

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН
ФАКУЛТЕТ „ЗДРАВНИ ГРИЖИ”**

=====

КАТЕДРА „СЕСТРИНСКИ ТЕРАПЕВТИЧНИ ГРИЖИ”

Доц. Д-р ПЛАМЕН ЦВЕТАНОВ ГЕОРГИЕВ, д.м.

**КЛИНИКО-ИМУНОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА ПРОМЯНАТА В
МЕТАБОЛИЗМА НА ЕКСТРАЦЕЛУЛАРНИ МАТРИКСНИ
ПРОТЕИНИ И БИОМАРКЕРИ ЗА ВАСКУЛАРНА УВРЕДА ПРИ
ИСХЕМИЧНА МОЗЪЧНО-СЪДОВА БОЛЕСТ И ДИАБЕТНА
ПОЛИНЕВРОПАТИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на научната степен
“ДОКТОР НА МЕДИЦИНСКИТЕ НАУКИ”

Официални рецензенти:

Чл.кор. проф. д-р Иван Миланов, д.м.

Проф. Д-р Стефка Янчева, д.м.

Доц. д-р Красимир Генов, д.м.

Плевен, 2014 г

Дисертационния труд съдържа 181 стандартни машинописни страници, 14 таблици и 14 фигури. Книгописът включва 763 заглавия, от които 8 на кирилица и 755 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична предзащита от разширен Катедрен съвет на Катедра по „Сестрински терапевтични грижи” на Медицински Университет – Плевен.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои наотч. в....., съобразно заповед на ректора, пред научно жури в състав:

1. Чл.кор. проф. д-р Иван Миланов, д.м.
2. Проф. Д-р Стефка Янчева, д.м.
3. Проф. Д-р Ивайло Търнев, д.м.
4. Доц. д-р Красимир Генов, д.м.
5. Доц. д-р Емилияна Конова, д.м.
6. Доц. д-р Бойко Стаменов, д.м.
7. Доц. д-р Димитър Чакъров, д.м.

Материалите по защитата се намират на разположение на интересуващите се при доц. д-р Фредерик Григоров в катедра „Сестрински терапевтични грижи” на адрес:

гр. Плевен 5800, бул. „Св. Климент Охридски” 1
Медицински Университет - Плевен
Факултет „Здравни грижи”

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Въведение	5
2. Цел и задачи	6
3. Клиничен контингент и методи	8
4. Резултати от собствени проучвания	15
4.1 Промяна в метаболизма и корелации на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП в ликвор и серум на болни с ИМИ в остра фаза	15
4.2 Промяна в метаболизма и корелации на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП при болни с асимптомна ИМСБ, ИМИ в хронична фаза и контролна група	24
4.3 Промяна в метаболизма и корелации на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП при болни с ДПНП	32
5. Обсъждане на резултатите	38
6. Изводи	55
7. Приноси	57
8. Публикации и цитирания	59

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Използвани съкращения на думи и изрази на български език

ИМИ	Исхемичен мозъчен инсулт
ДПНП	Диабетна полиневропатия
МСБ	Мозъчно-съдова болест
ЕМГ	Електромиография
ЗД	Захарен диабет
ЕЦМП	Екстрацелуларни матриксни протеини
ММП	Матриксни металопроотеинази
ОСА	Обща сънна артерия
ВСА	Вътрешна сънна артерия
КТ	Компютърна томография
МРТ	Магнитно-резонансна томография
ГМК	Гладкомускулна клетка
АТ	Антитела
ССЗ	Сърдечно-съдови заболявания

Използвани съкращения на думи и изрази на английски език

AGE	Advanced Glycation End Products (късни продукти на гликиране)
Ab	Антитела
CIC	Циркулиращи имунни комплекси
EDP	Еластин деградационни пептиди
E-AGE	Гликирани еластин деградационни пептиди
CIVDP	Колаген тип IV деградационни пептиди
TE	Тропоеластин
MMP	Матриксна металопроотеиназа
AEAT	Антиеластинови антитела
ACIVAT	Анитколаген тип IV антитетела
ATEAT	Антитропоеластинови антитела
hsCRP	Високочувствителен С реактивен протеин
HbA1C	Гликиран хемоглобин
ABI	Ankle Brachial Index
IMT	Intima Media Thickness
BMI	Body Mass Index
MCV	Моторна скорост на провеждане
CMAP	Смесен мускулен акционен потенциал
SCV	Сетивна скорост на провеждане
SNAP	Сетивно нервен акционен потенциал

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Сърдечно-съдовите заболявания (ССЗ), миокардният инфаркт, сърдечната недостатъчност и мозъчният инсулт са водеща причина за смърт в развитите страни, съставляващи половината от общия брой смъртни случаи. Поради бързо нарастващия брой диабетици в целия свят, захарният диабет (ЗД) и неговото най-често усложнение - диабетната полиневропатия (ДПНП) добиват все по-голяма важност. Най-тежкият симптом на ДПНП – диабетното стъпало, води до инвалидизиране на болните, а понякога дори и до смърт. Високата болестност от исхемична мозъчно-съдова болест (ИМСБ) и ЗД и все по-честото засягане на млади хора застрашават демографските показатели на съвременното общество.

Всичко това налага разработване на нови терапевтични и профилактични стратегии. Тяхната ефективност се оценява основно на базата на болестните последици, което налага включване на голям брой пациенти и дългосрочно проследяване. Затрудненията от подобен характер се преодоляват в значителна степен след откриване и внедряване в клиничната практика на т.нар. “сурогатни” биомаркери. От тях, ангиографията на артериалните съдове си остава „златен стандарт” за оценка тежестта, локализацията и скоростта на прогресия на атеросклеротичния процес. Интраваскуларната магнитно-резонансна томография (МРТ) и интраваскуларната доплерова сонография предоставят нови диагностични възможности за определяне обема на атеросклеротичната плака. Тези инвазивни съдово-изобразителни изследвания ангажират значителен финансов ресурс и обучен персонал, поради което не са общодостъпни.

Установяването на комплексния характер на причините за васкуларна увреда (при 20-50% от пациентите със съдови заболявания не се откриват конвенционални рискови фактори), както и корелацията на възпалителните и атеросклеротични процеси, спомогнаха за откриване и внедряване в клиничната практика на серумните циркулиращи биомаркери. От този нов клас сурогатни биомаркери, най-обстойно е изследван С-реактивният протеин (CRP). На този етап обаче, няма нито едно клинично проучване, което да установява сигнификантна редукция на сърдечно-съдовия риск при съответно намаление на CRP.

Матриксните металопроотеинази (ММП) са голяма група цинк-съдържащи протеолитични ензими, които в норма регулират състава на екстрацелуларния матрикс. Увеличението на техните серумни нива - показател за повишено разграждане на екстрацелуларните матриксни протеини, корелира с повишен риск от мозъчен инсулт и сърдечно-съдова смъртност. Съвременните съдово-изобразителни методики установяват, че лезията на „фиброзната шапка” се явява основен патогенетичен механизъм за превръщане на стабилната (неактивна) в нестабилна (активна) плака. Като се има предвид, че тази обвивка е съставена основно от еластин и колаген - субстрати на ММП, логично възниква хипотезата за възможна корелация на промяната на техния

метаболизъм и процесите на трансформация на плаката.

В последните години се натрупаха значително данни, които показват, че неензимното гликиране на протеините е основната причина за съдови усложнения при ЗД. Продукцията на късни продукти на гликирането (AGEs) индуцира производство на възпалителни медиатори от макрофагите, които от своя страна стимулират пролиферацията на ГМК. Неензимното гликиране на ЕЦМП се приема като основна причина и за намаления еластичитет на артериите при диабетно болни. Нерешен на този етап остава въпросът за увреждащата роля на синтезираните срещу гликираните пептиди антитела и формирани имунни комплекси при пациентите с ДПНП.

Тези и други нерешени на този етап въпроси при ИМСБ и ДПНП ни мотивираха да проведем настоящото проучване.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ:

Клинико-имунологично проучване върху диагностичната стойност на комплекс от маркери, отразяващи промени в метаболизма на екстрацелуларните матриксни протеини еластин, тропоеластин и колаген тип IV, за оценка на съдовата увреда при исхемична мозъчно-съдова болест и диабетна полиневропатия.

ЗАДАЧИ:

1. Да се разработят имунологични методи за определяне в ликвор на нивата на циркулиращи екстрацелуларни матриксни протеини - еластин, тропоеластин и колаген тип IV, както и на автоантителата срещу тях.
2. Разработените методи да бъдат приложени за изследване на посочените показатели в ликвор на здрави контроли, както и на следните клинични групи: 1/ пациенти с остър исхемичен инсулт; 2/ исхемична мозъчно-съдова болест; 3/ диабетна полиневропатия.
3. Чрез анализ на получените резултати при изследваните клинични групи пациенти, сравнени с тези при здрави контроли, да се определят промените в метаболизма на екстрацелуларните матриксни протеини, характерни за съответните нозологични единици.
4. Да се изследват корелациите на изследваните имунологични показатели с демографски, клинични, невроизобразяващи, съдовоизобразяващи и електроневрографски показатели.
5. Да се изследват прогностичните и диагностични корелации на изследваните имунологични показатели с показателите, отразяващи настъпилата увреда при мозъчно-съдова болест и диабетна полиневропатия.
6. Да се проучи увреждащата роля на антиеластин, антитропоеластин и антиколаген тип IV антитела и циркулиращите имунни комплекси върху съдовата стена, както и тяхната самостоятелна и комбинирана диагностична стойност за оценка на риска от руптура на атеросклеротичната плака.
7. Да се проучат прогностичните възможности на hsCRP, гликиран хемоглобин и гликиран еластин за развитие на съдови и перифернонервни увреди при пациенти със захарен диабет.

3. КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ

3.1 КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ

Клиничното изследване, диагностицирането и проследяването на пациентите е осъществено в периода 2007-2011 година в Неврологично отделение на УМБАЛ - Плевен, неврофизиологичен кабинет към ДКЦ -Плевен при УМБАЛ „Д-р Георги Странски” ЕАД - Плевен, МЦ „Медика 2005” ЕООД - Видин, АИПСИПНБ”Академика”ЕООД - Плевен.

Пациентите са набирани мултицентрово, амбулаторно и от неврологични отделения на област Видин, Плевен, Враца и Ловеч след получаване на информирано съгласие от болните или техните близки.

Имунологичните изследвания са извършвани в Сектор по Биология на Медицински университет - Плевен. Лабораторните изследвания са проведени в Клинична лаборатория на УМБАЛ „Д-р Георги Странски” ЕАД - Плевен. Изследванията са осъществени със средства по научен проект №8 (2009 год.) от бюджета на Медицински Университет – Плевен и са одобрени от местна етична комисия.

Включените в проучването болни (n=245) се разпределят в **две клинични групи:**

1) Ишемична мозъчно-съдова болест (n=188):

- Подгрупа от 69 болни с клинично и КТ верифициран ишемичен мозъчен инсулт в остра фаза с давност 0 - 4 ден от началото на инсулта (средно 2,5 дни), а при 17 болни (25%) с давност <3 часа. Клиничните показатели са определяни при приема и повторно между 20-30 ден от началото на инсулта.
- 1. Подгрупа от 68 пациенти с клинично и КТ верифициран ИМИ в хронична фаза (средно $18 \pm 4,4$ дни от началото на заболяването)
- 2. Подгрупа от 51 пациенти с асимптомна ИМСБ (пациенти със задебеление на интимата и медията $>1,3$ mm, асимптомни каротисни стенози, асимптомни мозъчни инфаркти, ишемични лезии на перивентрикулното и дълбокото мозъчно вещество, мозъчни атрофии)

2) Захарен диабет тип II (n=57)

- Подгрупа от 37 болни с клинично и неврографски потвърдена диабетна полиневропатия (ДПНП)
- Подгрупа от 20 болни без клинични и неврографски данни за наличие на ДПНП

От проучването се **изключват 12 болни с:**

- Хеморагичен мозъчен инсулт
- Рентгенографски верифициран белодробен емфизем

- Системно аутоимунно заболяване и такива на имуномодулираща или кортикостероидна терапия
- Неопластично злокачествено заболяване
- Остро инфекциозно заболяване
- Полиневропатия от недиабетен произход
- Чернодробна недостатъчност

Участниците в **контролните групи** са включени след получаване на информирано съгласие и са разпределени както следва:

- Контролна група от 21 лица с нормални ликворологични показатели. Всички са с нормален неврологичен статус, хоспитализирани по повод на първоначална суспекция за субарахноиден кръвоизлив и менингит, отхвърлени след клинични, СТ и лабораторни изследвания (вкл. цереброспинален ликвор).
- Контролна група от 31 лица с нормални резултати от ултразвуковото изследване на мозъчните артерии, нормален неврологичен, психичен и соматичен статус и без анамнеза за мозъчно-съдова болест (вкл. преходни исхемични нарушения).
- Контролна група, състояща се от 37 участника с нормални неврографски показатели, неврологичен, психичен и соматичен статус и без анамнеза за нарушен глюкозен метаболизъм. Част от контролната група (n=29) са здрави индивиди, включени в проучването след информирано съгласие. Останалите (n=8) са изследвани по повод на ишиалгични оплаквания, без сетивен и/или двигателен дефицит и с нормални параметри от неврографията на сетивни и двигателни нерви (вкл. късни отговори).

Използват се следните методи:

3.2 МЕТОДИ

3.2.1 КЛИНИЧЕН МЕТОД

Снета е подробна анамнеза, соматичен и неврологичен статус при всички пациенти. За целите на проучването са използват следните клинични скали:

- етиологично и патофизиологично болните с исхемичен инсулт са класифицирани по критериите на **TOAST (Trial of Org10172 in Acute Ischemic Stroke)** като кардиоемболични, атеротромботични, лакунарни и такива с неопределена етиопатогенеза.
- Клиничната тежест на инсулта е оценяван съобразно **Canadian Neurological Scale (Канадска Неврологична Скала)**.
- Инвалидността на болните е оценявана при изписването им от болницата по модифицираната 5-степенна скала на **Rankin**.
- Мускулната сила се оценява по критериите на **Medical Research Council Scale (MRC)**.

- Когнитивните функции на болните са оценявани чрез **Mini Mental State Examination (MMSE)**.
- Локализацията и размера на исхемичната лезия е определяна по критериите на **Oxfordshire Community Stroke Project (OCSP)**
- ДПНП е клинично диагностицирана по критериите на **EURODIAB IDDM Complications Study**.

3.2.2 СЪДОВОИЗОБРАЗЯВАЩ МЕТОД

Болните са изследвани от квалифицирани и сертифицирани специалисти по Дуплекс/доплерсонография с ултразвуков апарат Phillips SONOS 5500, Acuson Sequoia 512, Vingmed System Five. Трудните за интерпретация случаи са консултирани със специалисти от Университетска болница „Царица Йоанна-ИСУЛ“.

Определяни са следните параметри:

- **Тежест на стенозиране.** Двете каротидни артерии са изследвани с B-mode, colour Doppler и pulsed-wave Doppler с 5-10 MHz ултразвуков трансдюсер. Съгласно критериите на консесуса за Доплерова ултразвукова диагностика на стеноза на вътрешна сънна артерия стенозата е определяна като несигнификантна (<50%) при $PSV < 125$ cm/sec, и сигнификантна (>70%) при $PSV > 230$ cm/sec. В случай на двустранна стеноза или множество плаки се анализират показателите на каротидната плака с най-висока степен на стенозиране.
- **Морфология на плаката.** Плаките се дефинират като локализирана протрузия на съдовата стена към лумена с площ с 50% по-голяма от intima media thickness на съседните части от стената на артерията. Морфологията на плаката е оценявана на основа на нейната ехогенност според критериите предложени от Gray-Weale. Ехогенността на плаката се класифицира в две категории: ниско и високо ехогенна. Плаките са класифицирани съобразно тяхната структура на хетерогенни или хомогенни. Повърхността на плаката е определяна като регулярна (гладка) или нерегулярна (при вариации на височината на контура на лезията между 0,4 и 2 mm).
- **Intima Media Thickness (IMT).** IMT е определян по стандартен протокол с 7,5 MHz трансдюсер за обща сънна артерия (OCA) и 5,0 MHz трансдюсер за вътрешна сънна артерия (BCA).
- **Ankle Brachial Index (ABI).** Посредством Доплеров детектор е измервано систоличното артериално налягане на брахиалната артерия на двете ръце в антекубиталната ямка и систоличното артериално налягане над двата глезена над лява и дясна a. tibialis posterior и a. dorsalis pedis. Изчисляван е ABI отделно за ляв и десен долен крайник, като абнормни се считат стойностите на ABI <0,9, отговарящи на >50% стенозиран участък, локализиран между аортата и дисталните артерии на долни крайници.

3.2.3 НЕВРОФИЗИОЛОГИЧЕН МЕТОД

Изследванията се провеждат на 4 канален апарат **Toennies-Multiliner модел 3.1** със стандартни, доставени от производителя електроди. Прилагат се общоприети неврографски техники за сетивни и моторни двигателни влакна. Изследванията са извършвани лично от дисертанта, сертифициран специалист по клинична електромиография.

Определяни са: скорост на провеждане, дистална латентност, амплитуди на СМАР и SNAP отговори на дисталните нерви на горни (n. medianus, n. ulnaris) и долни крайници (n. peroneus, n. tibialis, n. suralis) двустранно. Използвана е стандартна стимулация на периферните нерви и отвеждане с повърхностни електроди. Амплитудите на СМАР и SNAP са измервани от изоелектричната линия до негативния пик. Дисталната латентност на моторните влакна е измервана до инициалната дефлексия на СМАР, а тази на сензорните влакна до инициалната негативна дефлексия при бифазичен и до инициалния позитивен пик при трифазичен SNAP.

3.2.4 НЕВРОРЕНТГЕНОЛОГИЧЕН МЕТОД

Компютъртомографско (КТ) изследване е проведено при всички болни с исхемичен инсулт на апарат Siemens-Somatom ARC5 при дебелина на срезите 5 mm, като обхваща всички нива на изследване на главния мозък. Повторно КТ изследване се провежда при болни, за които клинично се подозира невизуализирана исхемична лезия.

В зависимост от получените КТ резултати болните се разпределят в следните подгрупи:

- a) съобразно локализацията, исхемичните лезии се разпределят в 3 подгрупи: корова, подкорова и смесена локализация.
- b) съобразно големината по на инфарктната зона са определят следните подгрупи: обширен инфаркт; тотален СМА инфаркт; ограничен инфаркт и лакунарен инфаркт (диаметър по-малък от 1,5 cm).
- c) Отчита се наличието или отсъствието на корова атрофия, нейната локализация (фронтална, темпорална, париетална или дифузна).

3.2.5 ЛАБОРАТОРЕН МЕТОД

Лабораторните показатели се определят паралелно в серума и ликвора на болни с клинично и КТ верифициран исхемичен мозъчен инсулт, в серума на пациенти с ИМСБ, в серума на болни с клинично и ЕМГ верифицирана диабетна полиневропатия и в серума на контролните групи здрави лица. Спазени са изискванията на Комисията по етика на научноизследователската дейност при Медицински университет – Плевен.

Провеждани са следните лабораторни и специфични имунологични процедури и са определяни показателите:

- **Еластинов антиген.** Материалът за изолиране на еластин е получен от аорта на 30-годишен мъж, загинал при катастрофа, без микро- и макроскопски видими нарушения на аортната стена. Неразтворим еластин е

получен по метода на Barnard и съавт. (1982) и е използван за получаването на разтворим еластин по методиката на Partidge и съавт., (1955).

