

Медицински Университет – Плевен, България

Факултет по Фармация

Катедра „Химия и биохимия“

ДИСЕРТАЦИЯ

за придобиване на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

докторска програма по Биохимия

д-р Милка Пенчева Михайлова

ТЕМА:

„БИОХИМИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА

ФРУКТОЗАМИН –

МАРКЕР НА НЕЕНЗИМНО ГЛИКИРАНИ БЕЛТЪЦИ

ПРИ ХИПЕРГЛИКЕМИЧНИ СЪСТОЯНИЯ“

Научен ръководител:

Доц. Регина Комса-Пенкова, дбн; Ръководител Сектор Биохимия

Катедра „Химия и биохимия“ ФФ, МУ-Плевен

Плевен, 2018 год.

Съдържание:

Увод	4 - 5
Цел и задачи	6
Методична част	7 - 12
Резултати и дискусии	
По задача № 1	13 - 16
По задача № 2	17 - 20
По задача № 3	21 - 26
По задача № 4	26 - 31
По задача № 5	32 - 55
По задача № 6	56 - 67
Изводи	68
Приноси и оригинални проучвания	69
Публикации, свързани с темата	70

Съкращения:

АСК – Ацетилсалицилова киселина
А1АТ – α -1-антитрипсин
AG – Аминогуанидин
1,5 AG – 1,5 анхидроглуцитол
AGEs – късни продукти на неензимно гликиране
ADA – Американска диабетна асоциация
CML - карбоксимитиллизин
СЕРПИНИ – серинови протеазни инхибитори
DMF – дезоксиморфолинофруктоза
ESHM – Европейска асоциация по клинична медицина
GSA (ГСА) – гликиран серумен албумин
GABA – гама-амино-маслена киселина
HMF – хидроксиметилфурфурол
НЕГ – неензимно гликиране HPLC – високоефективна течна хроматография
HbA_{1c} – гликиран хемоглобин
ISPAD – Международна асоциация за захарен диабет в детско-юношеска възраст
IL - интерлевкин
LL - лизинолактат
NBT – нитроблаутетразолиумхлорид
NMDA – N-метил-аспартат
nACh – никотин-ацетилхолин
PAL – пиридоксал
PALP – пиридоксалфосфат
ТБК – тиобарбитурова киселина
TNF – туморнекротичен фактор
ФА – фруктозамин
FL - фруктозелизин

УВОД

Хипергликемичните състояния съпровождат редица социално значими заболявания като захарен диабет, метаболитен дисбаланс в периоперативния период, небалансиран нутритивен съпорт, стрес-индуцирани и медикаментозно обусловени хипергликемии, както и други нарушения на хомеостазата.

Проучванията в областта на патобиохимичните механизми при различни по етиология хипергликемични състояния дават възможност за въвеждане на нови клинично-лабораторни показатели на метаболитния контрол, както и аргументация на терапевтичните стратегии за превенция на късни дегенеративни усложнения при персистиращи хипергликемии.

Неензимното гликиране на белтъците (НЕГ) е един от водещите биохимични механизми в патогенезата на късните усложнения на захарния диабет – диабетна ретинопатия, нефропатия, полиневропатия, сърдечносъдови усложнения и др. Утвърден клинично-лабораторен маркер на НЕГ е гликираният хемоглобин (HbA_{1c}) - индекс на дълготрайна хипергликемия за ретроспективен период от 2-3 месеца.

През последните години се анализира значението на друг биохимичен показател за НЕГ - фруктозамин (ФА). Фруктозаминът отразява степента на неензимно гликиране на серумните белтъци и е маркер на ретроспективната хипергликемия за период от 2-3 седмици - „intermediate-term“ гликемичен индекс. Въпреки незаменимата му информационна стойност при хемоглобинопатии и флукутиращи гликемии, той все още не е широко използван в медицината, поради методични различия и недооценяване ролята му в клиничната биохимия.

Многофакторната патогенеза на диабетните ангиопатии включва дегенеративни промени на съдовата базална мембрана, обусловени в най-голяма степен от късни продукти на неензимно гликирани фибрилари белтъци - (AGEs). За нарушения васкуларен пермеабилитет при диабетните микроангиопатии се обсъжда и ролята на ензими от групата на сериновите протеази и техните инхибитори (СЕРПИНИ). Патобиохимичното значение на неензимното гликиране на белтъците, както и дисбаланса между протеазите и техните функционални инхибитори при микроваскуларните усложнения на захарния диабет, представлява интерес както за биохимията, така и за диабетологията.

