AGEs в серум на диабетици.

Образуването и натрупването на крайни продукти на гликирането advanced glycation end-products (AGEs) в артериалната стена има ключова роля в патогенезата на микро- и макросъдовите усложнения при захарен диабет. Нарушеният метаболизъм на еластина води до промяна в интегритета на съдовата стена и допринася за появата на хроничните усложнения на заболяването. Идентифицирането на гликирани протеини с различна продължителност на полуживот, от своя страна, може да служи за оценка на диабетния контрол за определен период от време. Цел на настоящето изследване беше да се изследват нивата на гликиран еластин като маркер за отлагане на крайни продукти на гликирането в серума на пациенти със ЗД тип 2 и АХ.

В нашето проучване измерихме серумните концентрации на гликиран еластин, гликиран *in vitro* като антиген, експресиращ AGE епитопи, които са характерни за гликираните протеини. Причината за това беше, че гликирането на хемоглобина води до формиране на HbA1c, описан като продукт на Амадори, но не и като AGE продукт Kennedy, 1992 [181]. HbA1c е индикатор за гликемията от предшестващите 6-12 седмици, докато късното гликиране отразява процес, протичащ по-дълго време Singh 2001 [182].

Съществуват много хипотези за етиологията на съдовите усложнения и голяма част от тях включват промените в екстрацелуларният матрикс. От молекулите на ЕЦМ, еластинът е подходящ субстрат за тези реакции. Той има най-бавни нива на обмяна и следователно най-голяма вероятност за модифициране, дори и при много бавно протичащи химични реакции. От друга страна неговите механични свойства са изключително важни за нормалната артериална функция, тъй като той е широко засегнат при патологични процеси, не само поради загубата на неговите механични свойства, но и заради участието му като субстрат при калцификация и липидно отлагане.

Биохимичният анализ на Winlove (1996), показва, че един от всеки 5 лизинови остатъка на еластина се гликира след 12 дни инкубация при глюкозна концентрация

250 $\mu\text{mol/l}$. При дълготрайна инкубация гликирането се свързва с поява на AGE продукти. Авторите показват, че въпреки ниските лизинови нива и последващите ниски нива на гликиране на кръстосните връзки, ефектите върху физичните свойства на еластина са достатъчни, за да причинят физиологични отклонения. Тези резултати се наблюдават при краткотрайно излагане на захари, като още по-значими промени могат да се случат при *in vivo* дълготрайно излагане на глюкозно действие. Параметрите, които са свързани с този процес и са изследвани в няколко проучвания са: ЕДП и AGEs. Предишни проучвания Nicoloff et al., 2001 [155] Turk et al., 2003 [170] съобщават за повишени нива на анти-еластинови антитела, ЕДП, анти-AGE антитела и AGE продукти в серуми на диабетици.

В хода на изследването намерихме по-високи нива на гликирания еластин при пациентите със ЗД тип 2 и АХ в сравнение с контролните лица което подсказва, че гликирането на протеини е завишено при състояние на хипергликемия. Установени са корелационни зависимости между нивата на гликирания еластин в серума и систоличното артериално налягане, BMI и наличието на ретинопатия. Най-високите стойности на AGE-ЕДП са намерени при пациентите със съдови увреждания в сравнение с всички останали групи, дават основание да се предположи, че AGE-ЕДП имат отношение в развитието на микроваскуларни увреждания. Оптимизирането на гликемичния контрол би редуцирало образуването и отлагането на AGE-продукти. Изследваният от нас гликиран протеин (еластин) има значителен период на полуживот и неговото ниво може да служи за прогностичен критерий за съдова увреда.

В заключение, определянето на AGE-ЕДП и анти-AGEs антитела, биха послужили като важни индикатори за засягане на съдовата стена при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония.

VII. ИЗВОДИ

1. Определени са анти-еластиновите антитела (IgG, IgM, IgA) при диабетици с артериална хипертония без органични усложнения. Пациентите с микроангиопатия показаха най-високи нива на анти-еластинови IgA в сравнение с тези на останалите групи. Намерена е и връзка между промените в серумните нива на АЕAbs IgA и контрола на артериалната хипертония.

2. Несвързаните IgG АЕAbs се асоциират както с развитието на съдови усложнения, така и с ускорената акумулация на липиди в артериите (несвързаните IgG АЕAb сеумни нива корелират с триглицеридите, холестерола и повишеното артериално налягане).

3. Проучени са серумните AGE-ЕДП. Пациентите от групата със съдови усложнения показаха статистически значими по-високи нива на AGE-ЕДП, отколкото тези от контролната група. AGE-ЕДП имат отношение в развитието на микроваскуларни увреждания.