- **Имунен серум срещу човешки еластин.** Заешки и овчи имунен серум срещу човешки α -еластин е получен по метода на Baydanoff и съавт., (1987).
- **Аминокиселинен анализ на човешки аортен еластин** е извършен по метода на Baydanoff и съавт., (1987).
- **Определяне на EDP в серум и ликвор и тропоеластин в серум.** Използва се метод на принципа на ELISA, разработен от Baydanoff и съавт., (1987) за серума и опимизирана за ликвор от Nikoloff и Tzvetanov, (2008). Използва се метод на принципа на ELISA, разработен от Baydanoff и съавт., (1987) за серума и опимизирана за ликвор от Nikoloff и Tzvetanov, (2008). Полистиреновите плаки се накапват с 10 $\mu\text{g/ml}$ заешки антиеластинови/антитропоеластинови IgG при инкубация за 3 h на 37°C и една нощ на 4°C. Следва запълване на кладенчетата на плаките с 100 μl от тествания серум (разреждане 1:5) или ликвор (без разреждане) и инкубация за 1 h на 37°C. След инкубация с антиовчи IgG пероксидазен имуноконюгат (Sigma, USA), разреден 1:10 000 реакцията се стопира с 50 μl 8N сярна киселина. Резултатите се отчитат на апарат MicroELISA Reader 210 (Organon Teknika, Belgium) при дължина на вълната от 492 nm.
- **Определяне на CIVDP в серум и ликвор.** Използва се метод на принципа на ELISA, разработен от Nikoloff и съавт., (2000). Всяко кладенче се сенсibiliзира със 100 μl 10 $\mu\text{g/ml}$ анти-човешко CIV моноклонално антитяло (C1926, Immunogen: human collagen type IV, Sigma, USA) и престоява на стайня температура за 3 h и една нощ на 4°C. Антитялото разпознава епитоп локализиран на 1 и/или $\alpha 2$ верига от човешки колаген тип IV. Блокирането на останалите незаети места от полистиреновите кладенчета се извършва чрез инкубация за 24 h с 1% разтвор на говежди серум албумин (BSA) (Sigma, USA) във фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS), pH 7,4, съдържащ 0,05% Tween 20. След това по 100 μl от серумните (разредени 1:5) и ликворни проби (неразредени) или чист човешки CIV, разграден с пепсин (0 - 600 ng/ml, Sigma, USA) се поставят във всяко кладенче и се инкубират за 1 h на 37°C. 100 μl от второ антитяло (мишо анти-човешко CIV моноклонално антитяло) конюгирано с хрянова пероксидаза (HRPO) по метода на Wilson and Nakane (28) (разредено 1:2 000, Sigma, USA) се прибавя във всяко кладенче и престоява на 37°C за 1 h. о-фенилендиамин (0,4 mg/mL) се разтваря в цитратен буфер и по 100 μl от този разтвор се прибавят към всяко кладенче за 30 min. Реакцията се стопира с 50 μl 8N сярна киселина. Резултатите се отчитат на апарат MicroELISA Reader 210 (Organon Teknika, Belgium) при дължина на вълната от 492 nm.
- **Индиректна ELISA за тестиране на анти- α -еластинови, антитропоеластинови и антиколаген тип IV антитела от клас IgG, IgM и IgA в човешки серум и ликвор.** Микротитърните плаки (Microlon U-bottom,

high binding, Greiner Bio One, Frickenhausen Germany) се сенсibiliзират съответно с човешки аортен α -еластин (EPC-USA), тропоеластинов антиген или човешки плацентарен колаген тип IV (Sigma) в концентрация 10 $\mu\text{g/ml}$ в карбонатен буфер с pH 9,6, по 100 μl в кладенче. След инкубация за 2 h на 37°C и една нощ на 4°C, кладенчетата се блокират с 0,1% говежди серумен албумин и инкубират за 1 h на 37°C. Тестираните серуми, разредени 1:40 в PBS-Tween, се накапват по 100 μl в кладенче и се инкубират за 1 h на 37°C. Следва накапване на анти-човешки IgG или IgM пероксидазен конюгат (Sigma) в разреждане съответно 1:16 000 и 1:20 000 и инкубация за 1 h на 37°C. Като колориметричен субстрат се използва 0,8 $\mu\text{g/ml}$ О-фенилендиамин (Sigma), разтворен в 0,05 M цитратен буфер (pH 5,0) с 0,01% H_2O_2 . Кладенчетата се промиват трикратно с PBS-Tween 20 след всеки етап на тестирането. Реакцията се спира с добавянето на 50 μl 8N H_2SO_4 и абсорбцията се измерва на автоматичен MicroELISA Reader, при дължина на вълната 490 nm. Използват се следните контроли: (1) субстратна контрола: в сенсibiliзираните с еластин или колаген кладенчета се добавя само буфер за разтваряне на пробите и колориметричен субстрат; (2) конюгатна контрола: пероксидаза-конюгираното антитяло се добавя директно към сенсibiliзираните с антиген кладенчета; (3) отрицателна контрола за оценка на специфичността на реакцията: антигенът се замества с разтвор на човешки серумен албумин (4) положителна контрола: тестираните серуми се заместват с анти- α -еластинови или анти-колаген тип IV поликлонални антитела (Elastin Product Company, USA), разтворени 1:2000 в буфер за серуми. Всички серуми се тестват трикратно и се изчислява средна аритметична стойност \pm SE.

- **Определяне на свободни АЕАТ** е извършено по метод разработен от Baydanoff и съавт., (1988).
- **Определяне на E-AGE в човешки серум** е по метод разработен от Baydanoff и съавт., (1996).
- **Имунен серум срещу E-AGE** е получен по метода разработен от Baydanoff и съавт., (1996).
- **Определяне на анти-E-AGE антитела в човешки серум** е извършвано по метода на Baydanoff и съавт., (1996) на основата на блокираща се ELISA.
- **Зимография** е използвана за определяне на желатинолитичната активност на MMP-2 и MMP-9 в приготвен разделящ гел 7% акриламид в съотношение акриламид/метабисакриламид 1:30 с 0,1% желатин. Тестираните серуми и стандартите за молекулно тегло (20 μg) са разделени на апарат за вертикална електрофореза (Scie-Plas UK). След това геловете са промити с ренатурационен буфер (2,5% TritonX-100, pH 7,5) за 1 h. Следва инкубирането им за 18 h на 37°C в инкубационен буфер (0,2 M NaCl, 5 mM CaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7,5). Ивиците, получени от ензимното разграждане на желатина са визуализирани след оцветяване в Coomassie brilliant Blue G-250 за 3 h и обезцветяване с метанол и оцетна киселина. Ензимната

активност е потвърдена при инкубиране на идентични гелове в идентични буфери, но с добавка на 20 mM EDTA. За оценка на желатинолитичната активност на тестираните серуми, геловите са сканирани и ивиците, показващи разграждане на желатин са измерени с програмата ImageJ в относителни единици (OE).

- **Имуноблот.** Експресията на MMP-9 и MMP-2, както и на EDP ликвора е потвърдена с Western blot анализ. Част от геловите, получени при електрофорезата, са прехвърлени чрез мокър електротрансфер (LKB Bromma 2005 Transphor) върху нитроцелулозна хартия, за 24 h, на 40 mA. След блокиране на неспецифичното свързване в 5% говежди серумен албумин, разтворен в TRIS буфер и 0,1% Tween (TBS -T), за 1 h, мембраната е инкубирана с анти тяло срещу човешка MMP-9 или MMP-2, произведено в заек (Sigma, Saint Louis, USA), за 2 h, в разреждане 1:500. Следва инкубиране с вторично пероксидаза-конюгирано анти-заешко анти тяло (Бул Био, София), в разреждане 1:1000, за една нощ на 4°C. Като колориметричен субстрат е използван 0,8 mg/ml ортофенилендиамин и 0,1% H₂O₂.
- **Количествено определяне на албумин в ликвор чрез електроимунодифузия по Laurel.** Методът се характеризира с голяма точност и възпроизводимост, позволяващ идентифицирането на антигени в количества по-малки от 0,1 mg/l.
- **Серумен холестерол, триглицериди, липопротеини с висока и ниска плътност** са определят чрез ензимен анализ (Boehringer Mannheim).
- **Плазмена концентрация на С реактивен протен** количествено се определя чрез латексов турбидиметричен имунологичен метод (Cobas Integra C Reactive Protein, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Нормалните граници са 0 - 0,75 mg/dl.
- **Гликираният хемоглобин** е определян чрез елуентна колонна хроматография (референтни граници 4 - 6%).
- **Плазмените нива на глюкоза** се определят като кръвта е събира в епруветки с гликолитичен инхибитор и се анализира в рамките на 3 до 4 h в централна лаборатория по GOD-PAP глюкозо-оксидазен метод (Boehringer Mannheim) на биохимичен анализатор Hitachi 705 (Boehringer Mannheim).

3.2.6 СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОД

Статистическата обработка на данните се извършва чрез софтуерната статистическа програма Statgraphics Plus Version 2.1. За анализ на резултатите се използван корелационен анализ на Pearson и рангов корелационен анализ на Spearman. Средните величини са сравнявани с еднофакторен вариационен анализ (ANOVA), а медианните стойности с Н-критериите на Kruskal Wallis. За статистически достоверни са приети резултатите с нива достоверност $p < 0,005$.

4. РЕЗУЛТАТИ ОТ СОБСТВЕНИ ПРОУЧВАНИЯ

4.1 Промяна в метаболизма и корелации на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП в ликвор и серум на болни с ИМИ в остра фаза

4.1.1 Демографска, клинична и КТ характеристика на болните с ИМИ в остра фаза и контролна група

С цел проучване на промените в метаболизма на EDP в остра фаза на исхемичен инсулт ние сме изследвали показателите на еластиновия метаболизъм при 69 (76,7%) болни с остър исхемичен инсулт и 21 (23,3%) контролни лица.

Участниците в контролната група са здрави индивиди, които са хоспитализирани по повод на първоначална суспекция за субарахноиден кръвоизлив или менингит, отхвърлени след клинични, КТ и лабораторни изследвания (вкл. на ликвор). Всички са с нормални ликворологични, хематологични и биохимични показатели и нормален неврологичен статус.

Анализирано е разпределението по пол и възраст в контролната и клиничната групи. Участниците се разпределят в групи под 60 и над 60 години въз основа на литературните данни за достоверни различия в метаболизма на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП съобразно тази възрастова граница.

Не се установява съществена разлика в разпределението на контролната група ($p=0,05$) и болните с остър ИМИ по пол и възраст ($p>0,05$).

Болните с остър исхемичен инсулт са хоспитализирани в рамките на 2,5 (0 - 4) дни от началото на симптоматиката, а 25% от тях до 3-ия час. Клиничните показатели са определяни при приема и повторно между 20-30 ден след началото на инсулта.

Клиничната и демографска характеристика на болните с исхемичен инсулт и клиничната група е представена на Табл. 1. Установяват се достоверно по-високи стойности на BMI, алкохолната консумация и давността на хипертонията в групата на пациентите с остър исхемичен инсулт.

Процентното разпределение на болните съобразно вида, големината, локализацията, броя на лезиите не показва съществени различия ($p>0,05$), с изключение на по-малкият ($p<0,05$) процент пациенти с обширен исхемичен инсулт.

Табл. 1. Демографска и клинична и КТ характеристика на болните с ИМИ в остра фаза и контролна група

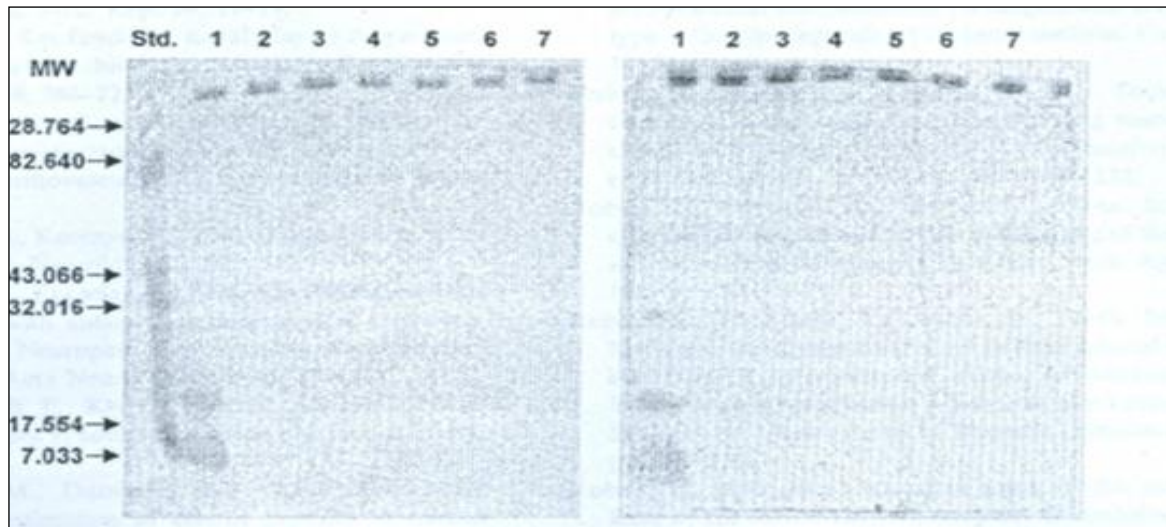
	Контролна Група (n=21)	ИМИ в остра фаза (n=69)	P
Възраст (год)	58,4 ± 12,3	62,8 ± 9,4	NS
Мъже n (%)	47,6	59,4	NS
Артериална хипертония (%)	33,3	44,9	NS
Давност на хипертонията (години)	3,75 ± 1,5	10,4 ± 4,5	0,04
Захарен диабет тип II n (%)	-	23,2	-
Давност на диабета (години)	-	15,5 ± 6,5	-
Тютюнопушене (брой цигари/ден)	3 (0 - 22)	5 (0 - 12)	NS
Алкохол (g/седм)	13 (0 - 340)	55 (0 - 355)	0,04†
BMI	23,6 ± 5,3	28,3 ± 6,2	0,03
Засегната лява хемисфера (%)	-	51,1	-
MRC (в началото)	-	3,6 ± 1,5	-
MRC (20-30 ден)	-	4,2 ± 1,1	-
Ранкин (20-30 ден)	-	1,6 ± 0,8	-
Корова локализация (%)	-	13,0	-
Подкорова локализация (%)	-	21,7	-
Смесена локализация (%)	-	23,9	-
Лакунарен инфаркт (%)	-	13,0	-
Ограничен инфаркт (%)	-	41,3	-
Обширен инфаркт (%)	-	8,7	-
Статус лакунарис (%)	-	46,7	-
Мултиинфарктни лезии (%)	-	30,4	-
Корова атрофия (%)	-	43,5	-

† Kruskal-Wallis Test при разпределение различно от нормалното; NS, несигнификантна стойност; BMI, боди мас индекс; MRC, Medical Research Council тест; ИМИ, исхемичен мозъчен инсулт

4.1.2 Промяна в метаболизма на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП в серум и ликвор на болни с остър ИМИ

Първоначално е проведен Western blot анализ за определяне на EDP в гръбначно-мозъчната течност. В ликвора на пациент с ИМИ се установява

наличие на EDP, чиято антигенна специфичност се доказва от свързаните с две от фракциите им АЕАТ (Фиг. 1)



Фиг. 1. Човешки α -еластин, установен в цереброспинална течност чрез Western blot анализ при пациент с исхемичен инсулт (от лявата страна) и при здрав индивид от контролната група (от дясната страна). Стрелките показват молекулярните тегла (MW) на стандартите: β -галактозидаза (128,64 kDa), говежди серумен албумин (82,640 kDa), въглеродна анхидраза (43,066), трипсинов инхибитор (32,016 kDa), лизозим (17,554 kDa), апотропин (7,033 kDa) и 1-еластин, 2-колаген I, 3-колаген III, 4-колаген IV, 5- колаген V, 6- ламинин, 7-фибронектин. (G. Nikoloff, P. Tzvetanov, P. Christova, S. Baydanoff. *Neuropeptides* 42 (2008) 277-282)

Сравнени са серумните и ликворни концентрации на EDP и нивата на АЕАТ на болните с остър ИМИ с тези на контролните лица (Табл. 2). Ликворните и серологични проби са изследвани едновременно, средно на $5,0 \pm 4,9$ (1 - 10) дни от началото на инсулта.

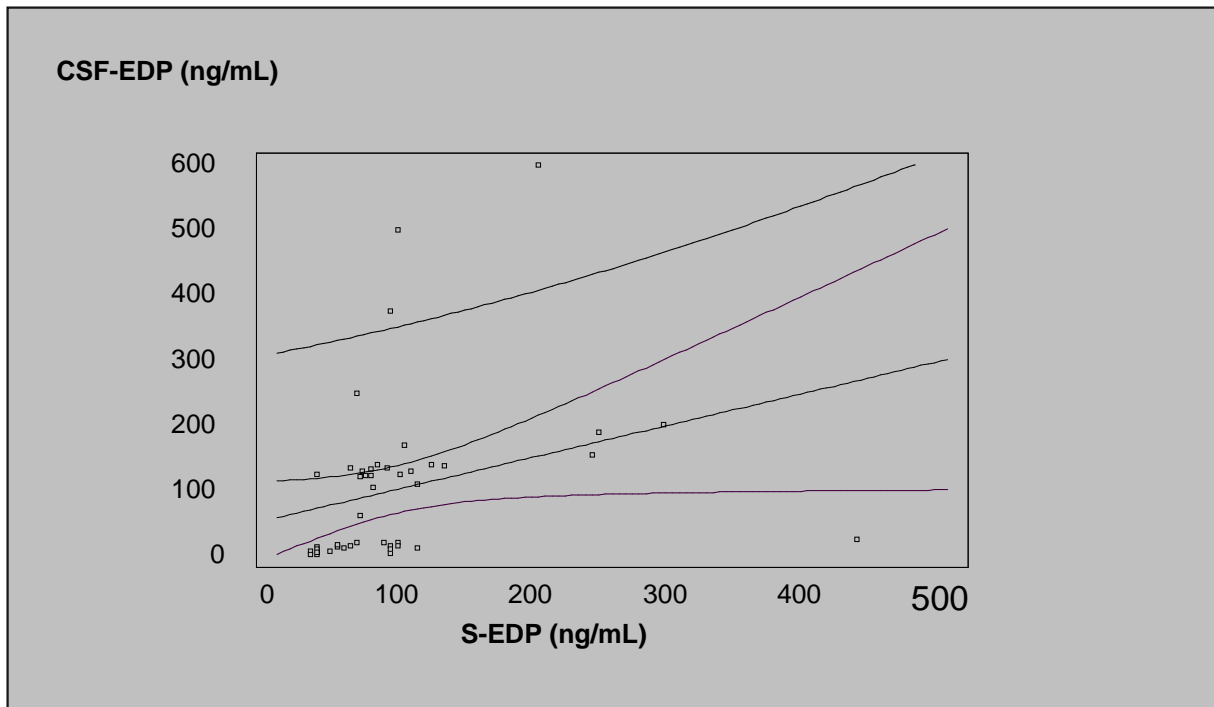
Острата мозъчна исхемия се характеризира с повишена еластолиза и деструкция на еластиновите влакна на засегнатите мозъчни съдове. Пряк резултат от това е сигнификатното повишение (1,5 пъти) на EDP в серума на болните с остър ИМИ в сравнение с контролната група. Увеличението на EDP в гръбначно-мозъчната течност е още по-изразено (2,5 пъти повече от контролите).

Една от вероятните причини за повишението на EDP в ликвора е улесненото преминаване на EDP от серума в ликвора в резултат на предизвикана от хипоксията дисфункция на кръвно-мозъчната бариера. В подкрепа на това становище са достоверните ($p < 0,0001$), умерено положителни ($r = 0,61$) корелации на EDP в ликвора и концентрациите им в серума (Фиг. 2). В същото време може със сигурност да се отхвърли исхемично обусловен пробив на бариерата, тъй като средният CSF/серумният албуминов индекс (Табл. 2) е в границите на нормата за лабораторията (< 9).

Табл. 2. Имунологични и биохимични показатели при болни с ИМИ в остра фаза и контролна група

	Контролна Група (n=21)	Остър ИМИ (n=62)	P
СЕРОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ			
Серумен общ белтък (mg/L)	74,5 ± 3,2	69,4 ± 32,3	NS
Серумен албумин (mg/L)	45,0 ± 1,8	41,8 ± 4,8	NS
Общ холестерол (mmol/l)	5,92 ± 1,22	5,59 ± 1,41	NS
TG (mmol/l)	1,42 ± 0,83	2,05 ± 1,44	NS
EDP (ng/L)	45 (25 - 75)	70 (12 - 432)	0,04
S-IgM АЕАТ (Е492 nm)	0,469 (0,396 - 0,556)	0,436 (0,172 - 0,723)	NS
S-IgG АЕАТ (Е492 nm)	0,124 (0,088 - 0,250)	0,195 (0,102 - 0,713)	0,02
S-IgA АЕАТ (Е492 nm)	0,156 (0,082 - 0,372)	0,215 (0,076 - 0,354)	NS
ЛИКВОРОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ			
Общ белтък (g/L)	0,20 (0,16 - 0,42)	0,34 (0,12 - 0,69)	NS
Албумин (mg/L)	55,5 ± 4,3	250,1 ± 190	NS
IgM	0,7 (0,7 - 0,8)	0,8 (0,7 - 2,2)	NS
IgG	38,8 (10 - 56)	48,4 (80 - 100)	0,09
IgA	3,9 (2,7 - 14)	5,1 (2,9 - 60)	NS
A1 АТ	26 (9,4 - 35,8)	21,8 (9,7-79,6)	NS
A2 МG	2,9 (2,8 - 7,2)	3,2 (2,8 - 7,2)	NS
EDP (ng/L)	9 (3 - 122)	23 (2 - 600)	0,02
CSF-IgM АЕАТ (Е492 nm)	0,014 (0,001 - 0,034)	0,056 (0,004 - 0,585)	0,001
CSF-IgG АЕАТ (Е492 nm)	0,016 (0,01 - 0,02)	0,027 (0,005 - 0,585)	0,02
CSF-IgA АЕАТ (Е492 nm)	0,041 (0,009 - 0,095)	0,016 (0,003 - 0,055)	NS

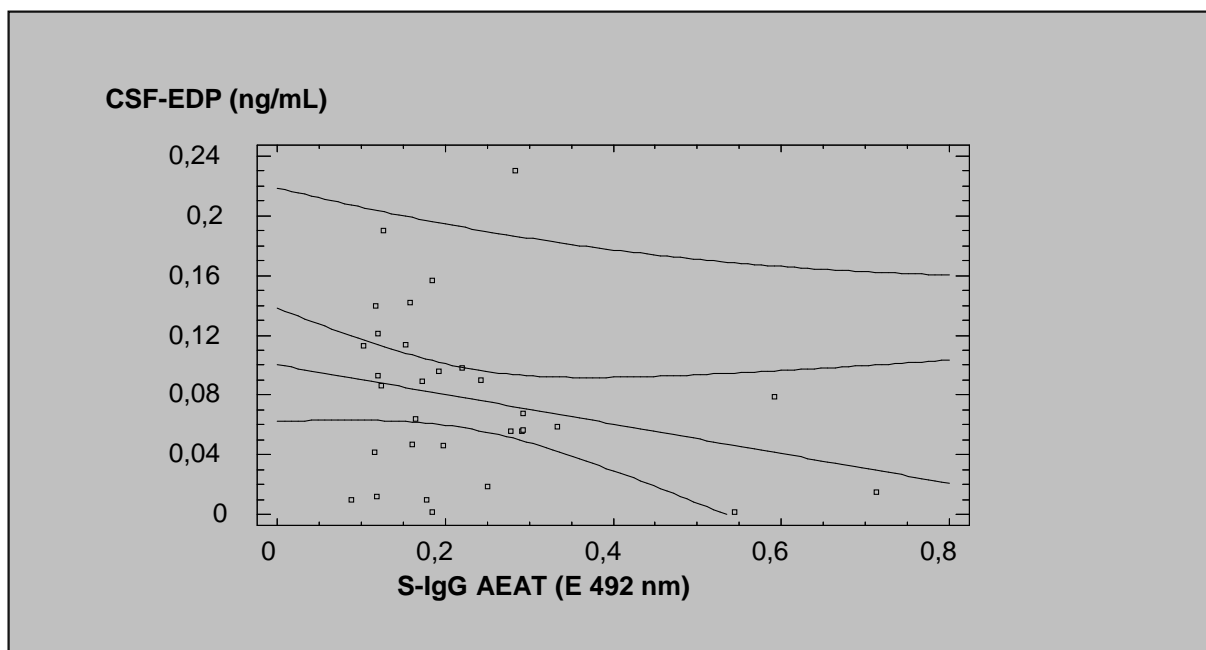
Друг възможен патогенетичен механизъм е директното проникване в ликвора от стената на исхемизирани интрацеребрални съдове. В този случай, освен водещата роля на исхемията за деструкция на съдовия еластин, допълнително въздействие оказват и *de novo* синтезираните АЕАТ. Установената положителна сигнификантна корелация ($r=0,59$; $p<0,005$) на ликворните EDP и серумните IgG АЕАТ е в подкрепа на тази хипотеза (Фиг. 3).