Превенцията на късните усложнения на захарния диабет включва освен добър метаболитен контрол, така също и нови терапевтични подходи. Някои емпирично прилагани лекарствени средства за профилактика на диабетните ангиопатии, намират

съвременен прочит като инхибитори на неензимното гликиране на белтъците. Медикаментозното конкуриране чрез структурни аналози на алдохексозите в реакцията на Майлард, както и възможността за инхибиране на кондензационните реакции между кетоамините, понижавайки концентрацията на AGEs, са обект на фармако-биохимични анализи с цел обосноваване и актуализиране на терапевтичните схеми при хипергликемични състояния.

Друг аспект на гликемичния контрол е осъвременяване на биохимичния анализ при хоспитализирани пациенти, рискови за медикаментозно индуцирани и стрес-медиирани хипергликемии. Метаболитният дисбаланс при пациенти с хирургични интервенции налага прецизиране на терапевтичното поведение, базирайки се на актуални биохимични методи и клинично-лабораторни показатели. Изследването на маркера за неензимно гликирани серумни белтъци - фруктозамин (ФА) при всички пациенти, независимо от наличието или не на данни за захарен диабет, би допринесло за актуализиране на клинично-лабораторния консенсус и прецизиране на терапевтичното поведение, нутритивния съпорт и анестезиологичната медикация.

Горепосочените направления в областта на неензимното гликиране на белтъците при различни хипергликемични състояния са обект на проучване в настоящия дисертационен труд.

ЦЕЛ

1. **Анализиране *диагностичната значимост* и възможността за *медикаментозно* повлияване на неензимното гликиране на белтъците при пациенти със захарен диабет и актуализиране на метаболитния контрол при транзиторни хипергликемии в *периоперативния период* чрез изследване на ФРУКТОЗАМИН (ФА)**

ЗАДАЧИ

1. Изследване влиянието на някои аналитични параметри върху колориметричния метод с NBT за определяне серумни концентрации на фруктозамин
2. Определяне на собствени референтните граници за фруктозамин в детска възраст чрез адаптирания колориметричен метод с NBT
3. Изследване концентрациите на фруктозамин при деца със захарен диабет тип 1 и анализиране клиничната значимост на показателя
4. Изследване серумните концентрации на фруктозамин и алфа-1-антитрипсин при пациенти с диабетна ретинопатия
5. Изследване инхибиторния ефект на Ацетилсалицилова киселина, Витамин В₆ и Коензим Q₁₀ върху НЕГ *in vitro*, опитни животни, здрави доброволци и пациенти със захарен диабет
6. Изследване на фруктозамин в периоперативния период при пациенти без данни за нарушен глюкозен толеранс и анализиране влиянието на някои анестетици върху неензимното гликиране на серумния албумин

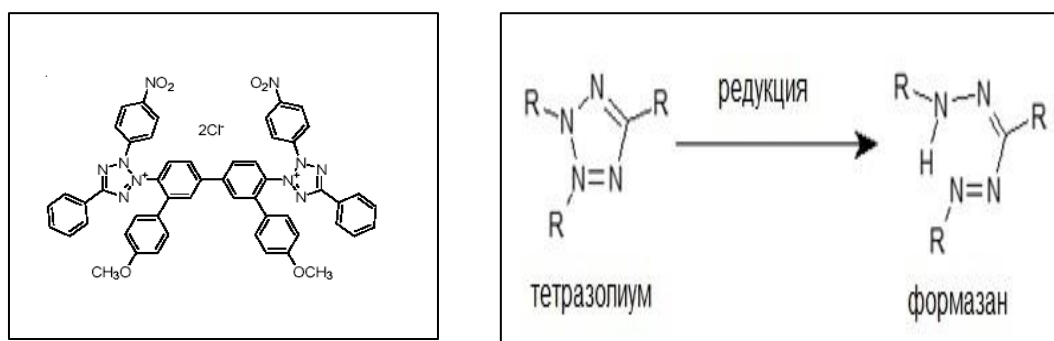
Методична част:

I. Дизайн на проучванията по дисертационния труд:

В дисертационния труд са включени изследвания за степента на неензимно гликиране на белтъците *in vitro*, при опитни животни със захарен диабет и клинични проучвания при пациенти със захарен диабет тип 1 и тип 2, както и при здрави доброволци и пациенти с добър гликемичен контрол.

II. Биохимични методи за определяне на неензимно гликирани белтъци:

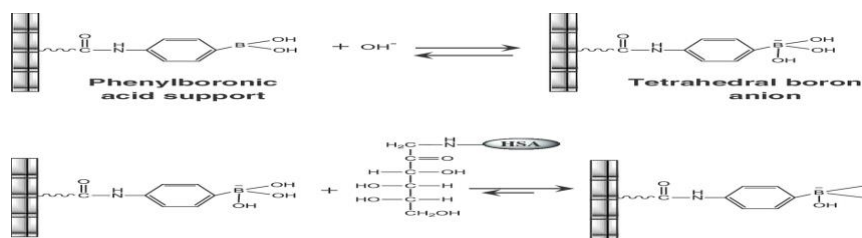
1. Колориметричен метод с нитроблаутетразолиумхлорид (NBT) за определяне серумна концентрация на фруктозамин (ФА). Методът се основава на свойствата на фруктозамините да действат като редуцтори в алкална среда. Образуваните при НЕГ на белтъците кетоамини, енолизират в алкална среда до ендиол, който редуцира багрилото NBT до синьовиолетово оцветен продукт формазан, чиято абсорбция е правопрпорционална на концентрацията на фруктозамина (Фиг. № 1).