4. Определени са анти-колагеновите тип IV антитела (IgG, IgM, IgA) при диабетици с артериална хипертония. Серумите нива на анти-KIV IgG могат да се използват като маркер за диагнозата и прогнозата на диабетна ретинопатия.

5. Изследвахме анти-AGEs антителата. Пациентите с микроваскуларни усложнения бяха с повишени нива на имунни анти-AGEs антитела, сравнени с останалите групи. Нашето проучване показва, че изследването на анти-AGEs антителата могат да направят възможно диагностицирането и прогнозирането на тежестта на късните усложнения на диабета.

VIII. П Р И Н О С И

Приноси с оригинален характер

1. За първи път в България са проучени анти-еластинови антитела (IgG, IgM, IgA) при диабетици тип 2 с артериална хипертония без органни усложнения. Повишените нива на IgA анти-еластинови антитела показват интензивно еластиново разграждане и са свързани както с процеса на развитие на диабетна микроангиопатия, така и с контрола на артериалното налягане.

2. За първи път в България е използван метод за определяне на несвързаните IgG АЕАб в серум на пациенти със ЗД тип 2 и АХ без органни усложнения.

3. За първи път е разработен метод за определяне на серумните нива на AGE-ЕДП в серума на диабетици втори тип с артериална хипертония без органни усложнения.

4. Повишените нива на несвързани IgG АЕАbs са свързани с развитието на съдови усложнения. Несвързаните IgG АЕАbs могат да бъдат използвани като индикатор за диагноза и прогноза на микроваскуларните компликации при диабетици с артериална хипертония без органни усложнения.

5. Установихме връзка между серумните нива на AGE-ЕДП и съдовите увреждания. Измерването на AGE-ЕДП могат да бъдат полезни за мониториране на развитието и лечението на диабетните съдови увреждания.

6. Определихме Анти-KIV антитела (IgM, IgA и IgG) при диабетици с артериална хипертония. Анти-KIV IgG са свързани с развитието на диабетна ретинопатия.

Приноси с потвърдителен характер

1. Определени са анти-AGEs антитела. Нашето проучване показва, че изследването на нивата и вероятно динамиката на анти-AGEs антителата могат да направят възможно диагностицирането и прогнозирането на тежестта на късните усложнения на диабета.
2. Иммунната система взема участие във физиологичната и патологичната обмяна на съдовите протеини еластин и колаген тип IV.

IX. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **А. Николов**, Г. Николов, Ч. Алексиев, И. Цинликов, И. Цинликова, А. Блажев, С. Станаилова, Еластинов метаболизъм и атеросклероза, МЕДИНФО 06/2012, 53-57
2. **A. Nikolov**, G. Nicoloff, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, Anti-collagen type IV antibodies and the development of microvascular complications in diabetic patients with arterial hypertension, Journal of IMAB, vol. 18, book 3, (July - December), part Medicine, 315-322
3. И. Цинликов, И. Цинликова, **А. Николов**, Диабетна микроангиопатия, МЕДИНФО 01/2013
4. **А. Николов**, И. Цинликов, Г. Николов, А. Блажев, С. Станилова, Определяне на несвързани антиеластинови антитела при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония, МЕДИНФО, 01/2013
5. **А. Николов**, И. Цинликов, И. Цинликова, Г. Николов, А. Блажев, С. Станилова, М. Ангелова, А. Гарев, Анти-колагенови тип IV антитела и развитие на микроваскуларни усложнения при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония, МЕДИНФО 04/2013
6. **A. Nikolov**, G. Nicoloff, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, A. Blazhev, M. Angelova, A. Garev, Relationship between anti-elastin IgA and development of microvascular complications: a study in diabetic patients with arterial hypertension, Diabetologia Croatica, 41-3, 2012, 103-111
7. **A. Nikolov**, I. Tsinlikov, G. Nicoloff, A. Blazhev, S. Stanilova, Increased elastin turnover in diabetic patients with arterial hypertension, Central European Journal of Immunology, 2013 (in press) **IF 0,483**

X. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Nikolov A**, G. NICOLOFF. Anti-elastin IgG subclasses and microvascular complications, XIV International Symposium on Atherosclerosis, Rome, Italy, June 18-22 2006, 37
2. **A. Nikolov**, G. Nicoloff, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, Anti-collagen type IV antibodies and the development of microvascular complications in diabetic patients with arterial hypertension, 10th International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors (MDSC), Pleven, Bulgaria
3. **A. Nikolov**, G. Nicoloff, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, A. Blazhev, Relationship between anti-elastin IgA and the development of microvascular complications- study in diabetic patients with arterial hypertension, 10th International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors (MDSC), Pleven, Bulgaria
4. **A. Nikolov**, H. Feradova, V. Vutova, L. Garev, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, A. Garev, Diabetes mellitus and its late complications, 23rd International Medical Sciences Congress, Istanbul, Turkey, 2012
5. **A. Nikolov**, H. Feradova, G. Nicoloff, L. Garev, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, A. Garev, Anti-elastin IgG subclasses and microvascular complications of diabetes mellitus, XI International congress of medical sciences 03-06 May, Sofia, Bulgaria
6. **А. НИКОЛОВ**, И. Цинликов, Г. Николов, А. Блажев, С. Станилова, Определяне на несвързани антиеластинови антитела при пациенти със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония, Единадесета Национална конференция по медицинска биология, Плевен, 22-23 октомври, 2013, 8
7. **Nikolov A.**, Tsinlikov I., Tsinlikova I., Nicoloff G, Serum anti-AGE-antibodies among type 2 diabetic patients with essential hypertension, 11th International Medical Scientific Conference for Students and Young Doctors (MDSC), Pleven, Bulgaria, 2013

Участия в разработване на научни проекти през 2013г.: **P07-MU Pleven**

Клинико-имунологична връзка между промените в серумните концентрации на ендотелин-1 (ЕТ-1) и матриксните металопротеази-2 и 9 (ММП-2 и 9) при диабетици с артериална хипертония; Ръководители: Доц. Анелия Димитрова, Доц. Милена Атансова и Доц. Иван Цинликов, МУ-Плевен

ДОПЪЛНЕНИЕ

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД- 2014г.

1. **А. Николов**, И. Цинликов, Г. Николов, И. Цинликова, А. Блажев, Л. Гарев
Патологична обмяна на еластин и колаген тип IV при болните със захарен диабет тип 2 и артериална хипертония, MEDICAL MAGAZINE, 02/2014, 74-77
2. **А. Николов**, И. Цинликов, Г. Николов, И. Цинликова, А. Блажев, М. Ангелова
Късни продукти на неензимното гликиране (AGE) и развитие на микроангиопатия при болни със захаре диабет тип 2 и артериална хипертония без органични усложнения, MEDICAL MAGAZINE, 2014, (приета за публикация)

НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД- 2014г.

1. **A. Nikolov**, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, G. Nicoloff, A. Blazhev, A. Garev
ANTI-COLLAGEN TYPE IV IGG ANTIBODIES AND RISK FOR DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROSIS IN DIABETICS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION, 82nd European Atherosclerosis Society (EAS) Congress, Madrid, Spain May 31st-June 3rd, 2014, (accepted for poster presentation)
2. **A. Nikolov**, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, G. Nicoloff, A. Blazhev, A. Garev
FREE ANTI-ELASTIN IGG ANTIBODIES ARE ASSOCIATED WITH HIGH RISK OF ATHEROSCLEROSIS IN DIABETIC PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION, 82nd European Atherosclerosis Society (EAS) Congress, Madrid, Spain May 31st-June 3rd, 2014, (accepted for poster presentation)
3. **A. Nikolov**, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, G. Nicoloff, A. Blazhev, A. Garev
“ASSOCIATION BETWEEN INCREASED COLLAGEN TYPE IV TURNOVER AND LEFT VENTRICULAR HYPERTROPHY IN HYPERTONIC PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS”, Joint meeting European Society of Hypertension- International Society of hypertension (ESH-ISH), June 13-16, 2014, Athes, Greece, (accepted for poster presentation)
4. **A. Nikolov**, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, G. Nicoloff, A. Blazhev, A. Garev
“LEVELS OF CIRCULATING ELASTINANTIELASTIN IMMUNE COMPLEXES AND ANTI-ELASTIN ANTIBODIES IN SERA OF PATIENTS WITH OBESITY AND ESSENTIAL HYPERTENSION”, Joint meeting European Society of Hypertension- International Society of hypertension (ESH-ISH), June 13-16, 2014, Athes, Greece, (accepted for poster presentation)
5. **A. Nikolov**, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, G. Nicoloff, A. Blazhev, A. Garev
ANTIBODIES TO ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS AND DEVELOPMENT OF VASCULAR INJURY IN DIABETICS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION, Frontiers in CardioVascular Biology 2014, Barcelona – Spain 04 July to 06 July 2014, (accepted for poster presentation)
6. **A. Nikolov**, I. Tsinlikov, I. Tsinlikova, G. Nicoloff, A. Blazhev, A. Garev
ANTI-COLLAGEN TYPE IV IgM SERUM ANTIBODIES LEVELS ARE ASSOCIATED WITH DEVELOPMENT OF MICROANGIOPATHY IN DIABETIC PATIENTS WITH UNCOMPLICATED ESSENTIAL HYPERTENSION, Frontiers in CardioVascular Biology 2014, Barcelona – Spain 04 July to 06 July 2014, (accepted for poster presentation)