Фиг. 2. Корелации на серумните (S) и ликворни (CSF) концентрации на EDP

Повишената еластинова деструкция се последва от сигнификантно увеличена ($p < 0,05$) синтеза на АЕАТ в системната циркулация, а също така и в гръбначно-мозъчната течност (Табл. 2). Острата инсултна фаза се характеризира с повишение в ликвора на АЕАТ от IgM ($p < 0,001$) и IgG ($p < 0,05$) клас и с увеличение на АЕАТ от IgG клас в серума ($p < 0,05$).

Провокираната от исхемията антиеластинова антигенова синтеза вероятно има вторична (постисхемична) увреждаща роля върху еластиновите влакна на интрацеребралните и екстрацеребралните съдове. В подкрепа на това твърдение са достоверните положителни корелации ($p < 0,005$) на серумните IgG АЕАТ и концентрациите на EDP в серума ($r = 0,65$) и ликвора ($r = 0,59$).



Фиг. 3. Корелации на ликворните (CSF) концентрации на EDP и серумните (S) IgG AEAT нива

Въпреки нормалните средни стойности на CSF IgG/албуминово съотношение ($< 0,27$) в групата на болните с ИМИ (Табл. 2) - показващо отсъствие на глобална интракхална антиялосинтеза, като достоверна причина за повишението на AEAT в ликвора може да се приеме протичането на селективна антиеластинова антиялосинтеза в ликвора, последваща проникването на EDP. В потвърждение на тази хипотезата е не само нормалния CSF/серумен албуминов индекс (отхвърлящ възможността за пасивно преминаване от серума при пробив на кръвно-мозъчната бариера), но също така и същественото увеличаване на AEAT от IgM клас (Табл. 2) в ликвора.

На фона на променения еластинов метаболизъм, останалите имунологични параметри (IgG, IgM, IgA) на ликвора са рамките на нормалните за лабораторията стойности (Табл. 2). Тази дисоциация на имунологичните промени показва, че в острата инсултна фаза специфичното повишение на AEAT е в резултат на селективно активирана еластолиза, а не просто епифеномен на друг патологичен процес.

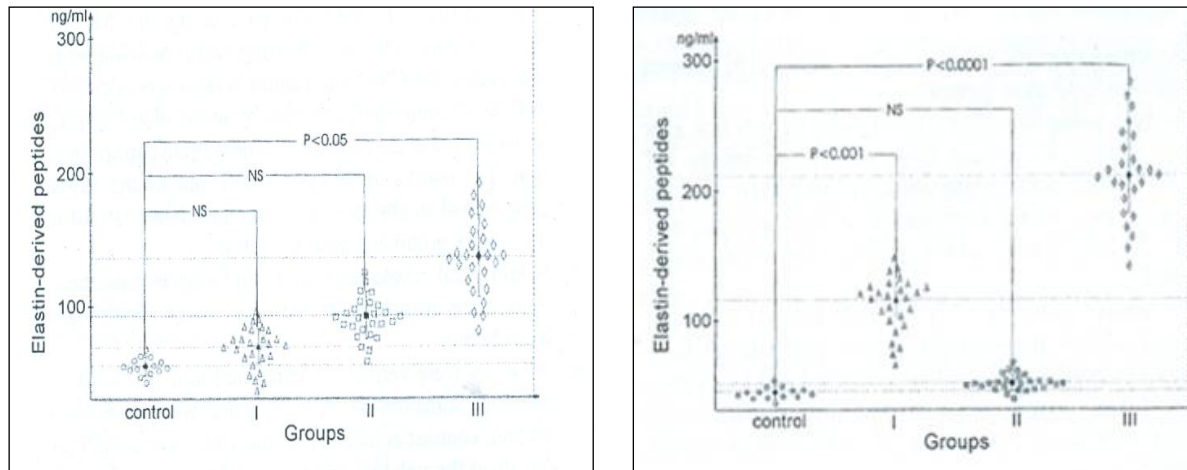
4.1.3 Корелации на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП с клинични и КТ показатели при болни с остър ИМИ

Анализирани са корелациите на промените в ЕЦМП и АТ-ЕЦМП, установени в ликвора и серума на болни с остър ИМИ с клиничните и КТ показатели на болните.

Установяват се сигнификантни корелации на EDP в серума с отделни клинични показатели, а именно положителна корелация с постинсултната

инвалидност, оценена със скалата на Ранкин ($r=0,43$; $p<0,05$), както и негативна такава с MRC на засегнатите крайници ($r=-0,68$; $p<0,005$).

При пациентите с лакунарни инфаркти се намира изразена промяна в обмяната на еластина. В подкрепа на това становище е установената позитивна корелация на броя на КТ верифицираните лакуни и нивата на EDP в серума ($r=0,55$; $p<0,05$) и ликвора ($r=0,67$; $p<0,005$).



Фиг. 4. Концентрации на EDP в серума (лява половина) и ликвора (дясна половина) на пациенти с исхемичен инсулт и здрави контроли ($n=15$). Group I, лакунарен инфаркт ($n=27$); Group II, нелакунарен инфаркт ($n=27$); Group III, исхемичен реинсулт ($n=26$). (Tzvetanov et al., *Clinical Neurology and Neurosurgery* 110 (2008) 239-244)

С цел изследване на зависимостта на промените в концентрациите на EDP от големината и вида на инфаркта (лакунарен/нелакунарен инфаркт), както и от патогенетичния механизъм на инсулта (пръв/повторен инсулт), пациентите са разпределени в 3 групи, както е показано на Табл. 3.

Не се намират достоверни различия между контролната и останалите клинични групи по отношение на възраст, общ холестерол и триглицериди. Клиничните групи не се различават помежду си по честота на хипертонията, наличие на ритъмни нарушения, каротидна стеноза и ретинопатия. Пациентите с нелакунарни инфаркти имат сигнификантно по-ниски стойности на MRC и по-тежка инвалидност от останалите групи.

Серумните концентрации на EDP на болните с ИМИ са по-високи от тези на контролната група (Фиг. 4), като това увеличение е най-изразено ($p<0,05$) при пациенти с повторен ИМИ (2 пъти по-високи стойности на EDP от тези при лакунарен инфаркт). Концентрациите на EDP в серума на пациентите с обширен (нелакунарен) инфаркти са по-високи от тези с лакунарен инфаркт, но са по-ниски от тези с повторен ИМИ.

Различията между групите в ликворните концентрации на EDP достигат значително по-високи нива на достоверност (Фиг. 4). Като цяло пациентите с исхемичен инсулт имат 12 пъти по-високи ликворни концентрации на EDP в сравнение с контролите. Анализът на резултатите показва най-изразена ($p<0,0001$) еластинова деструкция при пациенти с повторен ИМИ (30 пъти по-

високи EDP от тези на контролите), последвани ($p < 0,001$) от пациентите с лакунарни инфаркти (20 пъти по-високи от тези на контролите) и най-слабо ($p > 0,05$) повишение при пациенти с обширни инфаркти (2 пъти повече от тези на контролната група).

Табл. 3. Клинична характеристика на пациентите и техните EDP концентрации в серума (S) и ликвора (CSF)

	Контролна група (n=15)	Група I (n=27)	Група II (n=27)	Група III (n=26)	P
Клинично описание	Здрави	Пръв лакунарен инфаркт	Пръв нелакунарен инфаркт	Повторен инсулт	
Мъже/жени	8/7	10/17	19/8	9/17	0,4
Възраст (год)	57,3 (13,4)	64,4 (7,8)	62,9 (11,2)	59,0 (10,5)	0,2
Артериална хипертония (n)	0 (%)	16 (%)	14 (%)	13 (%)	NS
Предсърдно мъждене (n)	0 (%)	16 (%)	14 (%)	13 (%)	NS
Симптоматична каротидна стеноза >50% (n)	0 (%)	8 (%)	9 (%)	8 (%)	NS
Общ серумен холестерол (mmol/L)	4,9 (0,5)	5,8 (1,5)	6,1 (1,2)	5,5 (1,3)	0,4
Серумни триглицериди (mmol/l)	1,3 (1,0)	2,3 (1,8)	2,7 (1,9)	1,4 (0,2)	0,3
Ретинопатия (n)	0 (%)	18 (%)	16 (%)	17 (%)	NS
MRC в началото	5	3,9 (0,9)	2,4 (1,6)	3,5 (0,8)	0,01
Ранкин	5	1,1 (0,4)	2,8 (1,3)	1,4 (0,7)	0,001
CSF левкоцити ($\times 10^9/L$)	3,0 (0-4)	3,2 (0-6)	3,8 (2-6)	3,5 (1-5)	0,5
CSF общ белтък (g/L)	0,33 (0,1)	0,41 (0,1)	0,45 (0,3)	0,35 (0,1)	0,2
CSF албумин (mg/L)	155,5 (50,1)	179,6 (73,3)	202,7 (83,3)	199,5 (55,1)	0,4
Серумен тотален протеин (g/L)	72,9 (4,0)	73,2 (7,3)	70,0 (5,5)	67,7 (7,4)	0,3
Серумен албумин (g/L)	42,5 (7,1)	44,5 (3,4)	41,4 (5,2)	42,6 (3,8)	0,5
Албумин CSF/серумно съотношение	3,4 (1,4)	3,2 (1,4)	4,4 (1,8)	3,4 (1,6)	0,5
CSF-EDP (ng/mL)	6,3 (3,2)	129,5 (4,3)	22,0 (7,6)	205,0 (87,4)	0,001
S-EDP	57,9 (29,7)	66,6 (18,6)	88,6 (0,9)	132,3 (85,1)	NS
CSF/S EDP съотношение	0,2 (0,1)	1,8 (0,4)	0,3 (0,2)	2,0 (1,6)	0,0001

CSF/серумното EDP съотношение показва, че при пациентите с повторни ИМИ концентрациите на EDP в ликвора са 2 пъти по-високи от тези в серума. Увеличението на EDP в ликвора не е едномоментен, а прогресиращ след началото на ИМИ процес ($r=0,35$; $p<0,05$).

Концентрациите на EDP в ликвора на пациенти с лакунарен статус ($235,5 \pm 38,9$) са по-високи ($p<0,05$) от тези с множествени обширни инфаркти ($158,8 \pm 41,2$). Ликворните нива на EDP позитивно корелират ($p<0,01$) с броя на лакуните.

4.1.4 Прогностични корелации на промените в метаболизма на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП при болни с остър ИМИ.

Анализирана е прогностичната стойност на промените в серумните и ликворни нива на EDP по отношение смъртността от ССЗ (мозъчно-съдова болест, I60 - I69; исхемична болест на сърцето I20 - I25) и честотата на хоспитализации по повод на ССЗ (I60 - I69, I20 - I25).

Данните за смъртността от ССЗ са получени от регистъра на ЕСГРАОН - Плевен, а тези за честотата на хоспитализациите от регистъра на РЗОК - Плевен. За теоретична е приета честотата, цитирана на страницата на НСИ (www.nsi.bg) за структура на смъртността в Северозападен регион.

За тази цел при нормално разпределение на EDP, като патологични са определяни стойностите по-високи от средните + 2 SD. При разпределение различно от нормалното, за повишени се приемат тези превишаващи 95 перцентил. Пациентите с патологични повишени стойности на EDP в серума и ликвора са клинично проследявани в продължение на повече от 5 години.

Анализът на структурата на смъртността в рамките на 5 години след инсульта при пациенти с патологично повишени стойности на EDP в ликвора показва, че в 75% (63 - 87; $p<0,05$) смъртта е била причинена от ССЗ (OR=1,4; 1,2 - 1,7), а 42,9% (32,1 - 53,7) от последващите инсульта хоспитализации са били по повод на ССЗ.

Подобна тенденция се отбелязва и при проследяване на пациентите с патологично повишени серумни EDP концентрации. Причината за смърт в преобладаващия брой случаи ($p<0,05$) - 73% (69,3 - 76,7) са били ССЗ (OR=1,2; 1,1 - 1,4), а 35,1% (27,3 - 42,9) от последващите хоспитализации са по повод на ССЗ.

4.2 Промяна в метаболизма и корелации на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП при болни с асимптомна ИМСБ, ИМИ в хронична фаза и контролна група

4.2.1 Демографска, клинична и КТ характеристика на болните с асимптомна ИМСБ, ИМИ в хронична фаза и контролна група

С цел проучване на промените в метаболизма на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП в хроничната фаза на ИМИ и асимптомната ИМСБ се анализират показателите на еластиновия метаболизъм при 51 (34,0%) болни с асимптомна ИМСБ, 68 (45,3%) болни с ИМИ в хронична фаза и 31 (20,7%) контролни лица. Участниците в контролната група са здрави индивиди, които са с нормални доплерсонографски показатели за мозъчните артерии. Всички от контролната група са с нормални хематологични и биохимични показатели и нормален неврологичен статус. Анализирано е разпределението по пол и възраст в контролната група (Табл. 6) и клиничните групи. Участниците се разпределят в групи под 60 и над 60 години на основа на литературните данни за сигнификантни различия в метаболизма на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП съобразно тази възрастова граница. Не се установява съществена разлика в разпределението по пол и възраст на контролната група, болните с хроничен ИМИ и тези с асимптомна ИМСБ ($p > 0,05$). Процентното разпределение и абсолютните средни стойности на изследваните клинични показатели са представени на Табл. 4.

Табл. 4. Демографска и клинична характеристика на болните с асимптомна ИМСБ, ИМИ в хронична фаза и контролна група

	Контролна Група (n=31)	Асимптомна ИМСБ (n=51)	ИМИ в хронична фаза (n=68)	P
Възраст (год)	54,8 ± 14,6	55,7 ± 9,6	67,9 ± 9,7	0,0001
Мъже n (%)	6 (19,4)	23 (45,1)	44 (67,7)	0,0001
Систолно налягане (mmHg)	134 (20,3)	152 (24,1)	158 (32,8)	0,0008
Давност на хипертонията (месеци)	120 (48-180)	130 (108-240)	120 (60-240)	NS†
Захарен диабет тип I n (%)	-	9 (17,7)	18 (29)	NS
Захарен диабет тип II n (%)	-	42 (82,4)	44 (71)	NS
Давност на диабета (години)	-	8 (6-11)	13 (8-30)	NS†
Канадска скала	-	-	9,9 ± 2,6	-
Ранкин	-	-	2 (1-4)	-
MMSE	-	-	20 ± 7,0	-
Предишен инсулт n (%)	-	2 (3,9)	25 (40)	0,0001
Тютюнопушене (цигари/ден)	0 (0-15)	3 (0-20)	0 (0-4)	0,005†
Алкохол (g/седм)	0 (0-50)	0 (0-350)	50 (0-350)	0,04†
BMI	26,6 ± 5,7	28,7 ± 5,6	27,3 ± 6,6	0,04

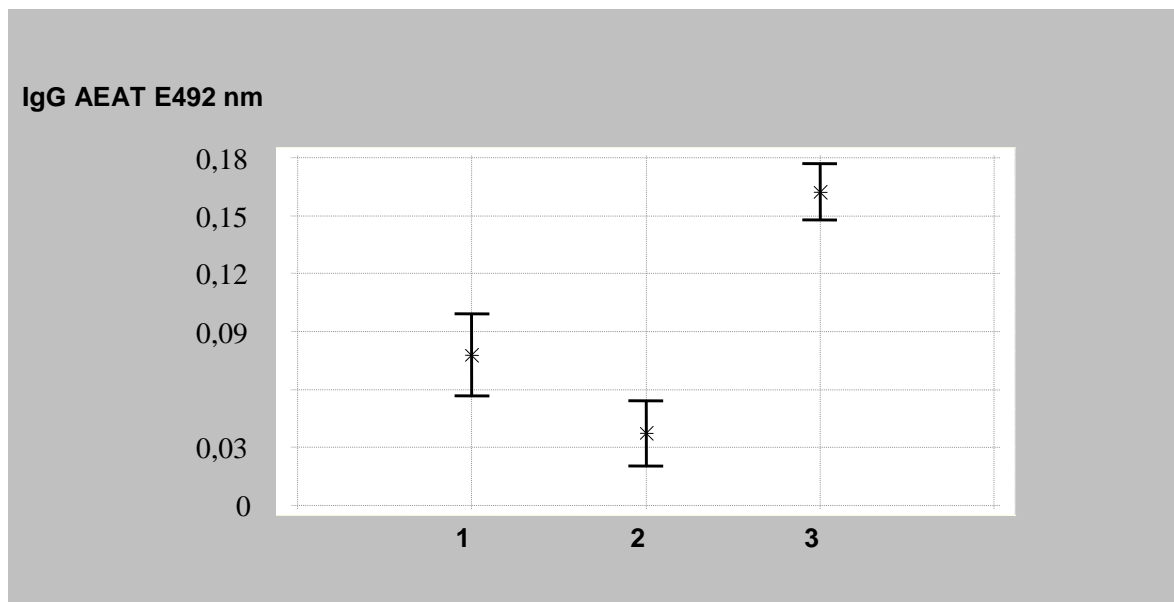
† Kruskal-Wallis Test при разпределение различно от нормалното; NS, несигнификантна стойност; ИМСБ, исхемична мозъчно-съдова болест; ИМИ, исхемичен мозъчен инсулт

4.2.2 Промяна в метаболизма на ЕЦМП иАТ-ЕЦМП в серум на болни с асимптомна ИМСБ и ИМИ в хронична фаза

Сравняват се средните стойности на концентрациите на EDP, TE, CIVDP, E-CIC, TE-CIC, E-AGE в серума на пациенти с ИМИ в хронична фаза (n=68), асимптомна ИМСБ (n=51) и контролна група (n=31). При разпределение различно от нормалното се сравняват медианните концентрации.

EDP в серума на болните с ИМИ са сигнификантно по-високи от тези на пациентите с асимптомна ИМСБ, които от своя страна са по-високи от тези на контролната група ($p < 0,0001$). При пациенти с асимптомна ИМСБ и повишен еластинов метаболизъм се установява сигнификантно повишение на серумните нива на TE ($p < 0,005$).

Подобна тенденция за повишение се наблюдава и по отношение на серумните CIVDP, чиито концентрации са най-високи в групата на хроничния ИМИ ($p < 0,0001$).