Фиг. № 1. NBT метод за доказване на ФА в кръвен серум (R. N. Johnson)

Начин на работа: 0.1 ml серум, 1 ml работен реактив (0.25 mmol/L NBT). Спектрофотометрична детекция при $\lambda = 530 \text{ nm}$ в 0.5 cm^3 кювета срещу $d \text{ H}_2\text{O}$ на 10^{-4} и $15^{-\text{та}}$ мин. от реакцията при непрекъснато темпериране на воден термостат $T 37^0 \text{ C}$. Методът е адаптиран, като изборът на оптимални параметри са $\text{pH} = 10.32$ и $T = 37^0$. Реактиви: 0.1 M Карбонатен буфер /Sigma/; 0.25 mmol/L динитрофенил дифенил дитетразолиум хлорид (NBT) /Sigma/; 0.2044 g NBT в 1 L карбонатен буфер; Стандарт 5-хидроксиметил-фурфурол (HMF) /Fluka/. CV = 3.7 %. Референтни граници на ФА: за възрастни (стандарт HMF): 0.960 – 1.560 $\mu\text{mol/L/g}$; детска възраст (стандарт DMF): 1.50 – 2.70 mmol/L.

2. Афинитетно-хроматографски метод за определяне на гликиран серумен албумин (ГСА%) - Pierce-methode. Основава се на селективното свързване на гликираната фракция на албумина към боратните групи на стационарната фаза т-аминофенилборат-агароза (Фиг. № 2).



Фиг. № 2. Афинитетно колонна хроматография с аминокфенилборат-агароза /Pierce-Methode/

Техника на метода: За отстраняване интерфериращото влияние на нестабилната фракция на гликирания албумин, пробата се диализира 12 ч. с/у d H₂O при 4° C в хладилна камера. Афинитетно-хроматографската колонка се еквилибрира с 5 ml WP, след което се нанасят 250 ml проба. През колонката се пропускат 4.5 ml WP за елуиране на негликираната фракция на албумина (фракция А), която се събира в химически чиста епруветка. Пропускат се 5 ml EP и се елуира гликираната фракция на албумина (фракция В). Отчитане: 1 ml фракция А, респ. фракция В + 3 ml бромкрезолгрюн. Абсорбцията се измерва спектрофотометрично, $\lambda = 630$ nm. Елуирането на негликираната фракция на албумина се извършва с алкален буфер рН = 8.5 /Wash Buffer – WP8, съдържащ 250 mmol/L амониев ацетат, 50 mmol/L магнезиев хлорид и 3 mmol/L натриев азид. Гликираната фракция на албумина се елуира с EP рН = 4.6 /18 mmol/L натриев цитрат, 3 mmol/L NaN₃/. 0.1 M HCl за регенериране на колонката. Гликираният албумин се изразява като процентно съдържание от общия албумин. ГСА % = $(1.5 \times A_B) : (20.2 \times A_A) + (1.5 \times A_B)$. Калибратор - Humanserumalbumin с 10 % степен на гликиране. CV = 1.8 %. Референтни граници 0.8 % - 3.2 % ГСА. Афинитетнохроматографските изследвания са проведени в Катедра „Клинична фармакология“, Франкфурт на Майн, Германия.

3. Колориметричен метод с 2-тиобарбитурова киселина (2-ТБК) за определяне на гликиран хемоглобин HbA_{1c}. Методът се основава на детекцията на 5-хидрокси-метилфурфурол (5-НМФ), отделен при киселинна хидролиза от кетоамините. НМФ взаимодейства с 2-тиобарбитурова киселина до жълто оцветен реакционен продукт, чиято абсорбция се измерва фотометрично при $\lambda=443$ nm. Резултатите се представят като количество НМФ $\mu\text{mol/L/g}$ белтък. CV 3.4 %. Липсва интерференция от страна на лабилните междинни продукти на гликирани белтъци и феталния хемоглобин, тъй като те не реагират с 2-тиобарбитурова киселина. Недостатъци: ст. 5-НМФ е термонеустойчив; нтерфериране от свободна глюкоза и гликопротеини. *Реактиви:* 100 % CHCl₃ /Sigma/; 0.9 % NaCl /Sigma/; 40 % CCl₃-COOH /Sigma/; 1M COOH-COOH /Sigma/; 0.25 M Na₂SO₄ /Sigma/; 2-ТБК 0.05 M