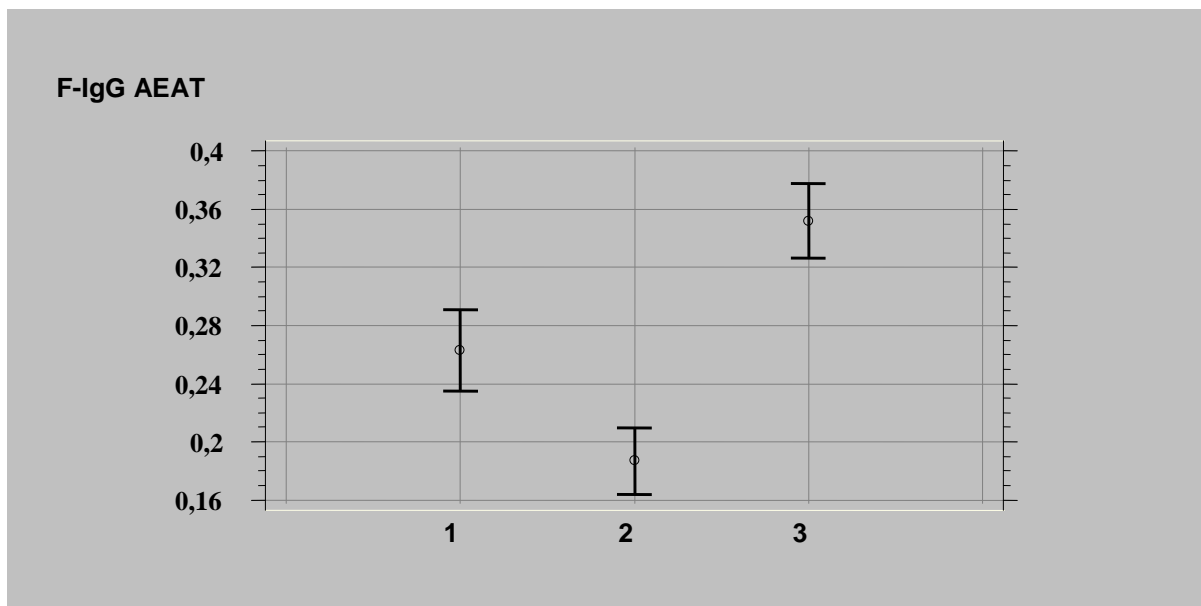


Фиг. 5. Средни стойности на IgG AEAT в серума на 1 – контролна група; 2 -асимптомна ИМСБ и 3 – ИМИ в хронична фаза

Описаните промени в метаболизма на ЕЦМП при пациенти с хроничен ИМИ и асимптомна ИМСБ кореспондират с промените в нивата на синтезираните срещу тях автоантитела.

Сравняват се средните серумни нива на AEAT, AE-AGE, ATEAT, ACIVAT при пациенти с ИИ (n=58), асимптомна ИМСБ (n=47) и контролна група (n=30). Хроничният ИМИ се характеризира със значимо повишение на AEAT от IgM ($p < 0,001$) и IgG клас ($p < 0,0001$). За разлика от него, асимптомната ИМСБ се съпровожда от значително намаление на серумните IgG AEAT ($p < 0,001$) в сравнение с контролната група (Фиг. 5). Такава тенденция се установява единствено за AEAT и това намаление корелира с резултатите за E-CIC (Фиг. 6). Значимо по-високите серумни нива на E-CIC при асимптомна ИМСБ се

съпровождат от по-ниски нива на свободни F-IgG АЕАТ от IgM ($p < 0,01$) и IgG клас ($p < 0,001$).



Фиг. 6. Средни стойности на свободни F-IgG АЕАТ в серума на 1-контроли; 2 -асимптомна ИМСБ и 3-ИМИ в хронична фаза

АЕАТ от IgG клас са сигнификантно по-високи при пациенти с асимптомна ИМСБ и ИМИ в сравнение с контролите ($p < 0,01$). От друга страна, ИМИ протича със значимо повишение на АЕАТ от IgA клас ($p < 0,01$).

Подобна тенденция за повишение се наблюдава и по отношение на антиколагеновите антитела (CIVAT от IgM, IgG и IgA клас), но разликите между отделните групи са по-слаби ($p < 0,005$).

Хроничният ИМИ се съпровожда и от повишение на CIV-CIC ($p < 0,005$) и ТЕ-CIC ($p < 0,0001$). Пациентите преживели острата фаза на ИМИ се характеризира и със значимо по-високи нива на E-AGE ($p < 0,0001$).

По-слаба тенденция за повишена активност се отбелязва по отношение на серумната MMP-2, чиито нива при болни с хроничен ИМИ са по-високи ($p < 0,05$) от тези на пациенти с асимптомна ИМСБ.

Хроничният ИМИ и ИМСБ не се съпровождат ($p > 0,05$) от промяна в активността на MMP-9 в сравнение с контролната група здрави лица.

4.2.3 Корелации на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП с клинични, биохимични, КТ и дуплерсонографски показатели

Сравнени са демографските и клинични характеристики на пациентите с асимптомна ИМСБ ($n=51$) и хроничен ИМИ ($n=65$) с тези на контролната група с нормално ултразвуково изследване на мозъчните съдове ($n=31$).

Установява се значимо по-висока средна възраст ($p < 0,0001$) и превес на мъжете при ИМИ ($p < 0,0001$). Пациентите с ИМИ се характеризират и с по-високо средно тегло ($p < 0,05$), BMI ($p < 0,05$), систолното артериално налягане

($p < 0,001$) и по-голяма консумация на алкохол ($p < 0,05$) и цигари ($p < 0,005$). Фамилна анамнеза за инсулт е по-често установявана при пациентите с ИМИ ($p < 0,05$). Сигнификантно е по-висок относителния дял на коровата атрофия ($p < 0,05$) и наличието на левкоараиоза ($p < 0,005$) при пациентите с по-високо наднормено тегло.

От биохимичните показатели (Табл. 5) сигнификантно повишение се наблюдава единствено по отношение на hsCRP ($p < 0,0001$), чиито серумни нива са двукратно увеличени при болните с ИМИ. Не се установяват достоверни различия в серумните нива на общия холестерол, TG, HDL, LDL между изследваните групи ($p > 0,05$). Намират се сигнификантни позитивни корелации на E-AGE със серумните нива на EDP ($r = 0,51$; $p < 0,005$) и IgG AEAT ($r = 0,31$; $p < 0,05$), както и с hsCRP ($r = 0,36$; $p < 0,05$). При пациентите с ИМСБ се установява позитивна корелация на hsCRP и TG ($r = 0,41$; $p < 0,05$). Умерени по сила са позитивните корелации на EDP и hsCRP ($r = 0,41$; $p < 0,01$).

Процентното разпределение и абсолютните средни стойности на изследваните от нас невроизобразяващи и съдовоизобразяващи параметрични показатели са представени на Табл. 5. Слаби, но достигащи нива на достоверност ($p < 0,05$) са корелациите на ЕЦМП и синтезираните срещу тях антитела с невроизобразяващите КТ показатели. Наличието на лакунарен статус, левкоараиоза и корова атрофия корелират позитивно със серумните нива на CIVDP и CIVAT от IgG клас ($p < 0,05$).

Сравнени са серумните нива на EDP, TE, CIVDP, E-CIC, TE-CIC, CIV-CIC, E-AGE, както и синтезираните срещу тях автоантитела от IgG, IgM и IgA клас AEAT, AE-AGE, ATEAT, ACIVAT на пациенти с асимптомна сигнификантна стеноза на ВСА ($n = 25$) и тези на болни, при които стенозата е усложнена с ИМИ ($n = 30$). Използвана е контролна група от 30 здрави лица с нормални доплерсонографски резултати.

Симптоматичната стеноза на ВСА се съпровожда от значимо повишение на EDP в серума ($p < 0,0001$). Патологично повишени са и серумните нива на CIV-CIC ($p < 0,005$) и TE-CIC ($p < 0,0001$). По-слабо повишени са серумните нива на TE ($p < 0,005$) и CIVDP ($p < 0,005$) при пациентите с усложнена стеноза на ВСА.

Промените в серумните нива на синтезираните срещу ЕЦМП антитела в посочените групи болни кореспондират с тези на EDP, TE и CIVDP. Усложнената стеноза на ВСА протича със значимо и изразено повишение на AEAT от IgM ($p < 0,001$) и IgG клас ($p < 0,0001$). Значимо по-високи са и серумните нива на свободните AEAT от IgM ($p < 0,001$) и IgG клас ($p < 0,0001$). Установява се сигнификантно повишение на IgG ATEA ($p < 0,01$) в двете клинични групи при сравнение с контролната група здрави лица. По-слаби, но сигнификантни различия между групите се намират по отношение на CIVAT от IgM, IgG и IgA клас ($p < 0,005$), които са по-високи при пациентите с усложнена стеноза.

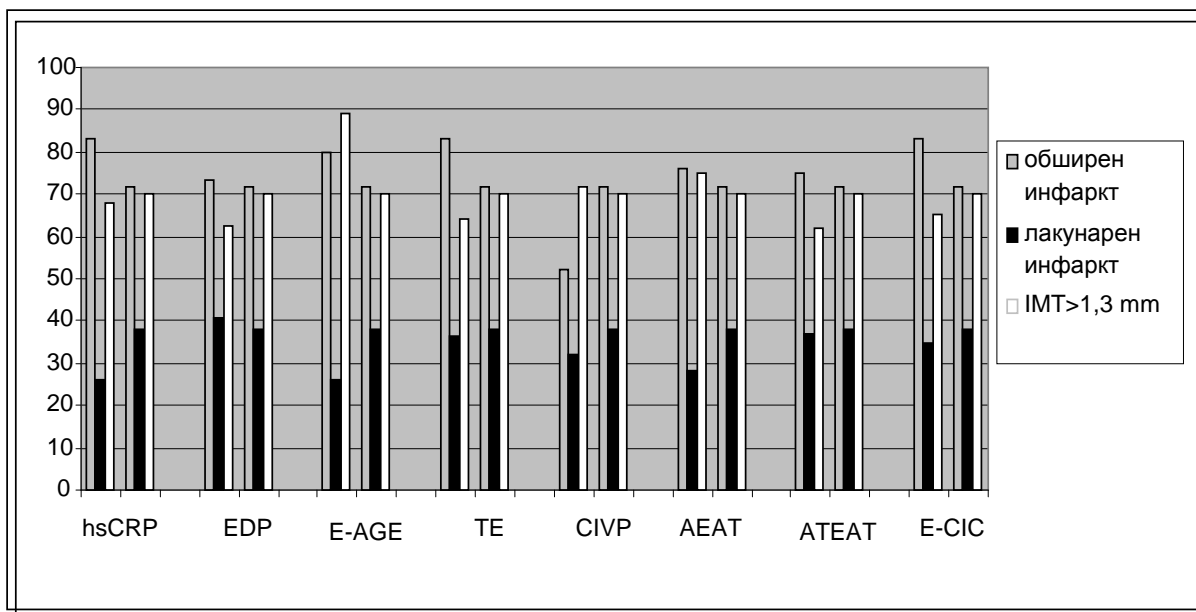
Табл. 5. Биохимични, невроизобразяващи и съдовоизобразяващи резултати при асимптомна ИМСБ, ИМИ в хронична фаза и контролна група

	Контролна Група (n=31)	Асимптомна ИМСБ (n=51)	ИМИ в хронична фаза (n=65)	P
Общ холестерол (mmol/l)	5,2 ± 1,6	5,0 ± 1,7	5,2 ± 1,8	NS
TG (mmol/l)	1,4 (1,1-2,3)	1,7 (1,1-2,4)	1,5 (1,1-2,1)	NS†
HDL(mmol/l)	1,1 (0,9-1,4)	1,0 (0,8-1,3)	1,0 (0,9-1,3)	NS†
LDL(mmol/l)	3,3 ± 1,3	3,1 ± 1,3	3,5 ± 1,4	NS
hsCRP (mg/dl)	0,5 (0,1-1,6)	0,8 (0,5-4,4)	2,5 (0,7-10)	0,0001
Лакунарен инфаркт (%)	-	-	20 (38,5)	-
Нелакунарен инфаркт (%)	-	-	40 (72,7)	-
Лакунарен статус	-	-	17 (32,7)	-
Левкоараиоза	-	-	5 (9,8)	-
Множество инфаркти	-	-	10 (19,2)	-
Корова атрофия	-	-	30 (56,6)	-
IMT среден	-	-	0,145 (0,11- 0,82)	-
IMT макс	-	-	1,2 ± 0,4	-
Стеноза на ОСА (%)	-	-	35,2 ± 12,8 (20-61)	-
Стеноза на ВСА (%)	-	-	35 (20-95)	-

4.2.4 Диагностични и прогностични корелации на промените в метаболизма на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП при пациенти с асимптомна ИМСБ и хроничен ИМИ

Анализирани са диагностичните и прогностични корелации на на hsCRP, EDP, CIVDP, E-AGE, TE, IgG AEAT, IgG ATEAE, CIC по отношение на наличие на атеросклеротични съдови промени (IMT>1,3 mm), развитие на лакунарни инфаркти и обширни (нелакунарни) исхемични инсулти (Фиг. 7).

За целта при нормално разпределение, концентрациите на променените серумни и ликворни показатели са определяни като патологични при стойности по-високи от средните за съответната контролна група + 2 SD. При разпределение различно от нормалното за повишени са приети тези над 95 перцентил.



Фиг. 7. Процентно разпределение на честотата на обширен инфаркт, лакунарен инфаркт и абнормен IMT в групите с патологично повишени стойности на серумните показатели (в ляво) и в обща група (в дясно)

Установява се, че в групата на пациентите с патологично повишени стойности на hsCRP в 83,3% (75,8 - 90,8) преобладават ($p < 0,05$) обширните исхемични инсулти. В 26,1% (17,1 - 35,1) КТ изследване на пациентите с патологично повишени стойности е установило наличие на лакунарен инфаркт, като рискът в тази група е по-нисък ($p < 0,05$) от този на общата клинична група (Фиг. 7). Атеросклеротични съдови промени се установяват в 68% (57-79) от пациентите ($p > 0,05$) с повишение на hsCRP, но тези стойности са по-ниски ($p > 0,05$) от тези на общата клинична група (Фиг. 7).

Подобна тенденция се наблюдава при анализа на процентното разпределение на пациентите с патологично повишени серумни нива на EDP (Фиг. 10). В 73,5 % (66 - 81,0) са установени обширни исхемични инсулти, а в 40,6% (32 - 49,2) достоверно ($p < 0,05$) преобладават лакунарните инфаркти. В 62,5% (50,5 - 74,5) от пациентите с патологично повишени серумни EDP ултразвуковото изследване е показало наличие на атеросклеротични промени.

По-добри са диагностичните и прогностичните възможности има E-AGE (Фиг. 7). В 78,3% (69,7 - 86,9) от случаите с патологично повишени стойности на този показател КТ изследване е показало наличие на инфаркт с обширни размери ($p < 0,05$) и само в 26,1% (17,1 - 35,1) лакунарен инфаркт. Установяването на патологично повишени стойности на E-AGE е сериозен и достоверен ($p < 0,05$) рисков фактор за развитието на атеросклеротични промени в 88,9% (78,9-98,9) от случаите.

Близки до тези на EDP, но по-добри по отношение на обширните и по-слаби по отношение на лакунарните инфаркти са прогностичните възможности на TE (Фиг. 7). В 83,3 % (70,3 - 96,3) КТ изследване е показало наличие на нелакунарен ($p < 0,05$) и в 36,4% (26,4 - 46,4) лакунарен инсулт. Достоверно

($p < 0,05$) по-нисък в 64,3% (52,0 - 76,6) е рискът от развитие на атеросклероза на екстрацеребралните артерии при установяване на увеличена еластосинтеза с повишение на ТЕ в серума.

Промяната в метаболизма на колагеновите пептиди има диагностични и прогностични възможности, различаващи се от тези на еластиновите, както за обширните, така и по отношение на лакунарните инфаркти (Фиг. 7). В 52,0% (44,0 - 60) от случаите с повишен колагенов метаболизъм се установяват обширни инфаркти, а в 32,0 % (22,0 – 41,0%) лакунарни инфаркти. И в двата случая рискът в групата с повишени стойности е по-малък ($p < 0,05$) от този в общата група. 72,0% (64,0-80) от пациентите с повишена колагенова деструкция показват наличие на атеросклеротични промени, като процентът не надвишава ($p > 0,05$) този на общата група.

Вътрегруповият анализ в общата клинична група показва, че ниските серумни нива IgG АЕАТ корелират с по-висок ($p < 0,05$) риск от поява на лакунарни инфаркти. Обратно на това, повишението на IgG АЕАТ (увеличена еластоза) корелира с повишен ($p < 0,05$) риск от развитие на обширни инфаркти ($76,0 \pm 7,8\%$). В 75% (64,6 - 85,4) от тези пациенти са установени абнормни стойности на ІМТ на екстрацеребралните мозъчни артерии.

Прогностичните и диагностични корелации на АТЕАТ се различават от АЕАТ. В 75% (60,0 – 90,0) от случаите със сигнификантно повишение на АТЕАТ се развива обширен мозъчен инфаркт ($p > 0,05$), а в 36,7% (28,2 - 45,2) лакунарен инфаркт ($p > 0,05$). Ултразвуковото изследване на екстрацеребралните артерии намира, че ниските нива на тези антитела в общата клинична група (съответно намалена еластосинтеза) корелират с по-висок риск ($p < 0,05$) от развитие на атеросклероза и съответно абнормни стойности на ІМТ ($62,5\% \pm 11,1$).

Анализът на резултатите за E-CIC показва наличие на значими ($p < 0,05$) позитивни прогностични корелации по отношение на риска от обширен мозъчен инфаркт ($83,3\% \pm 8,3\%$) и негативни ($p < 0,05$) корелации (увеличено натрупване в съдовата стена и изчерпване в серума) по отношение на риска от атеросклероза на екстрацеребралните артерии ($36,4\% \pm 10,2$) и лакунарни инфаркти ($35,3\% \pm 11\%$).

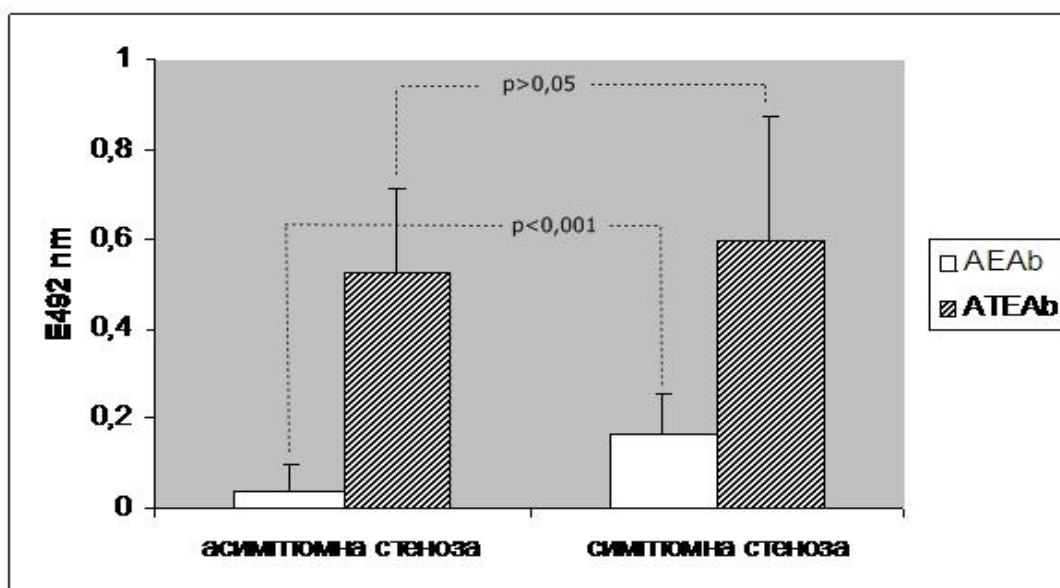
Проучени са промените в серумните нива на IgG АЕАТ и IgG АТЕАТ при пациенти със симптомна (усложнена с исхемичен мозъчен инсулт) и асимптомна (неусложнена) стеноза ($>70\%$) на ВСА (Табл. 6).

Табл. 6. Демографски показатели на пациентите със симптомна и асимптомна стеноза на ВСА

Групи	Брой болни (n)	Пол (мъже %)	Средна възраст \pm SD	Възрастова граница (Min-Max)
Асимптомна стеноза	47	45	55,7 \pm 9,6	28 – 74
Симптомна стеноза	63	65	67,9 \pm 9,7	46 – 85

n=брой пациенти, SD, стандартно отклонение, Min-минимална, Max-максимална възраст

Изчислено е АТЕАТ/АЕАТ “синтез/деградационното” съотношение отделно за двете групи болни. Установяват се изразени и достоверни различия между тях. Достоверно ($p < 0,001$) по-ниски стойности на това съотношение се наблюдава при пациенти със симптомна стеноза (Табл. 7).



Фиг. 8. Средни стойности на екстинциите (492 nm) на антиеластинови (АЕАб) и антитропоеластинови (АТЕАб) IgG антитела в серума на пациенти с асимптомна и симптомна стеноза на вътрешната сънна артерия

Сигнифантната редукция на “синтез/деградационното” отношение в групата на инсултнo болните е обусловена от повишената еластолиза при пациентите с усложнена атеросклеротична плака (Фиг. 8). Не се установяват достоверни различия в интензитета на еластосинтезата в двете групи пациенти.

Табл. 7. Серумни АТЕАТ и АЕАТ нива при пациенти с симптомни и асимптомна стеноза на ВСА

Групи	Брой болни (n)	АЕАТ**	АТЕАТ**	Отношение*
Асимптомна стеноза	47	0,037 ± 0,06	0,523 ± 0,19	14,14
Симптомна стеноза	63	0,163 ± 0,09	0,596 ± 0,28	3,66
Р на АТЕ/АЕ		P < 0,001	P > 0,145	P < 0,001

* Синтез (АТЕАТ) / деградация (АЕАТ) съотношение; **средни стойности на Е492 ± стандартни отклонения от средните; n = брой на пациенти; АТЕАТ, аниттромбеластинови антитела; АЕАТ, антиеластинови антитела

4.3 Промяна в метаболизма и корелации на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП при болни с ДПП

4.3.1 Демографска, клинична и неврографска характеристика на болни със ЗД тип II и контролна група

С цел проучване промените в метаболизма на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП са изследвани 57 (60,6%) пациента със ЗД тип II и 37 (39,4%) контролни лица.

Участниците в контролната група са здрави индивиди, които са с нормални неврографски показатели. Всички са с нормални хематологични и биохимични показатели и нормален неврологичен статус.

Анализирано е разпределението по пол и възраст в контролната група и клиничната група. Участниците се разпределят в групи под 60 и над 60 години на основа на литературните данни за различия в метаболизма на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП съобразно тази възрастова граница.

Не се намира съществена разлика в разпределението на контролната група и болните със ЗД тип II по пол и възраст ($p > 0,05$). Демографската и клинична характеристика на изследваните болни е представена на Табл. 8.

Табл. 8. Демографска и клинична характеристика на пациенти с ДПНП и такива с нормални неврографски показатели

	Без ДПНП (n=20)	ДПНП (n=37)	P
Възраст (год)	57,1 ± 14,8	57,9 ± 12,6	NS
Мъже n (%)	11 (55)	21 (56,8)	NS
Давност на диабета (год)	3 ± 1,8	12 ± 1,4	0,005
HA1C (%)	6,2 ± 1,4	7,3 ± 1,7	-
Систолно налягане (mmHg)	132 ± 24	148 ± 27	0,001
Давност на хипертонията (год)	21 (15-96)	108 (48-120)	0,04
Анамнеза за инсулт	-	8 (16,3)	-
Анамнеза за инфаркт	-	5 (10,6)	-
Ретинопатия	-	32 (71,2)	-
Тегло (%)	80,6 ± 19,2	82,4 ± 16,3	NS
Ръст (m)	1,68 ± 0,15	1,68 ± 0,08	NS
BMI	29,1 ± 9,0	29,1 ± 5,1	NS
ABI	1,1 ± 0,14	1,1 ± 0,7	NS
Тютюнопушене (цигари/ден)	15 (0-20)	0 (0-15)	0,03†
Алкохол (g/седм)	400 (0-1000)	0 (0-200)	0,0001†

† Kruskal-Wallis Test при разпределение различно от нормалното; NS, несигнификантна стойност; BMI, боди мас индекс; ABI, ankle-brachial index, HA1C, гликиран хемоглобин

4.3.2 Промяна в метаболизма на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП при болни със ЗД тип II

Средните (при нормално разпределение) и медианите (при различно от нормалното разпределение) стойности на EDP, TE, CIVDP, E-CIC, TE-CIC, E-AGE на пациентите със ЗД тип II (n=57) са сравнени с тези на контролна група (n=31). Пациентите с диабет са с нормални неврографски и доплерсонографски показатели и клинично нямат симптоми и белези на полиневропатия и съдови компликации.

EDP в серума на болните със ЗД са сигнификантно ($p < 0,05$) по-високи от тези на контролната група, но различията им не са големи и техните концентрации не достигат нивата, установени при ИМИ. Установява се достоверна положителна корелация на EDP и MMP-2 ($r = 0,31$; $p < 0,01$).

Увеличената еластолиза се съпровожда от интензивна еластосинтеза, която се характеризира с увеличение на TE ($p < 0,05$) при пациентите с ЗД тип II.

Най-манифестни при пациентите със ЗД тип II са промените в метаболизма на E-AGE. Анализът на резултатите показва наличие на изразено ($p < 0,001$) повишение на техните концентрации в серума на клиничната група.

Прави впечатление, че болестният процес при ЗД тип II засяга не само еластините, а променя метаболизма и на колагеновите пептиди ($p < 0,01$).

Повишената деградация на колагеновите пептиди се съпровожда от сигнификантно ($p < 0,05$) увеличение в серума на CIV-C1C.

Нивата на АЕАТ, АТЕАТ, АСIVАТ при пациенти със ЗД тип II без перифернонервни и съдови патологични промени не се различават ($p > 0,05$) от тези на контролната група здрави лица.

При пациентите със ЗД тип II нивата на hsCRP корелират положително с BMI ($r = 0,35$; $p < 0,005$) и телесното тегло ($r = 0,38$; $p < 0,005$). Достоверна е зависимостта на нивата LDL ($r = 0,35$; $p < 0,005$) в серума от BMI и теглото ($r = 0,38$; $p < 0,005$) на пациентите. Установява се сигнификантна позитивна корелация на серумните нива hsCRP и тези на MMP-9 ($r = 0,30$; $p < 0,05$).

4.3.3 Корелации на промените в метаболизма на ЕЦМП и ат-ЕЦМП с клинични и неврографски показатели при пациенти с ДПНП

Сравнени са демографските и клинични характеристики на пациентите със ЗД тип II с неврографски потвърдена (SNAP от n. Suralis $< 6 \mu V$) ДПНП ($n = 37$) със тези на пациенти със ЗД тип II, при които не намират клинични и електроневрографски белези на ДПНП ($n = 20$).

Средната възраст и процентното разпределение спрямо пола на болните с ДПНП не се различават значимо ($p > 0,05$) от това на контролната група.

Пациентите в групата с ДПНП имат по-високи средни стойности на артериалното систолно налягане ($p < 0,005$) и по-голяма давност на хипертонията ($p < 0,05$). Значително по-висока е консумацията на алкохол ($p < 0,0005$) и цигари ($p < 0,05$) при пациентите с ДПНП.

Не се намират съществени различия по отношение на средното тегло и BMI ($p > 0,05$) при пациентите с ДПНП. Средният ABI в двете групи не показва сигнификантна промяна ($p > 0,05$).

Процентното разпределение и абсолютните средни стойности на клиничните параметрични показатели са представени на Табл. 8.

При пациентите с ДПНП се установяват сигнификантно по-високи серумни нива на холестерол ($p < 0,05$) и hsCRP ($p < 0,05$) при сравнение с контролната група (Табл. 9).

Табл. 9. Показатели на мастната обмяна и hsCRP при пациенти с ДПНП и такива с нормални неврографски показатели

	Без ДПНП (n=20)	ДПНП (n=37)	P
Общ холестерол (mmol/l)	5,4 ± 0,9	5,1 ± 1,6	0,03
TG (mmol/l)	1,6 (1,1-2,4)	1,7 (1,1-2,7)	NS
HDL (mmol/l)	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,4	NS
LDL (mmol/l)	3,5 ± 0,9	3,3 ± 1,1	NS
hsCRP (mg/dl)	0,3 (0,14-2,73)	1,8 (0,6-3,6)	0,04

Болните с електрофизиологично потвърдена ДПНП имат значимо по-високи серумни нива на EDP, но разликата не е голяма ($p < 0,05$).

Промените в еластиновия метаболизъм (увеличена еластолиза) се съпровожда от високи ($p < 0,05$) нива на TE (увеличена еластосинтеза). Показателят, по който двете клинични групи се различават в най-голяма степен са серумните концентрации на E-AGE, които са значимо ($p < 0,001$) по-високи при пациентите с ДПНП.

Потвърждава се тенденцията за изразена промяна в колагеновия метаболизъм при пациентите с електрофизиологично потвърдена ДПНП ($p < 0,0001$).

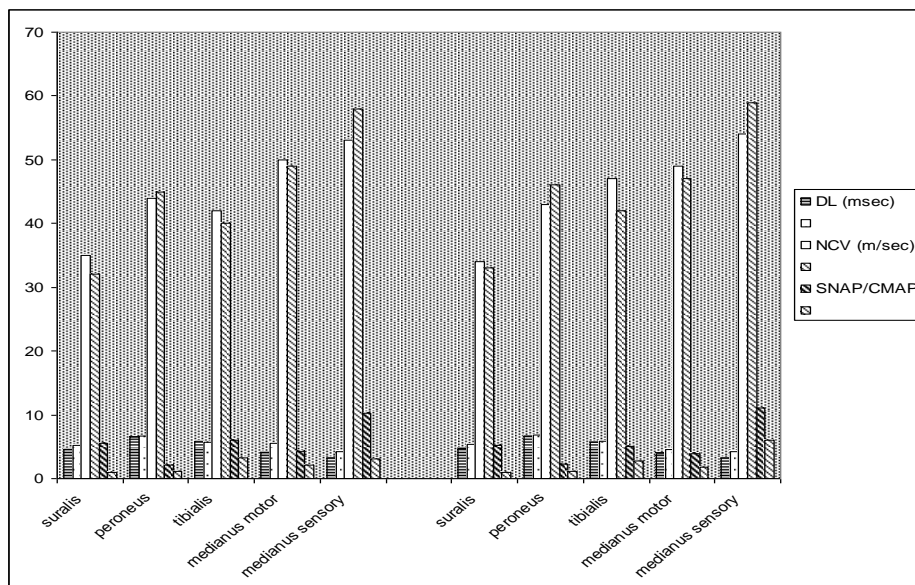
Сравнени са серумните нива на AEAT, ATEAT, ACIVAT на болните с ДПНП ($n=54$) и тези на контролна група здрави лица ($n=23$). Болните с ДПНП са разпределени в две подгрупи – ДПНП ($n=28$) и ДПНП с анамнеза за ИМИ ($n=8$). Най-ниски нива на IgG AEAT се наблюдават при пациентите с ДПНП, които са дори са значително по-ниски от тези на контролната група ($p < 0,005$).

Асоциирането на ДПНП с ИМИ се съпровожда от значимо повишение в серума на IgG AEAT.

Сигнификантното намаление на IgG AEAT в серума на пациентите с ДПНП се съпровожда от значимо по-ниски ($p < 0,001$) серумни нива на свободните F-IgG AEAT.

За разлика от ИМСБ, при пациентите със ЗД тип II не се наблюдава достоверна ($p > 0,05$) промяна в синтезата на ATEAT.

Повишеният колагенов метаболизъм в групата с ДПНП се характеризира със сигнификантно повишение в серума на ACIVAT от IgG ($p < 0,05$) и IgM ($p < 0,05$) клас, както и с увеличение на CIV-CIC ($p < 0,005$).



Фиг. 9. Сравнение на електрофизиологичните параметри на пациенти с нормални серумни нива на E-AGE (лява колона) и тези с увеличени нива на E-AGE (дясна колона) за леви (лява половина) и десни крайници (дясна половина). DL, дистална латентност; NCV, скорост на провеждане; SNAP, сетивно-нервен акционен потенциал; CMAP, смесен моторен акционен потенциал

4.3.4 Диагностични и прогностични корелации на промените в метаболизма на ЕЦМП и АТ-ЕЦМП при ДНП

Анализирани са диагностичните и прогностични корелации на промените от болестния процес серумни показатели - hsCRP, EDP, гликиран HE, E-AGE, както и ABI (за абнормни са приети стойности на $ABI < 0,9$) и електроневрографските (SNAP отведен от n.suralis $< 6 \mu V$) показатели.

За целта при нормално разпределение, концентрациите на серумните показатели са определяни като патологично повишени при стойности по-високи от тези на средните за контролната група + 2 SD. При разпределение различно от нормалното за повишени са приети стойности надвишаващи 95 перцентил.

При анализ на резултатите на пациентите със ЗД тип II се установява, че в 75% (64,2 - 85,8) от случаите с патологично повишени стойности на hsCRP електроневрографското изследване открива наличието на генерализирана полиневропатия ($p < 0,05$).

Прогностичните корелации относно HbA1C показват, че пациентите с патологично повишени стойности на този показател имат висока честота 94,7% (90,7 - 98,7) на генерализирана периферно-нервна увреда ($p < 0,05$).

Подобно на HbA1C определянето на E-AGE в серума на болни със ЗД тип II има достоверна прогностична стойност при оценка риска от развитие на полиневропатия. Въпреки изразената вътрегруповата вариация на този показател в клиничната група, анализът на резултатите показва висока честота на периферно-нервна увреда - 90,7% (82,7 - 98,7) при пациенти с повишени серумни концентрации на E-AGE ($p < 0,05$).

Сравнени са средните стойности на неврографски параметри, отведени от периферни нерви на горни и долни крайници на диабетици с патологично повишени стойности на E-AGE ($n=37$) и при пациенти с нормални стойности на този показател ($n=20$). Установява се сигнификантна ($p < 0,05$) редуция на амплитудите на SNAP отведен от n. suralis, SNAP от n. medianus, CMAP от n. medianus, CMAP от n. peroneus, както и сигнификантно забавяне на скоростта на провеждане по сетивните влакна на n. medianus при пациенти с увеличени серумни E-AGE (Фиг. 9). Тези неврографски промени достигат значими нива на достоверност, както по отношение на установените норми за лабораторията, така и при сравнение с електрофизиологичните показатели на контролната група.

Маркерите за микроваскуларна увреда (повишени серумни EDP) и макроваскуларна увреда ($ABI < 0,9$) показват добри прогностични възможности при оценка на риска от развитие на ДНПН. В 70,6% (62,6-78,6) от случаите с повишени концентрации на EDP в серума, електрофизиологичното изследване е показало наличие на полиневропатия ($p < 0,05$). Двата прогностични фактора EDP и ABI изглежда не са независими един от друг, тъй като в групата с променени серумни концентрации на EDP в 83,3% (77,3 - 89,3) от случаите се установява комбинация от аксонална увреда на периферните нерви и белези за стенозиране ($ABI < 0,9$) на артериите в долни крайници ($p < 0,05$). Анализът на

резултатите на пациентите с абнормна съдова перфузия в долни крайници от своя страна също показва, че в 73,3% (62,3-84,3) от случаите съдовите промени се съпровождат от периферно-нервна увреда ($p < 0,05$).

Наличието на ДНПН се асоциира с висока честота на сърдечно-съдови заболявания (мозъчен инсулт, миокарден инфаркт и гангрена), които се намират в 84,6% (77,6-91,6) от случаите с електроневрографски установена ДПНП ($p < 0,05$). Микроангиопатията е вероятно общ патогенетичен механизъм, както за увреда на малките по размер мозъчни артерии, така и на интра- и периневралните артериални съдове, тъй като в 85,1% (75,1-95,1) от случаите генерализираната периферно-нервна увреда се асоциира с развитие на множество лакунарни инфаркти и дори лакунарен статус ($p < 0,05$).

5. ОБСЪЖДАНЕ

Сърдечно-съдовите заболявания, мозъчно-съдовата болест и мозъчният инсулт заемат приоритетно място сред заболяванията на съвременното общество. Диабетът и неговото най-често усложнение - диабетна полиневропатия са не по-малък здравен проблем. Тяхната важност се дължи не само на високата болестност и смъртност, но и на открояващата се в последните години тревожна тенденция за обхващане на все по-млади болни.

Клиничното изследване заема основно място в цялостния мениджмънт на ИМСБ и ДПНП, но неговото значение за прогнозиране на риска от усложнения и ефекта от лечението на тези болни остава ограничено. Това налага в клиничната практика да се използват допълнителни диагностични инструменти, каквито са биомаркерите. Същите осигуряват не само бързо диагностициране на настъпилите усложнения, но позволяват да се направи индивидуална оценка на риска от усложнения и ефекта от лечение на болните.

Постановката на настоящото проучване върху промените на метаболизма на ЕЦМП и тяхната роля за прогноза на риска от съдова увреда при МСБ и ДПНП включва стандартни начални етапи, прилагани при други биомаркери. Изследвани са влиянието на възрастовия и полов фактор върху метаболизма на ЕЦМП, специфичният характер на промените при остра (остър ИМИ) и хронична (ИМСБ, ДПНП) увреда на артериални съдове с малък (лакунарни инфаркти) и голям размер (обширни инфаркти), както и разпространеността на установените промени в различните тъкани (артериални съдове, периферни нерви) и биологични среди (серум, ликвор).

От голямата група на ЕЦМП, най-детайлно е проучена промяната в метаболизма на еластин и колаген тип IV. Настоящата разработка потвърждава установеното преди нас в серума на здрави лица наличие на циркулиращи деградационни пептиди. Такива пептиди се намират във всички възрастови групи, което показва че екстрацелуларният матрикс е подложен на перманентна промяна през целия живот. Наличието на EDP в серума се обяснява с действието на еластазите. Тези протеолитични ензими, предизвикващи деструкция на еластиновите фибри на съдовете, се освобождават в екстрацелуларното пространство от редица клетки - полиморфонуклеарни, алвеоларни макрофаги, макрофаги, тромбоцити, ГМК и фибробласти. В зрелия здрав организъм тяхната активност е твърде малка и добре балансирана. Поради това обстоятелство серумните нива на EDP при здрави индивиди, вкл. и в контролните групи на настоящото проучване, са относително ниски и постоянни. В детска възраст нивата на EDP в серума са сравнително високи. Това се дължи на активните процеси на ремоделиране на съединително-тъканния матрикс в подрастващия организъм. Следва продължителен период на стабилизиране на концентрациите на EDP. Относително високи серумни нива на EDP се установяват след 60 годишна възраст поради повишена активност на еластазите. Освен това, при възрастните хора активността на физиологичните инхибитори на

еластолитичните ензими и по-специално на α -антитрипсин и α -макроглобулин е намалена. От всички ЕЦМП, най-рано еластинът е подложен на такава възрастово обусловена деградация, протичаща с различна интензивност в богатите на еластин тъкани - кожа, артериална стена и бял дроб.

Имунологичните изследвания показват наличие на АЕАТ в серума на контролните лица. Други изследователи са установили възрастово обусловена зависимост на нивата на тези антитела. Така напр., в детска възраст АЕАТ те постепенно нарастват и достигат максимални серумни нива между 18 и 20 година. Следва продължителен (30-60 години) период на стабилизация (подобно на EDP), след което нивата им в серума постепенно намаляват.

Обобщеният анализ на контролните резултати в контекста на възрастово обусловеното вариране на EDP и АЕАТ ни дава основание да приемем границата от 60 години като съществена при анализ на имунологичните резултати. След тази възраст нивата на EDP в серума се увеличават, а тези на АЕАТ намаляват и само при по-възрастни от 60 години здрави лица се установяват еластин-антиеластинови циркулиращи в серума имунни комплекси. Възрастово обусловените промени в еластиновия метаболизъм настъпващи след 60 годишна възраст, наложи да се определи честотата на разпределение на участниците в контролните групи съобразно тази възрастова граница. Относителният дял лицата под 60 не се различава от този над 60 години, което ни дава основание да приемем за несъществено влиянието на възрастовия фактор върху еластиновия метаболизъм в контролните групи.

Проучени са промените в метаболизма на ЕЦМП в ликвор и серум на пациенти с ИМИ в остра и хронична фаза и такива с асимптомна ИМСБ и ДПНП. Анализирани са промените при различни клинични форми на заболяванията и различни локализации на съдова и периферно-нервна увреда. Набирането на болните е проведено мултицентрово, обхванати са пациенти от различни региони на страната. Серологичните и ликворологични проби са изследвани в университетски лаборатории. Имунологичните процедури са извършвани в Сектора по биология на МУ-Плевен, където са разработени имунологичните методи за количествено определяне на серумни EDP и АЕАТ. Приложени са лабораторни методи с доказана валидност и добра повторяемост. Електрофизиологичното и доплер-сонографско изследване са проведени от сертифицирани специалисти на съвременна апаратура. Освен промяната в метаболизма на ЕЦМП, отделно са проучени корелациите на имунологичните параметри с клинични, КТ, електрофизиологични и доплер-сонографски показатели. Определена е диагностичната и прогностичната стойност на промените в метаболизма на ЕЦМП по отношение на смъртността и честота на хоспитализации от ССЗ.

От проучването са изключени болни със съпровождащи заболявания, които по литературни данни повлияват метаболизма на ЕЦМП. Техният малък брой няма съществено значение за достоверността на получените резултати.

Изследваните пациенти са хетерогенна в клинично отношение група, което наложи преразпределение на болните в отделни подгрупи. Сравнителният

анализ на клиничните и лабораторни резултати, както и прогностичните корелации с демографските показатели са проведени за всяка една от подгрупите поотделно.

Постановката на проучването и поставените задачи наложиха да се използват 3 контролни групи.

Първата група контролни лица, използвана за сравнителен анализ на резултатите при остър ИМИ бяха с нормален неврологичен статус, хоспитализирани по повод на първоначална суспекция за субарахноиден кръвоизлив и менингит, която е отхвърлена след клинично, КТ и лабораторно изследване (вкл. ликворологично изследване).

Втората група контролни лица, използвана за сравнителен анализ на резултатите при асимптомна ИМСБ и ИМИ в хронична фаза бяха с нормални резултати при ултразвукото изследване на мозъчните артерии, нормален неврологичен, психичен и соматичен статус и без анамнеза за МСБ (вкл. преходни исхемични нарушения).

Третата група контроли лица, използвана за анализ на резултатите на пациентите с ДПНП бяха с нормални неврографски показатели, неврологичен, психичен и соматичен статус и без анамнеза за нарушен глюкозен метаболизъм. Част от участниците в тази контролна група са напълно здрави индивиди или такива с ишиалгични оплаквания. Всички имаха нормална сетивна и двигателна неврография на горни и долни крайници.

За клинична оценка на неврологичния дефицит са използвани общоприети и лесно изпълними скали. Клиничната тежест на инсульта е оценявана съобразно критериите на Canadian Neurological Scale (Канадска Неврологична Скала). Изборът на тази скала се базира на бързата и лесна оценка на промените в съзнанието, речевите функции и ориентацията, силата на проксимални и дистални мускули на горни и долни крайници. Тази скала е валидизирана в клиничната практика, а оценъчните и показатели не се влияят съществено от наличието на речев дефицит.

Етиологично и патофизиологично, исхемичните инсулти са класифицирани съгласно критериите на TOAST (Trial of Org10172 in Acute Ischemic Stroke) на кардиоемболични, атеротромботични, лакуарни и такива с неопределена етиопатогенеза. Тази класификация е използвана в редица клинични проучвания и възможно най-пълно отразява патогенетичния механизъм на мозъчно-съдовата увреда.

Локализацията и размера на исхемичната лезия е определяна съгласно критериите на Oxfordshire Community Stroke Project (OCSP), тъй като на този етап тя отразява най-точно промените в паренхима на мозъка и локализацията на съдовата увреда.

ДПНП е диагностицирана съгласно критериите на EURODIAB IDDM Complications Study. Показателите на тази скала отразяват размера и тежестта на увреда на нервните влакна и могат да се използват при сравнителен анализ на клинични и електрофизиологични резултати.

EDP и АЕАТ са количествено определяни по метод на принципа на ELISA, разработен за серум от Baydanoff и съавт. (1987, 1988) и оптимизиран за ликвор от Nikoloff и Tzvetanov (2008).

Първата група резултати са получени при изследване на ликвор и серум на болни с **остър исхемичен мозъчен инсулт**.

Първоначално е проведен Western blot анализ за определяне на EDP в ликвора. За първи път в страната и чужбина се установява наличие на EDP в ликвор получен от пациент преживял ИМИ. Антигененият анализ на ликвора показва присъствие на еластин, което се доказва от свързаните към две от неговите фракции АЕАТ (Фиг. 1).

За първи път се установява, че острата мозъчна исхемия води до повишена еластолиза, предизвикваща деструкция на еластиновите влакна на малките мозъчни съдове, последвана от значимо повишение на EDP в ликвора. Възможни са два патогенетични механизми, обясняващи сигнификантното повишение на EDP в ликвора на болни с остър ИМИ.

Първият механизъм свързва повишението на EDP в ликвора с дифузия от серума, поради повишена от хипоксията пропускливост на кръвно-мозъчната бариера. Отсъствието на клинични белези за прогресия на неврологичния дефицит на болните и ликворологични промени, съвместими с пробив на кръвно-мозъчната бариера, показват че продължителната микроваскуларна генерализирана увреда на съдовото русло е по-вероятна причина за това увеличение, отколкото острата исхемична увреда.

Друг възможен механизъм е директното проникването на EDP в гръбначно-мозъчната течност от исхемизирани капиляри на хороидния плексус и/или разположени в близост до мозъчните вентрикули интрацеребрални съдове. Твърде вероятно като допълнителен увреждащ фактор за еластина да се намесват и АЕАТ, които намираме увеличени както в ликвора, така и в серума на болните с остър ИМИ. Тази антияло обусловена увреда на еластина на мозъчните съдове със сигурност предхожда острия съдов инцидент и вероятно е провокирана от продължителната хипоксия и дифузната увреда на малките мозъчни съдове. В подкрепа на това становище са положителните корелации на ликворните EDP с нивата на серумните IgG АЕАТ, както и повишението на E-CIC в серума на болни с асимптомна ИМСБ.

Не бива да се отхвърля и възможността за ендоцитоза и дори активен транспорт на EDP от серума към ликвора, каквито процеси са наблюдавани при други пептиди. Такъв тип транспортни механизми за проникване на EDP в ликвора са възможни от гледна точка на неодавна открития еластин-рецепторен комплекс.

Повишените нива на EDP в системната циркулация се съпровождат от повишена синтеза на АЕАТ. Интерес представлява установената в ликвора на болните с ИМИ локална синтеза на АЕАТ. Нормалните стойности на CSF/серумен албуминов индекс и повишението на АЕАТ от IgM клас в ликвора предполагат интратекален произход на установената антиеластинова антиялосинтеза. Началото на този процес вероятно предхожда острия съдов

инцидент, тъй като освен IgM се наблюдава и повишение на АЕАТ от IgG клас. Установените положителни корелации с клинични и КТ показатели, отразяващи степента на исхемична увреда на мозъка, показва че АЕАТ оказват допълнително увреждащо въздействие върху мозъчните съдове с малък размер. По този начин паралелно протичащата на серума, АЕАТ в ликвора се явява другата страна на вече установения в серума "АЕАТ-ЕДР-АЕАТ порочен кръг". Всичко това имплицира хипотезата, че нарушеният еластинов метаболизъм и синтезираните АЕАТ играят важна роля в патогенезата на лакунарните инфаркти на мозъка. Доказването на подобна хипотеза изисква друг тип постановка, както и решаване на допълнителни задачи, някои от които върху експериментални модели. Едно бъдещо проучаване на подобна хипотеза, основаващо се на разработените от нас методи, е оправдано от теоретична точка. Промените при болните с ИМСБ се дължат на специфични процеси, които избирателно засягат еластина и не повлияват останалите компоненти на екстрацелуларния матрикс. Това недвусмислено показва, че промяната на метаболизма на еластин при ИМСБ се явява в резултат от активирана от хипоксията селективна еластолиза. Макар и в известен смисъл изненадващ, този резултат има своето патогенетично и филогенетично обяснение. Важен фактор в прехода от отворена към затворена кръвоносна система се явява промяната на стената на кръвоносните съдове. Основен компонент на артериалната стена при гръбначните животни е мрежата от еластични влакна, която се организира от ГМК. Еластинът и асоциираните с него протеини се синтезират и секретират от съдовите ГМК и представляват основни компоненти на депозираната в съдовата стена екстрацелуларна матрица. Само еластинът съставлява 50% от нейното сухо тегло. В артериите еластинът определя механиката на тъканите при ниско мускулно напрежение преди ангажирането на нееластичните колагенови влакна. Патологичните състояния, каквито са артериална хипертония и атеросклероза водят до ремоделиране на съдовата стена, нарушаващо правилното и функциониране. При атеросклероза патологичното отлагане на холестерол и калций в еластиновите влакна на аортата е свързано с промяна в аминокиселинния състав на еластина и неговите връзки. Активираните при атеросклероза макрофаги секретират редица протеинази - еластаза, ММП-2, ММП-9, и ММП-12, които допълнително усилват разграждането на еластиновите влакна. Това от своя страна увеличава полярността на еластина и повишен афинитета му към калций, което в краен резултат води до калцификация на съдовете. Деструкция на еластиновите влакна съпровожда редица заболявания - некротизиращи васкулити, гиганто-клетъчен артериит и хронични заболявания на белия дроб. Високи серумни нива на ЕДР са установявани при пушачи и пациенти с хронична обструктивна белодробна болест.

Анализът на клиничните и имунологични резултати установява позитивна корелация на серумните ЕДР концентрации с постинсултната инвалидност и негативна корелация с мускулната сила на засегнатите крайници. Установяване

на подобна корелации още веднъж потвърждава становището, че EDP не са просто сурогатен продукт на еластиновия метаболизъм. Тези пептиди притежават биологична активност и могат да взаимодействат с различни клетки, като тези взаимодействия са опосредствани от специфичен рецептор за еластин. Доказано е EDP имат хемотаксично и увреждащо въздействие върху моноцити, активират еластазата, както и някои металопроотеинази. Те пептиди предизвикват освобождаване на свободни радикали и оксидация на LDL, както и повишена ендогенна синтеза на холестерол.

Най-съществени промени в еластиновия метаболизъм установяваме при пациенти с лакунарни инфаркти. Интерес от патогенетична гледна точка представлява позитивната корелация на броя на лакуните и нивата на EDP в серума. Патофизиологията на лакунарните инфаркти (съставляващи $\frac{1}{4}$ от всички исхемични инсулти) не е докрай изяснена. За малка част от тях е доказано, че се причиняват от емболизиране на артерия в артерия, кардиогенна емболия или стенозиране на интракраниални артерии. От друга страна, някои изследователи намират повишени серумни инфламаторни биомаркери при болни с лакунарни инфаркти, което предполага участие на възпалителни механизми в увредата на малките съдове. Некротизиралите мозъчни структури и микросъдове могат да иницирират производство на автоантитела срещу променени от исхемията антигенни детерминанти. В серума на инсултно болни са установявани автоантитела срещу невронални антигени, неврофиламенти и кардиолипин. Исхемично обусловена деструкция на еластина се наблюдава при синдром на CADASIL (церебрална автозомно-доминантна артериопатия със субкортикални инфаркти и левкоенцефалопатия), пациенти с напреднала атеросклероза, ЗД и редица колагенози.

За първи път е установено повишение на EDP в ликвора на пациенти с лакунарни инфаркти и исхемични реинсулти. Някои важни от теоретична и практическа гледна точка тенденции заслужават да бъдат коментирани.

Първо, болните с увреда на малките мозъчни съдове (лакунарни инфаркти) имат сигнификантно по-високи нива на EDP в ликвора (10 пъти повече) в сравнение с болните, при които се установява обструкция на среден или голям по размер артериален съд (обширни инфаркти). Въпреки неголемия брой болни, различията между двете групи са съществени и едва ли се дължат на случайни фактори. Обяснението на този резултат може да бъде само хипотетично. Въпреки че лезията на голям артериален съд може да доведе до освобождаване на по-голямо количество EDP, същите под въздействие на кръвния ток се "отмиват" в системната циркулация. Тази хипотеза се основава на високите серумни концентрации на EDP при nelaкунарни (обширни) инсулти, чиито ликворни нива на EDP са по-ниски от тези на лакунарните инфаркти. Възможно е повишението на EDP при болните с обширни инфаркти да се дължи на съпровождащата атеросклерозата на големите съдове генерализирана увреда на малки и средни по размер мозъчни съдове.

Второ, най-високи ликворни и серумни концентрации на EDP се наблюдават при пациентите с исхемични реинсулти (в преобладаващия брой случаи, това са повторни лакунарни инфаркти). Този резултат ни позволява да заключим, че не толкова размерът на засегнатия съд, колкото специфичният патогенетичен механизъм на васкуларна увреда определя тежестта на еластиновата деструкция. Атеросклеротичните лезии на малките церебрални съдове, водещи до развитие на множество лакунарни инфаркти, могат да засегнат интегритета на еластиновите им влакна, което води до последващо отделяне на деградационни пептиди в серума и ликвора на болните. Тяхното установяване в ликвора отразява пространствената разпространеност на микроваскуларната увреда на мозъка. Този наш резултат е в съгласие с намереното от други изследователи увеличение на EDP при диабетна микроангиопатия и повишените серумни нива на IgA AEAT при деца с диабетната ретинопатия.

Най-високи нива на EDP се установяват в гръбначно-мозъчна течност на пациенти с исхемични реинсулти. Възможно е повишението да се дължи на поголемия брой исхемични лезии при тези болни. Клиничната симптоматика при болните с лакунарни инфаркти понякога акцелелира без да се визуализират допълнителни лезии. Това е често срещан клиничен факт при болни с лакунарни инфаркти. Една такава латентно протичаща генерализирана увреда на малките съдове най-достоверно може да обясни акумулирането на голямото количество EDP в гръбначно-мозъчната течност на пациентите с лакунарен статус и тези с исхемичен реинсулт (въпреки отсъствието на информация за техния клирънс от ликвора). Не бива да се пренебрегва и обстоятелството, че EDP са мощен активатор за синтеза на антиеластинови антитела, които могат да увредят *de novo* иначе интактните еластинови влакна. Такъв патогенетичен механизъм е вече установен при деца със ЗД, където увеличението на AEAT в серума корелира с тежестта на микроангиопатията на ретината и бъбреците.

Антигенният потенциал на еластина за първи път е докладван от Stein и съавт. още в далечната 1965 г. и е потвърден в няколко проучвания след това. Разтворимата форма на еластин - α -еластин е оксалациден хидролизинов продукт на неразтворимия зрял еластин. Оксаловата киселина неспецифично разцепва еластиновите пептидни вериги и така се получава една хетерогенна популация от пептиди, вариращи от 100 kDa до 10 kDa. Такова произволно разцепване несъмнено експозира многобройните антигенни детерминанти на действието на AEAT. Понастоящем са установени две основни антигенни места за свързване върху еластиновата молекула – едното видовоспецифично, а другото с широковидова кръстосана реактивност. Човешкият серум нормално съдържа ниски нива на IgG, IgA, IgM и IgD α -AEAT, които имат физиологичната и патофизиологична роля.

Установените промени в метаболизма на еластина при васкуларна увреда с различни локазации не са органоспецифични. Това се дължи на факта, че антигенните детерминанти на еластина не са специфични за различните органи и подлежат на патологична промяна не само при

васкулопатия, но и при заболявания на стави, бели дробове и кожа. Високите нива EDP, установени в един относително изолиран от системната циркулация компартмент, както е гръбначно-мозъчната течност, могат да имат произход единствено от съдовете на мозъка.

Подобно на АЕАТ, ликворното увеличение EDP може да е резултат от два патологични процеса: 1/ пенетрация през увредени от исхемията мозъчни съдове и/или 2/ пасивна дифузия от серума в ликвора. Вторият механизъм е твърден възможен при пациентите с обширни ИМИ, поради настъпваща в острата инсултна фаза дисфункция на кръвно-мозъчната бариера. Макар и не толкова често, при лакунарен инфаркт с тежък неврологичен дефицит е възможен „пробив“ на кръвно-мозъчната бариера. Поради това заедно с EDP е изследван и CSF/албуминовия индекс и при повишение >10, стойности показващи тежка увреда на кръвно-мозъчната бариера, болните са изключвани от проучването.

За първи път се анализират прогностични корелации на EDP в серум и ликвор на болни с остър ИМИ и показатели за смъртност от ССЗ (ИМСБ, исхемична болест на сърцето) и честота на хоспитализации по повод на ССЗ. Периодът на проследяване на болните е по-голям от 5 години – достатъчно време, за да се направят достоверни изводи. Данните за смъртността от ССЗ са надеждни, изследвани са показателите смъртност и честота на хоспитализации, тъй като за тях се води регистър в службата на ЕСГРАОН и РЗОК-Плевен. За теоретична е приета честотата, цитирана на страницата на НСИ за структура на смъртността в северозападен регион.

Анализът на прогностичните корелации показва преваляване на смъртността от ССЗ и по-висока честотата на хоспитализации по повод на ССЗ при пациентите с патологично повишени стойности на EDP. Това от своя страна позволява да направим заключението, че серумното повишение на EDP не е страничен резултат от хипоксичната увреда в острата инсултна фаза, а отразява съществената промяна на еластиновия метаболизъм при ИМСБ и представлява важен в прогностично отношение показател.

С оглед комплексната оценка на увредата на екстрацелуларния матрикс при ИМСБ, метаболизмът на ЕЦМП е изследван и при пациенти с **хроничен ИМИ и асимптомна ИМСБ**. При ИМСБ са възможни най-общо 3 механизма на увреда на еластиновите влакна: 1/ деструкция на еластина, предизвикана от активирани в острата инсултна фаза еластолитични процеси; 2/ постинсултна продължаваща във времето деструкция на еластин в резултат от действието на антиеластинови автоантитела, синтезирани срещу хипоксично/исхемично променени еластинови детерминанти и 3/ деструкция на еластинови влакна в състава на т.нар. „фиброзна шапка“ на атеросклеротичната плака, водеща до нейната дестабилизация и съответно остър съдов инцидент. Последният механизъм е от особено важност във връзка с установената напоследък патофизиологична връзка между дестабилизацията на плаката и развитието на острия съдов (коронарен или мозъчен) инцидент. Счита се, че именно активирането на ММП е отговорно за деструкция на „фиброзната шапка“ и

последващата дестабилизация на плаката. Освен това, васкуларното ремоделиране на съдовете, което предхожда превръщането на неактивните в активни плаки, е също причинено от ММП в отговор на хемодинамични промени и се модулира от взаимодействието на реактивните азотни и кислородни продукти. Всичките тези, потвърдени от експерименталните проучвания патологични механизми, са релевантни на *in vivo* установените от нас промени в метаболизма на ЕЦМП.

Анализът на резултатите при пациенти с асимптомна ИМСБ и хроничен ИМИ показва, че промяната в метаболизма на ЕЦМП е продължаващ във времето процес и не възниква непосредствено при руптура на плаката. Промените на еластиновите фибри на съдовете предхождат възникването на остър мозъчно-съдов инцидент, персистират и се задълбочават в хроничната постинсултна фаза. Серумните нива на EDP при болните с ИМИ в хронична фаза са по-високи от тези с асимптомна ИМСБ, които от своя страна имат значимо по-високи концентрации от тези на контролната група. За разлика от острата инсултна фаза, при хроничен ИМИ и асимптомна ИМСБ болестният процес ангажира и други компоненти на екстрацелуларния матрикс освен еластина. Така напр., при пациенти с асимптомна МСБ се установява повишение на нивата TE в серума. Подобна тенденция се наблюдава и по отношение на CIVDP, чиито серумни концентрации са най-високи в групата на хроничния ИМИ. Както при хроничен ИМИ, така и асимптомната МСБ се установява наличие на CIC в серума. Най-високи серумни концентрации на циркулиращи комплекси имат болните с асимптомната МСБ, при които са повишени CIV-CIC и TE-CIC. Имунните комплекси представляват хетерогенни агрегати с високо молекулярно тегло, които са образувани в отговор на антигени и в повечето случаи включват С3 фракцията на комплемента. Когато имунните комплекси се образуват бързо, те са подложени на почистване в циркулацията и могат да предизвикат имунокомплексна болест. Пример за това са редица болестни състояния - свръхчувствителност към лекарства, ревматоиден артрит и системен лупус. За първи път в настоящото проучване се установява съществено повишение на тези комплекси при ИМИ и асимптомна МСБ. Такива промени са докладвани при деца със ЗД тип I от Nikoloff и съавт., (2000 - 2004), които установяват корелации на повишените нива на CIC от IgG клас и повишения риск от развитие на диабетна нефропатия. Нашите резултати потвърждават увреждаща роля на имунните комплекси върху съдовете и важната роля на имунната система за предотвратяване на микроваскуларните нарушения. Имунологичното скриниране на болните, които са по-чувствителни към такъв тип имунокомплексно нарушение на съдовете е от особена практическа важност. Въпреки че точният механизъм на увреда не е напълно изяснен, установяването на повишени нива на CIC в серума на деца и възрастни с васкуларни рискови фактори е неблагоприятен прогностичен фактор за бъдеща васкуларна увреда.

При пациентите с хроничен ИМИ се установява съществено повишение на активността на серумната ММП-2. Серумните нива на ММП-9 остават

непроменени при тези болни. Този резултат е в съгласие с установената в експериментални условия болестно повишена експресия на ММП, водеща до увреждане на най-вътрешния слой на артериите и миграция на ГМК в посока към медиалните части на съда. Точният механизъм, водещ до интимална пролиферацията на ГМК е все още неясен, но ранното мигриране и пролиферация на тези клетки в местата на атеросклеротична увреда има несъмнено патологично значение. Друг механизъм, допринасящ за усложнение на атеросклеротичните лезии е рекрутирането на възпалителни клетки от системната циркулация. Този процес се медира от взаимодействието на ГМК с експресирани по повърността на съдовия ендотел адхезионни молекули. Механизмите, позволяващи последващо преминаване на левкоцитите през ендотелния слой и базалната мембрана на съдове в голямата си част остават неизяснен. Експерименталните данни показват, че ММП играят важна роля и в това отношение. Клетъчното *in vitro* наблюдавано взаимодействие на Т лимфоцити и човешки ендотелни клетки води до повишено секретирание на ММП-2. Деструкцията на базалната мембрана, обусловена от действието на ММП, предизвиква бариерна дисфункция на ендотела. Подобен механизъм вероятно причинява и наблюдаваното от нас увеличение на EDP в ликвора на болни с лакуарни инфаркти. Веднъж проникнали в стената на съда, ГМК си взаимодействат с ЕЦМП и оксидираните липиди, което от своя страна води до утежняване на атеросклеротичните промени.

Увеличените ЕЦМП в серума на болните с хроничен ИМИ и асимптомна МСБ корелират с нивата на синтезираните срещу тях антитела. При това се наблюдава специфична за болните с ИМСБ констелация на намаление на свободните АЕАТ и увеличение на циркулиращите Е-СІС. Такова съществено намаление на АЕАТ от ІgG клас се наблюдава и при пациентите с ДПНП.

Асимптомната ИМСБ се характеризира с екстремно повишение на серумните АЕАТ антитела при асоциирането и с остър съдов инцидент. Хроничната фаза на ИМИ се съпровожда от продължително повишение на серумните ІgG АЕАТ. Тези резултати показват, че метаболизмът на еластина при съдови заболявания на мозъка е динамичен процес, който отразява клиничния ход на атеросклерозата. Нещо повече, той е разпространен в тъканите процес и протича с различна интензивност в различните биологични среди (кръв, ликвор).

Интересен резултат (според нас, недостатъчно проучен на този етап) представлява редуцирането на нивата на АЕАТ от ІgG клас в серума на болните с асимптомна МСБ и ДПНП. В известен смисъл тези заболявания са близки в патогенетично отношение, но с различна локализация на патологичния процес – микроангиопатия на церебралните съдове при МСБ и микроангиопатия на периферно-нервните съдове при ДПНП. Абнормно ниски серумни нива на АЕАТ се докладват за първи път при съдови заболявания на мозъка и периферните нерви. Такова намаление е установявано при пациенти с фибромиалгия и ревматична полимиалгия. Проспективното проучване на Fiskesund и съвт., (2010) установява екстремно ниски серумни нива на

антифосфорилхолинови антитела в част от популацията на Северна Швеция, което намаление е независим рисков фактор за развитие на исхемичен инсулт. Функцията и значението на АЕАТ при пациентите с ИМСБ могат да се разглеждат и в такъв аспект, като изпълняващи роля на неутрализиращи автоантитела - хипотеза, заслужаваща да бъде проверена в бъдещи проучвания.

В последните години в здрави индивиди са открити няколко вида натурални антитела, които неутрализират и очистват организма от автоантигените. Тези протективни антитела са от IgM клас и се свързват с оксидационно-специфичните епитопи на оксидираните LDL и апоптозните клетки или инактивират предизвикващите молекулярна мимикрия микробни антигени. Подобно на ревма фактора, АЕАТ също биха могли също да играят ролята на неутрализиращи автоантитела, но установената редукция на АЕАТ при МСБ и ДПНП касае единствено IgG антителата, което най-вероятно се дължи на включването им в имунни комплекси. Антиеластиновите антитела са част от механизмите за очистване на организма от EDP. Това става чрез формиране на имунни комплекси на АЕАТ и EDP и последващо фагоцитиране от клетки на ретикуло-ендотелната система. Установено е, че на фагоцитоза са подложени единствено EDP-АЕАТ имунни комплекси с големи размери. Те са неразтворими и подлежат на отстраняване от фагоцитиращите клетки. Имунните комплекси с малки размери имат по-съществена увреждаща роля, тъй като те имат свойството да се депозират в стената на малките съдове. Това отлагане води до развитие на микроангиопатия. Съществуват директни доказателства за наличие на протеини, включително имуноглобулини, акумулирани в екстрацелуларния матрикс на малките съдове при диабетно болни. Установените от нас промени при възрастни пациенти с ИМСБ и ДПНП и проучванията при деца с диабет тип I, показват че E-CIC предизвикват васкуларна увреда, каквато е вече установена за други имунни комплекси - AGE-CIC, инсулин-CIC и тотални CIC.

Анализът на демографските и клинични характеристики на болните с асимптомна МСБ и хроничен ИМИ потвърждават, че високото средно телесно тегло, систолната артериална хиперония, алкохолната злоупотреба и тютюнопушенето корелират с по-висока честота на ИМИ. Подвърждава се и ролята на наднорменото тегло в развитието на съдови лезии на бялото мозъчно вещество и корова атрофия при пациенти с асимптомна МСБ.

Потвърждава се прогностичната роля на hsCRP като биомаркер за съдова увреда. При болните с ИМИ серумните нива на този показател са двукратно повишени. Не се установяват различия в нивата на общия холестерол, TG, HDL и LDL при ИМИ в сравнение с контролната група. Основна причина за това според нас е системно провежданата при тези болни статинова профилактика. Промени в серумните нива на CRP са докладвани при пациенти с остра коронарна исхемия и нестабилна стенокардия. Този възпалителен биомаркер има прогностична стойност при оценка на риска за развитие на

остър коронарен инцидент, при условие че се определя съвместно с тропонин, мозъчен натриуретичен пептид и миелопероксидаза.

Сравнени са серумните концентрации на EDP, TE, CIVDP, E-CIC, TE-CIC, CIV-CIC, E-AGE и синтезираните срещу тях AEAT, AE-AGE, ATEAT, ACIVAT от всички класове при асимптомна и симптоматична стеноза на ВСА. Метаболизмът на еластина при пациенти с усложнена с инсулт стеноза на ВСА е значително активиран и се характеризира с по-високи серумни нива на EDP. По-слаби са различия се наблюдават между двете групи по отношение на TE и CIVDP. Значимо по-високи концентрации на CIV-CIC и TE-CIC се намират при пациентите със симптоматична стеноза, което още веднъж подвърждава увреждащата роля на имунните комплекси за дестабилизация на плаките.

Повишен метаболизъм и повишени серумни концентрации на EDP при симптоматична каротидна стеноза са докладвани от Petersen и съвт., (2002). Те установяват повишение на EDP при пациенти с улцерирани атеросклеротични плаки на каротидната артерия, като повишението е дори по-голямо от това при аневризма на коремната аорта.

Както показват нашите и резултатите на други изследователи, съдържанието на EDP в серума рефлектира на интензитета на еластолитичните процеси в атеросклеротичната плака. Базирайки се единствено на това повишение, клиницистът в никакъв случай не може да направи извод за евентуалната локализация на съдовата увреда, тъй като атеросклерозата е системен процес и генерализирано ангажира артериалното съдово русло.

В клиничната практика полезен индикатор може да се окаже повишените серумни нива на AEAT от IgM и IgG клас при пациенти с усложнена стеноза на ВСА. Намаленото ATEAT/AEAT “синтез/деградационно” съотношение в серума на пациенти с усложнена с ИМИ стеноза на ВСА може да се използва като прогностичен маркер за определяне на рисковите от дестабилизация на плаката пациенти.

Този резултат има своето патофизиологично обяснение. Нивата на AEAT намаляват при съзряване на индивидите, като достигат най-ниски стойности след 60 годишна възраст. Подобно на AEAT, директното измерване на антитропоеластиновата синтеза показва най-високи стойности в късния фетален и неонатален период. Най-висок еластинов търновър се установява в неонаталния и предпубертетния период. Редица проучвания показват, че серумните антитела срещу тропоеластин и еластин са отделно специфични и корелират със съответните им пептидни нива в отделните възрастови групи. По този начин измерването на IgG AEAT се явява също индикатор на еластиновия метаболизъм. Разграничават се два основни процеса – синтез и деградация на еластин. За синтез-деградационното съотношение се знае, че рефлектира на продукцията и разграждането на еластина и това може да се установи, чрез измерване на серумните антитела срещу тропоеластин и отделно срещу α -еластин. При системна склероза се наблюдават и двата процеса, което се потвърждава от промените в нивата на антителата срещу тропоеластин и α -

еластин. Нивата на антитропоеластиновите антитела са намалени за разлика от анти- α -еластиновите антитела, които са увеличени при пациенти със системен лупус. Подобни промени на АЕАТ са докладвани и при нодозен полиартериит, ревматоиден артрит, полимиозит и редица васкулити.

Анализът на корелациите на hsCRP, EDP, E-AGE, CIVDP, CIC, АЕАТ и АТЕАТ от IgG клас при пациентите с асимптомна МСБ показва, че тези имунологични показатели притежават прогностични възможности за оценка на атеросклеротичните промени на ВСА (IMT > 1,3 mm), броя на лакунарните лезии и размера на мозъчния инфаркт. Потвърждава се прогностичната роля на hsCRP като васкуларен биомаркер. Нашите резултати показват, че този показател има по-добри възможности за оценка на риска от развитие на обширни инфаркти в сравнение с лакунарните инфаркти.

Близки до тези на hsCRP са прогностичните и диагностични корелации на EDP. Високият относителен дял на обширните и лакунарни мозъчни инфаркти, както и високата честота на атеросклеротични промени при пациенти с патологично повишени серумни EDP показва, че този показател може да се използва като маркер за оценка на риска от атеросклероза на мозъчните съдове.

За първи път се изследват диагностичните възможности на E-AGE за оценка на риска от развитие на атеросклеротични промени на мозъчните съдове. Резултатите категорично показват, че патологично повишените стойности на този показател са рисков фактор за развитие на атеросклероза на мозъчните съдове в 88,9% от случаите.

Близки до EDP са прогностичните възможности на ТЕ пептиди в серума. Този показател има по-добри възможности при прогноза на риска от възникване на обширни инфаркти и по-слаби при прогноза на лакунарните инфаркти.

Промяната в метаболизма на колагеновите пептиди има добра прогностична стойност по отношение на лакунарните инфаркти и по-слаби от тези на EDP възможности за прогноза на риска от атеросклероза на големите мозъчни съдове.

Ултразвуковото изследване на екстрацеребралните артерии на пациенти с патологично ниски нива на АТЕАТ показва, че те корелират с по-висок риск от развитие на атеросклероза и съответно с по-абнормни стойности на IMT. Патогенетичното обяснение на този резултат е, че тези антитела отразяват съдържанието на ТЕ пептиди в серума и съответно свързаната с тях еластосинтеза. Корелационният анализ на този показател показва достоверни прогностични възможности по отношение на риска от атеросклероза на големите мозъчни съдове и развитие на обширни инфаркти.

Анализирани са промените в метаболизма на ЕЦМП при пациенти с **диабетна полиневропатия**. Сравнени са имунологичните показатели на пациентите с клинични и електрофизиологични данни за ДПНП с тези на диабетно болни, при които не е установена такава. Метаболизмът на еластин и колаген при ЗД е бил обект на няколко други проучвания при деца със ЗД тип I. Изследвани са били концентрациите на деградационните пептиди и

корелациите им с клинични и параклинични показатели. Този раздел от настоящата разработка има за цел да се изследват комплексно промените на матриксните протени, настъпили в резултат от ЗД тип II и/или късните му периферно-нервни и съдови усложнения.

Анализът на резултатите при пациентите със ЗД без невропатия показва, че метаболизмът на ЕЦМП е също променен в насока на повишена деструкция на пептидите, но интензивността на тези промени не достига нивата при МСБ и ИМИ. ЗД тип II е характеризира с повишение на EDP в серума - резултат от увеличена еластолиза, последвана се от увеличена синтеза на тропоеластин и съществено повишение на циркулиращите в серума ТЕ пептиди.

Важна за клиничната практика е констатираната промяна в нивата на E-AGE, чиито серумни концентрации са съществено повишени при пациентите със ЗД тип II. В последните години се натрупаха достатъчно данни в потвърждение на патологичното значение на ексцесивната гликолизация за съдовите компликации при ЗД. Увеличената продукцията на AGE индуцира макрофагиална синтеза на интерлевкин 1 и α -тумор-некротичен фактор, които от своя страна стимулират пролиферацията на ГМК. Повишената еластазна активност на тези клетки акцелелира еластиновата деструкция на артериите на диабетно болните и предизвиква увеличение на EDP в серума.

За разлика от ИМСБ, където основно е променен еластиновият метаболизъм, при ЗД тип II се засягат допълнително и колагеновите пептиди. Повишеният метаболизъм на колагена при диабетно болните се съпровожда от сигнификантно увеличение на CIV-CIC в серума.

Болните с електрофизиологично потвърдена ДПНП имат съществено по-високи концентрации на EDP в серума от тези на пациентите с нормални доплерсонографски и електрофизиологични показатели. Асоциирането на противоположни по своя характер процеси - еластолиза с високи нива на EDP и еластосинтеза с увеличени нива на ТЕ при пациентите с ДПНП, наподобява едновременно протичащите при диабетно болните денервационни и реинервационни процеси.

Настоящото проучване потвърждава положителните корелации на отразяващите промяната на еластиновия метаболизъм имунологични показатели и клиничния ход на диабета. Увеличената ригидност на еластиновите влакна в съдовата стена при ЗД се дължи на нарушения интегритет на еластиновата мрежа, причинен от биохимични процеси предизвикващи модификация на пептиди и нуклеинови киселини на основата на т.нар. реакция на Maillard (алдолова кондензация и формиране на Schiff бази). Въпреки засиления в последните години интерес, изследователите не успяха установят съществуване на натурални защитни механизми срещу тези процеси. Необяснимо на този етап остава очевидното negliжиране от страна на природата на тези процеси, както и липсата на протекция срещу новообразуваните гликирани пептиди и техните ефектите върху организмите.

Изследвани са серумните концентрации на E-AGE при пациенти със ЗД тип II с полиневропатия и при такива без ДПНП. E-AGE е *in vitro* гликиран

еластинов антиген, който експресира еднакви с останалите гликирани протеини AGE епитопи. Основание да предприемем тази задача ни даде известният в литературата факт, че HbA1C (хемоглобинови гликирани форми, известни и като продукти на Amadori) не представляват истински AGE продукти. Често изследваният в клиничната практика показател - HbA1C е индикатор за хипергликемия с давност от 6 до 12 седмици, въпреки че гликолизация настъпва при далеч по-продължителна хипергликемията. От друга страна, нарушенията в структурата на артериалната стена при ЗД се свързват с промяна на екстрацелуларния матрикс, която настъпва в резултат от гликиране на нейните компоненти. От протеините на екстрацелуларния матрикс, еластинът е най-подходящия субстрат за подобни процеси, тъй като метаболизмът му е най-бавен и поради това е изложен на най-продължителна хипергликемична експозиция. Биохимичният анализ на Winlove и съавт., (1996) установява наличие на гликирани лизини на еластинови мономери след 12-дневна инкубация с 250 mmol/l глюкозен разтвор. Акцелирираната неензимна гликолизация на еластина предизвиква формирането на нови епитопи по неговите ламели. Модифицираните по този начин E-AGE имат повишена имуногенност и отключват автоимунен отговор. Възможно е някои от E-AGE след асоцииране с насочени срещу еластиновите им епитопи антитела да участват във формиране на имунни комплекси. Подобно на E-C1C и тук са възможни два вида имунни комплекси. Неразтворимите имунни комплекси се отлагат се в съдовата стена, а разтворимите циркулират в серума. По този начин гликираният васкуларен матрикс се явява идеален субстрат за свързването на E-AGE с анти-E-AGE антитела. С посредничество на еритроцитите тези имунните комплекси се предават на фагоцитиращите клетки.

Развитието на микроваскуларни нарушения при болните с ДПНП корелира със стойностите на HbA1C. При това този метаболитен показател има прогностично и диагностично значение. Пациентите с патологично повишени стойности на HbA1C имат по-висока честота на генерализирана периферно-нервна увреда.

Подобни по сила и характер на тези корелации са изчислените зависимости на клиничните и електрофизиологични показатели от нивата на E-AGE. Честотата на периферно-нервната увреда при пациенти с повишени концентрации на E-AGE е относително висока - 90,7%. За първи път се изследват корелации на електрофизиологичните промени при ДПНП и серумните нива на E-AGE. Установява се съществена редукция на амплитудата на SNAP от n. suralis, SNAP от n. medianus, CMAP от n. medianus, CMAP от n. peroneus, както и сигнификантно забавяне на скоростта на провеждане по сетивните влакна n. medianus при пациенти с повишение на серумните E-AGE. Изследването на този показател може да се окаже надежден маркер за прогностична оценка на риска от васкуларни и периферно-нервни увреждания при ЗД тип II.

Колагеновият метаболизъм е също активиран при пациентите с електрофизиологично потвърдена ДПНП. Генерализираната периферно-нервна

увреда се съпровожда от сигнификантно повишение на серумните ACIVAT от IgG и IgM клас, както и от увеличение на CIV-CIC.

Обобщеният анализ на имунологичните промени при пациентите със ЗД показва, че атеросклеротичните промени в съдовете на болните с ДПНП се съпровождат от акцелелирана деструкцията на ЕЦМП и в частност на еластиновите ламели. Разработването на надеждни тестове за оценка на васкуларната увреда в ранна фаза би осигурило скринирането на болните с повишен риск и мониторирането на тяхната прогресия. Настоящите резултати показват, че именно определянето на EDP и CIVDP може да се окажат индикаторите, полезни за идентифициране на потенциално застрашените от полиневропатия диабетно болни.

Диабетът се характеризира с повишен метаболизъм на ЕЦМП, но съществено по-високи нива на EDP и CIVDP се наблюдават в серума на диабетно болните усложнени с полиневропатия. Тези резултати са в съгласие с намереното повишение на пептидите при деца със ЗД тип I. Обяснението на тези промени се крие в установената от Vizbiz и съавт., (1996) увеличена активност на еластаза при диабетно болни. В потвърждение на това е и акцелелираната пролиферация на ГМК в съдовете на диабетно болни, великолепно демонстрирана в експерименталното проучване на Kawano и съавт., (1993). Именно тези клетки, които са източник на редица протеази (вкл. и еластаза), при развитие на съдови и периферно-нервни компликации мигрират от медиата в посока към интимата и пролиферират в отговор на тромбоцитен и/или фибробластен растежен фактор.

Имунологичните резултати при ДПНП подвърждават превалирането на процесите на еластолиза пред тези на еластосинтеза, характеризиращо се с повишение предимно на серумните EDP на фона на нормални стойности на ТЕ.

Захарният диабет, когато не е усложнен със съдови и периферно-нервни увреди, не се съпровожда антитялоситеза срещу ЕЦМП. Показателна в това отношение е промяната в нивата на АЕАТ, АТЕАТ, АСIVАТ при ДПНП. Установява се съществена редукция на АЕАТ от IgG клас при пациентите с генерализирана периферно-нервна увреда. Това намаление се асоциира в серума със значимо по-ниски нива на свободни АЕАТ. Когато пациентите с ДПНП са с анамнеза за ИМИ, техните серумни нива на АЕАТ са съществено повишени.

Клиничните резултати при пациентите с ДПНП корелират позитивно с нивата на хипергликемия, хипертриглицеридемия, степента на злоупотреба с цигари и алкохол, стойностите на систолното артериално налягане - зависимости установени и от други изследователи. Пациентите с ДПНП имат по-високи стойности на холестерол и по-голяма продължителност на артериалната хипертонията. За разлика от други изследователи ние не намираме съществено значение на телесното тегло, ВМІ и АВІ индекса в развитието на периферно-нервни усложнения при диабетно болните.

Възпалителни механизми вероятно се намесват в патогенезата на ДПНП и допринасят за генерализирането на периферно-нервната аксонална увреда.

Единственият сигнификантно променен показател в групата на пациентите с ДПНП е CRP, като неговата промяна не се дължи на васкуларно засягане, тъй като клиничното и доплерсонографско изследване не показва наличие на такава увреда.

Клинико-електрофизиологичните корелации потвърждават възможностите на гликирания HbA1C за прогнозиране на риска от развитие на полиневропатия при пациентите със ЗД тип II.

За първи път са доказани достоверни прогностични възможности на серумните E-AGE, като при пациентите с патологично повишени концентрации на E-AGE се установява достоверно по-висока честота на периферно-нервна аксонална увреда. Електрофизиологичните показатели на сетивните и двигателни нерви на пациенти със ЗД тип II корелират с патологично повишените стойности на E-AGE. Установяват се белези на аксонална увреда с редуция на амплитудите на SNAP от n. suralis и n. medianus, CMAP от n. medianus и n. peroneus, както и вторична демиелинизация със забавена скорост на провеждане по сетивните влакна на n. medianus.

Индикаторите за микроваскуларна увреда - повишение на серумните EDP и макроваскуларна увреда - редуция на ABI < 0,9 имат добри прогностични възможности, защото в 70,6% от случаите патологично повишените серумни концентрации на EDP корелират с електрофизиологично потвърдена полиневропатия. Двата прогностични фактора - EDP и ABI вероятно си взаимодействат, тъй като при болните с повишение на EDP в 83,3% от случаите се установяват васкуларни компликации, характеризиращи се с редуция на ABI. Развитието на периферно-нервна и периферно-съдова увреда при пациенти със ЗД тип II протича едновременно във времето, което би могло да се обяснява с общите им патофизиологични механизми на увреда.

Нашите прогностични резултати показват, че в 84,6% от случаите ДПНП се асоциира със ССЗ (мозъчен инсулт, миокарден инфаркт и гангрена). Обяснението на това също се крие в близките механизми на съдова увреда, която при лакуарните инфаркти протичат в малките съдове на мозъка, а при ДПНП в микроциркулацията на периферните нерви. В подкрепа на това становище е високият процент на коморбидност (85,1%) на периферно-нервна и лакуарна съдова увреда при диабетно болните.

6. ИЗВОДИ

1. На основа на имунологичните методи, разработени за определяне на еластин, тропоеластин, колаген тип IV и синтезирани срещу тях автоантитела в серум и ликвор, при пациентите с исхемична мозъчно-съдова болест се установява болестно зависима, независеща от възрастовия фактор промяна в метаболизма на екстрацелуларните матриксни протеини.
2. Промяната на метаболизма на екстрацелуларните матриксни протеини - еластин, тропоеластин и колаген тип IV при исхемична мозъчно-съдова болест е разпространен в мозъчните съдове, мозъчния паренхим и гръбначно-мозъчната течност, прогресиращ във времето болестен процес:
 - a. Острата хипоксична увреда на мозъчните съдове се съпровожда от селективна еластолиза, водеща до повишение на нивата на еластин деградационните пептиди в серума и ликвора на болните.
 - b. Симптоматичната атеросклеротична плака се характеризира с редуциране на антитропоеластин/антиеластиновото IgG съотношение.
 - c. Асимптомната мозъчно-съдова болест се съпровожда от съществено намаление на антиеластиновите IgG антитела в серума на болните, което се дължи на включването им в циркулиращи имунни комплекси.
3. Захарният диабет тип II, когато е усложнен с полиневропатия, се съпровожда от специфични промени в метаболизма на екстрацелуларните матриксни протеини:
 - a. Повишените серумни нива на гликиран еластин се асоциират с генерализирана аксонална увреда на периферните нерви.
 - b. Серумните нива на антиеластиновите антитела от IgG клас са съществено редуцирани при пациенти с диабетна полиневропатия.
 - c. Макроангиопатията при пациенти с диабетна полиневропатия се последва от съществено повишение на серумните антиеластинови антитела.
4. Серумните и ликворни промени в метаболизма на екстрацелуларните матриксни протеини корелират с клинични, демографски, невроизобразяващи, съдовоизобразяващи и електроневрографски показатели на болните:
 - a. Ликворните нива на еластин деградационните пептиди корелират с броя на исхемичните лезии на пациенти с лакуарни и рецидивиращи исхемични мозъчни инсулти.

- b. Серумните нива на еластин деградационните пептиди корелират с ултразвуковите индикатори за ранна атеросклеротична увреда на мозъчните съдове.
 - c. Серумните концентрации на гликирания еластин корелират с електрофизиологичните параметри, отразяващи аксоналната дегенерация на влакната на периферните нерви при диабетна полиневропатия.
5. Високоспецифичният С-реактивен протеин е сигнификантно повишен в серума на болни със симптоматична стеноза на каротидна артерия и при пациенти със захарен диабет тип II, усложнен с полиневропатия. Достоверните корелации на нивата на С-реактивен протеин, матриксна металопротеиназа-2 и еластин деградационни пептиди потвърждават значението на възпалителните процеси в патогенезата на съдовите нарушения и имплицират евентуалното им участие в механизмите на периферно-нервна увреда при диабетна полиневропатия.
6. Антиеластиновите антитела и циркулиращите имунни комплекси, образувани след свързване на антителата с еластин деградационните пептиди, имат увреждаща роля върху стената на мозъчните съдове, съответстващо на позитивните прогностични корелации на тези показатели със смъртност и честота на хоспитализации от сърдечно-съдови заболявания.

7. ПРИНОСИ

НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. За първи път (в страната и чужбина) се установява наличие на еластин деградационни пептиди в гръбначно-мозъчната течност на болни с исхемичен мозъчен инсулт.
2. За първи път се установява интратекална синтеза на антиеластинови антитела при болни с исхемичен мозъчен инсулт.
3. За първи път в серума и ликвора на болни с исхемичен мозъчен инсулт се установява, че хипоксичната увреда на съдовете предизвиква селективна еластолиза, последвана от антиеластинова антитялосинтеза, причиняваща вторична увреда на мозъчните съдове.
4. За първи път се установява сигнификантна редукция на серумните нива на антиеластиновите антитела от IgG клас при пациенти с хронични заболявания на централна (асимптомна исхемична мозъчно-съдова болест) и периферна нервна система (диабетна полиневропатия).
5. За първи път при пациенти с исхемична мозъчно-съдова болест и диабетна полиневропатия комплексно се анализират корелации на показатели, отразяващи метаболизма на екстрацелуларния матрикс с електрофизиологични, ултразвукови и компютър-томографски параметри.
6. За първи път се установяват позитивна зависимост между нивата на еластин деградационните пептиди, С-реактивния протеин и серумната тип 2 металопроотеиназа, както и достоверни прогностични корелации на еластин деградационни пептидни серумни нива с демографски показатели.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИ ПРИНОСИ

1. Разработени са имунологични методи за количествено определяне в гръбначно-мозъчна течност на екстрацелуларни матриксни протеини - еластин, тропоеластин и колаген тип IV, както и на синтезирани срещу тях автоантитела.
2. Определянето на еластин деградационни пептиди в ликвора може да се използва в клиничната практика за разграничаване на съдови лезии от такива с подобна на тях невроизобразителна характеристика (напр. демиелинизиращи лезии), както и за стадиране на инвазията на мозъчни неоплазми.

3. Установяването на намалено “синтез/деградационно” антитропоеластин/ антиеластиново IgG съотношение в резултат от повишение на антиеластиновите антитела в серума на болни с каротидна стеноза, може да се използва като скриниращ биомаркер за откриване на рискови от дестабилизация на плаката пациенти.
4. Началните проучвания върху промените на нивата на гликиран еластин и С-реактивен протеин при болни със захарен диабет тип II показват, че тези серумни показатели имат добри прогностични възможности за оценка на риска от увреда на периферните нерви. Необходими са многоцентрови, проспективни, клинично-имунологични проучвания за валидизиране на тези биомаркери в клиничната практика.

8. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СЪОБЩЕНИЯ И ЦИТИРАНИЯ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА (ОБЩ IF = 74,068; ИНДИВИДУАЛЕН IF = 14,912)

ПУБЛИКАЦИИ (N=16; ОБЩ IF=11,048; ИНДИВИДУАЛЕН IF=2,525)

А. В БЪЛГАРСКИ СПИСАНИЯ

1. Н. Тоцев, П. Цветанов, Т. Андреев. Перфузионна компютърна томография на мозъка при остър инсулт. *Рентгенология и радиология* 2013;LR:279-282.
2. Цветанов, П., Николов, Г., Янкова, П., Христова, П. Увеличени нива на еластинови пептиди в ликвора на пациенти с лакунарни инфаркти, установени с ELISA метод. *Мозъчносъдови заболявания* 2006, 2.
3. П., Цветанов. Лакунарен инфаркт с прогресиращ двигателен дефицит. *Мозъчносъдови заболявания* 2006, 2.
4. П., Цветанов, Й., Узунангелов, М. Григоров. Асимптомният лакунарен инсулт – рисков фактор за мозъчен кръвоизлив при тромболитична и хепаринова терапия на острия миокарден инфаркт с елевация на ST сегмента? *Обща медицина* 2006;3:15-18.
5. Й., Узунангелов, Пл., Цветанов, А. Велкова. Хеморагичен инсулт при болни с остър миокарден инфаркт със ST елевация и проведено тромболитично лечение. *Медицински преглед* 2006;3:37-41.
6. Цветанов, П., Р.Т., Русев. Главоболие в началния период на исхемичния мозъчен инсулт. *Годишен сборник ИМАБ* 1998;4:47-48.
7. Русев, Р., И., Вълков, П., Цветанов, В., Платиканов, В., Цветков, С., Маринова. Полиневропатия на тежко болния (critical illness polyneuropathy) – описание на случай и преглед на литературата. *Анестезиология и интензивно лечение* 1998;25:35-41.

Б. В ЧУЖДИ СПИСАНИЯ

8. Tzvetanov, P., Hegde, V., Atanasova, M., Aman, P.S., Rouseff, R.T. Abnormalities of serum anti-elastin antibodies in patients with symptomatic carotid stenosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2014;116:9-12. **IF=1,581**
9. Jasem, Y., Rouseff R.T., Khuraibet, A., Tzvetanov, P. Single fiber electromyography of facial and limb muscles in diabetic patients with or without neuropathy. *J Clin Neurophysiology* 2014, in press. **IF=1,447**
10. Tzvetanov, P., Nicoloff, G., Rouseff, R., Christova, P. Increased levels of elastin-derived peptides in cerebrospinal fluid of patients with lacunar stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2008;110(3):239-44. **IF=1,581**
11. Nicoloff, G., Tzvetanov, P., Christova, P., Baydanoff, S. Detection of elastin derived peptides in cerebrospinal fluid of patients with first ever ischaemic stroke. *Neuropeptides* 2008;42(3):277-82. **IF=1,553**

12. Atanassova, P.A., Angelova, E., **Tzvetanov, P.**, Semerdjieva, M., Dimitrov, B.D. Modelling of increased homocysteine in ischaemic stroke: post-hoc cross-sectional matched case-control analysis. *Arq Neuropsychiatr* 2007;65(1):24-31. **IF=0,722**
13. Nicoloff, G., Weiss, A.S., Iotova, V., Tzaneva, V., Petrova, C., Domuschieva, N., Nikolov, A., **Tzvetanov, P.**, Christova, P. Abnormal levels of serum antielastin antibodies in children with diabetes mellitus type 1. *J Investig Med* 2006;54(8):461-7. **IF=1,964**
14. **P., Tzvetanov, I.**, Milanov, R.T., Rousseff, P., Hristova. Can SSEP results predict functional recovery of stroke patients in "therapeutic window"? *Electromyogr Clin Neurophysiol* 2004;44:43-49.
15. **P., Tzvetanov, P.**, R.T., Rousseff, P. Atanassova. Prognostic value of median and tibial somatosensory evoked potentials in acute stroke. *Neuroscience Letters*, 380, 2005, 99-104. **IF=2,200.**
16. S., Baydanoff, **P., Georgiev, G.**, Nicoloff, Ch., Alexiev. An optimized method for detection of elastin-derived peptides in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Plzen Lek Sborn* 1989;58:5-9.

РЕЗЮМЕТА

А. В БЪЛГАРИЯ

1. Николов, Г., Цоков, В., **Георгиев, П.** Определяне на антиеластинови антитела в бронхо-алвеоларни лаважни течности на пациенти с някои заболявания на дихателната система. – В: XI-та Научна сесия на ТНТМ, Плевен, 17 май 1988 г.
2. **Цветанов, П.**, Атанасова, М., Русева, А., Садързанска-Терзиева, Б., Цанева, В., Клисурски, М., Йотова, С., Петранов, Ц., Христова, П., Димитрова, А. Биомаркери за съдова атеросклеротична увреда: промени в метаболизма на екстрацелуларните матриксни белтъци, металопроотеинази и антитела срещу матриксни белтъци при исхемичен мозъчен инсулт. Национален конгрес по неврология, Боровец, 18-20 май, 2011.

Б. В ЧУЖБИНА

3. Atanasova, M., **Tsvetanov P.**, Dimitrova, A., Klissurski, M., Tsaneva, V., Christova, P. Chronic ischemic stroke is associated with significantly increased serum levels of elastin-derived peptides and MMP-9. The Sixth European Elastin Meeting, Maratea, Italy, 28 June- 2 July, 2010.A.,
4. Dimitrova, A., Atanasova, M., **Tsvetanov, P.**, Russeva, A., Christova, P. Anti-elastin and anti-collagen type IV antibodies, MMP-9 and MMP-2 in chronic ischemic stroke. The Sixth European Elastin Meeting, Maratea, Italy, 28 June- 2 July, 2010.

ЦИТИРАНИЯ (N=29; ОБЩ IF=63,02; ИНДИВИДУАЛЕН IF=12,387)

1988 г.

Николов, Г., В. Цоков и П. Георгиев. Определяне на антиеластинови антитела в бронхо-алвеоларни лаважни течности на пациенти с някои заболявания на дихателната система. – В: XI-та Научна сесия на ТНТМ, Плевен, 17 май 1988 г.

1. Николов, Г. Проучване на някои имунологични аспекти на еластиновата обмяна. Плевен, ВМИ, 1988, 30 с.
2. Baydanoff, S., G. Nikoloff, Ch. Alexiev, P. Georgiev. An optimized method for detection of elastin-derived peptides in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. Plzen Medical Report, 1988.
3. Николов, Г. Проучване на някои имунологични аспекти на еластиновата обмяна. Плевен, ВМИ, 1988, 30 с.

2004 г.

P., Tzvetanov, I., Milanov, R.T., Rousseff, P., Hristova. Can SSEP results predict functional recovery of stroke patients in “therapeutic window”? *Electromyogr Clin Neurophysiol* 2004;44:43-49.

4. Cramer, S.C. et al. Repairing the human brain after stroke: Mechanisms of spontaneous recovery. *Annals of neurology*, 2008. **IF=11,93**
5. Coupar F., Pollock, P., Rowe, P. Predictors of upper limb recovery after stroke: a systemic review and meta-analysis. *Clinical Rehabilitation*, 2012. **IF=2,191**
6. Yozbatiran, N., S.C. Cramer. Imaging motor recovery after stroke. *NeuroRx*, 2006.
7. Van de Wassenberg, W.J.G et al. Multichannel recording of tibial-nerve somatosensory evoked potentials. *Neurophysiologie*, 2008. **IF=2,166**
8. McHughen, S., J. See, S.C., Cramer. Functional imaging and stroke recovery. *Stroke Recovery and...*, 2008-books.google.com
9. Coupar, F.M. Exploring upper limb interventions after stroke. 2012-Theses.gla.ac.uk.
10. Vanden, Bulcke A.S., et al. Somatosensory and motor evoked potentials: added value for functional prognosis in stroke.
11. Самосюк, И.З. et al. *Международный неврологический журнал* 8(54) 2012.

2005 г.

P., Tzvetanov, R.T., Rousseff, P. Atanassova. Prognostic value of median and tibial somatosensory evoked potentials in acute stroke. *Neuroscience Letters* 2005;38:99-104.

12. F., Coupar, A., Pollock, P., Rowe, C., Weir. Predictors of upper limb recovery after stroke: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Rehabilitation*, 2012. **IF=2,191**

13. S.Y. Chen, C.J., Winstein. A systematic review of voluntary arm recovery in hemiparetic stroke: critical predictors for meaningful outcomes using the international classification of functioning. *Journal of Neurologic Physical Therapy*, 2009.
14. S.Y., Lee, J.Y., Lim, E.K., Kang, M.K., Han. Prediction of good functional recovery after stroke based on combined motor and somatosensory evoked potential findings. *Journal of Rehabilitation*, 2010.
15. M.A.W., Al-Rawi, F.B., Hamdan. Somatosensory evoked potentials as a predictor for functional recovery of the upper limb in patients with stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease*, 2009.
16. Y., Tomita, C., Fukuda, Y., Kato, Y., Maegaki, S., Shiota. Topographic MN-SSEPs (N18, N20 and N30) might characterize underlying CNS involvements in representative types of cerebral palsy. *Brain and Development*, 2006.
IF=2,119

2006 г.

Nicoloff, G., Weiss, A.S., Iotova, V., Tzaneva, V., Petrova, C., Domuschieva, N., Nikolov, A., Tzvetanov, P., Christova, P. Abnormal levels of serum antielastin antibodies in children with diabetes mellitus type 1. J Investig Med 2006;54(8):461-7.

17. Feghali-Bostwick, C.A., et al. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of journal of respiratory and critical care medicine*, 2008. **IF=11,08**
18. Greene, C.M., et al. Anti-proline-glycine-proline or antielastin autoantibodies are not evident in chronic inflammatory lung disease *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2010. **IF=11,08**
19. Louraki, M., et al. Peripheral neuropathy in children with type 1 diabetes. *Diabetes & Metabolism*, 2012. **IF=2,411**
20. Low, T.B.. *Autoimmunity in Chronic Inflammatory Lung Disease. MD Theses*, 2010.
21. Mekenyan, E., Stancheva, N. Changes in the immunologic markers of elastin degradation in subjects with metabolic syndrome. *Journal of IMAB*, 2012.

2007 г.

Atanassova, P.A., Angelova, E., Tzvetanov, P., Semerdjieva, M., Dimitrov, B.D. Arq Neuropsiquiatr 2007;65(1):24-31.

22. Angelova, E.A., Atanassova, P.A., Chalakova, N.T.. Associations between serum selenium and total plasma homocysteine during the acute phase of ischaemic stroke. *European Neurology*, 2008. **IF=1,811**
23. Atanassova, P.A., Chalakova, N.T., Dimitrov, B.D. Diastolic blood pressure cut-off predicts major cerebrovascular events after minor ischaemic stroke: a post-hoc modelling study. *Central European Journal of Medicine*, 2008.
IF=0,312

24. Atanassova, P.A. et al. Impaired Nocturnal Melatonin in Acute Phase of Ischaemic Stroke: Cross Sectional Matched Case–Control Analysis. *Journal of Neuroendocrinology*, 2009. **IF=3,318**
25. Serdarević, N., Begić, L., Mulaomerović-Softić, A.. The concentration of homocysteine at patients after ischemic brain stroke and vascular dementia. *Journal of Health Sciences*, 2011. **IF=0,805**

2008 z.

Tzvetanov, P., Nicoloff, G., Rousseff, R., Christova, P. *Increased levels of elastin-derived peptides in cerebrospinal fluid of patients with lacunar stroke. Clin Neurol Neurosurg* 2008;110(3):239-44.

26. Coquerel, B., Poyer, F., Torossian, F., Dulong, V., Bellon, V. Elastin derived peptides: Matrikines critical for glioblastoma cell aggressiveness in a 3D system. *Glia*, 2009. **IF=4,82**
27. Wei, P.C., Tsai, C.H., Chiu, P.S., Lai, S.C. International journal for parasitology, Matrix metalloproteinase-12 leads to elastin degradation in BALB/c mice with eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *International journal for parasitology*, 2011. **IF=3,393**
28. Ichikawa, H., Mukai, M., Ohno, H., Shimizu, Y., Itaya, K. Deep white matter hyperintensities, decreased serum low-density lipoprotein, and dilative large arteriopathy. *Journal of Stroke and Cerebrovascular diseases*, 2012.

2008 z.

Nicoloff, G., Tzvetanov, P., Christova, P., Baydanoff, S. *Detection of elastin derived peptides in cerebrospinal fluid of patients with first ever ischaemic stroke. Neuropeptides* 2008;42(3):277-82.

29. Wei, P.C., Tsai, C.H., Chiu, P.S., Lai, S.C. Matrix metalloproteinase-12 leads to elastin degradation in BALB/c mice with eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *International journal for parasitology*, 2011. **IF=3,393**

SUMMARY

Clinical-immunological study on the extracellular matrix protein turnover changes and biomarkers for vascular damage in patients with ischemic brain disease and diabetic neuropathy

Extracellular matrix plays an important role in the development, growth and biomechanical function of every organ system. Elastin is a major component of extracellular matrix deposited in arterial wall contributing up to 50% of dry weight. Basement membranes provide structural support and functional cellular input of every tissue of the human body. Type IV collagen is the most abundant protein in basement membrane involved in variety of autoimmune disorders.

Advanced atherosclerotic lesions develop a fibrous cap composed of a dense extracellular matrix containing collagen and elastin fibers. In this stage of atherosclerosis smooth muscle cells migrate from the tunica media through the internal elastic lamina into the intima where they release elastases and other proteinases. These enzymes degrade elastin and collagen fibers of vascular wall. The products of this degradation called elastin and collagen type IV derived peptides appear in the blood serum. Their serum concentrations correlate with intensity of atherosclerosis and are strong stimulus of antielastin and collagen type IV antibody synthesis.

On the other hand in diabetes the nonenzymatic protein glycation induced by chronic hyperglycemia is one of determinant mechanisms leading to diabetic microangiopathy. It is found that antibody synthesis against the extracellular matrix proteins play important role in microvascular peripheral nerve and retinal complications of type I diabetic patients.

The current study was performed to determine whether the serum and cerebrospinal fluid levels of elastin and collagen type IV peptides, and antielastin, antitropoelastin, anticollagen IV antibodies were changed in patients with acute and chronic stroke, asymptomatic and symptomatic carotid stenosis, and diabetic neuropathy in order to determine prognostic biomarkers for vascular complications in ischemic brain disease and diabetic neuropathy.

Elastin derived and collagen type IV peptides, anti-alpha and anti-tropoelastin and collagen type IV antibodies were measured by ELISA in blood sera and cerebrospinal fluid of 69 patients with CT confirmed acute stroke, and in serum of 68 patients with CT confirmed chronic stroke, 51 patients with Duplex ultrasound verified symptomatic carotid stenosis, 20 diabetic patients without neuropathy and 37 others with electrophysiologically confirmed diabetic neuropathy. Three aged and sex matched control groups were used.

In conclusion, this study shows difference in extracellular matrix protein turnover of patients with symptomatic carotid stenosis associated with significant increase in elastin derived peptide and antielastin antibody serum levels. The ratio measurement of elastin synthesis (antitropoelastin antibodies) to elastin degradation (alpha-antielastin antibodies) can be useful immunological biomarker for carotid plaque destabilization. The diabetic neuropathy and chronic ischemic brain disease are accompanied by decrease in serum antielastin antibody levels due to circulating immune complex formation. The acute phase of stroke is characterized by selective elastolysis followed by penetration of elastin derived peptides in cerebrospinal fluid and intrathecal antielastin antibody synthesis. The highest levels of cerebrospinal elastin derived peptides were found in patients with lacunar infarction and recurrent strokes.