/Fluka/. Работен реактив: 0.05 М 2-ТБК се разтваря до 100 ml с 0.25 М Na_2SO_4 . Приготвяне на хемолизат: 3 ml венозна ЕДТА (1 mg/ml) кръв се центрофугира при 3000 об/мин и плазмата се отстранява. Еритроцитите се промиват с физ. разтвор. Промитите еритроцити се лизират. Остатъците от еритроцитните строми се отстраняват чрез центрофугиране при 4500 об/мин за 20 мин. В хемолизата се определя HbA_{1c} , като към 2 ml хемолизат се прибавя 1 ml оксалова киселина. Инкубиране на 100°C 1 ч. След охлаждане, се прибавя 0.5 ml ТХО. Центрофугиране 3000 об/мин за 10 мин. 2 ml от супернатант + 0.5 ml 0,05 М 2-ТБК. Инкубиране при 37°C , 40 мин. Престой на стайна Т. Абсорбцията се отчита с/у празна проба на реактивите на Спекол при $\lambda = 443\text{ nm}$. Референтни граници за HbA_{1c} : 5.4 % - 8.8 %.

4. Йонообменна афинитетна хроматография за определяне на гликирани хемоглобинови фракции (HbA_1 и HbA_{1c}). Йонообменно-хроматографският метод Bio Rad се основава на разделянето на хемоглобиновите фракции с катионит Bio-Rex-70. Използвани са колонки 30 cm x 2,5 cm Zerolit 236. Гликираните фракции на хемоглобина HbA_{1b+c} са бързоподвижни и се елуират с 0,06 М фосфатно-цианиден буфер рН= 6.7. Бавноподвижните фракции HbA_0 и HbA_2 се задържат от смолата и се елуират с 0.25 М фосфатен буфер рН=6.4, $T=21^\circ\text{C}$. А на елуираните хемоглобинови фракции се измерва при $\lambda=416\text{ nm}$. За отстраняване интерфериращото влияние на алдимиана, диализиране за 12 ч. с/у d H_2O в хладилна камера. На повърхността на хроматографското ложе се нанасят 20 μl хемолизат и 200 μl фосфатно-цианиден буфер с рН = 6.7 за интегриране на пробата в колонката. Добавят се 5 ml елуентен буфер рН = 6.7 при скорост 0.05 ml/min. Целият обем на елуираната бързоподвижна фракция се събира и А се измерва на при $\lambda=416\text{ nm}$. Гликираният хемоглобин HbA_{1c} се изчислява като % от общия Hb . Линеиност на метода до 18 % HbA_{1c} . CV = 4.8 %. Референтни граници 6.0 – 8.8 % HbA_{1c} . Методът е реализиран в Катедра по Клинична лаборатория, Университетска клиника, Франкфурт на Майн, Германия.

III. Други методи, използвани в дисертацията:

1. Биуретов метод за определяне на общ белтък (ОБ) в кръвен серум. Методът се основава на взаимодействието на Cu^{2+} в алкална среда с полипептиди, при което се образува виолетово оцветен хелатен комплекс. Биуретов реактив (2.5 g CuSO_4 , 6 g калиево-натриев тартарат и 300 ml 10 % NaOH се разтварят 1 L d H_2O). 0.2 ml серум се прибавят към 1 ml Биуретов реактив. 30 минути на тъмно. Абсорбцията се измерва на Спекол, $\lambda = 570\text{ nm}$ в 1- cm^3 кювета срещу d H_2O . С ст. = 40 g/L /Sigma/; CV = 4.8 %. Референтни граници 58 - 80 g/L.

2. *Хемоглобин-цианиден метод за определяне на хемоглобин (Hb).*

Хемоглобинът се окислява от калиев феррицианид до хемиглобин, който образува с цианиди хемиглобинцианид, червено оцветен реакционен продукт, чиято А се измерва на Спекол при $\lambda=540$ nm. Трансформиращ реактив: 0.2 g калиев феррицианид, 50 mg калиев цианид, 0.140 g примерен калиев фосфат в d H₂O до 1 L. Добавя се тритон X. 20 μ l ЕДТА-кръв се прибавя към 5 ml трансформиращ реактив. След 5 мин на стайна Т, се отчита А срещу празна проба на реактивите. CV = 5.4 %. Референтни граници за Hb: 120 – 140 g/L ♀ и 140 - 180 g/L ♂.

3. *Глюкозооксидазен метод за определяне на серумна глюкоза /Merck/*

Методът се основава на окислението на глюкозата от ензима глюкозооксидаза до глюконова киселина и водороден пероксид. Образуваният H₂O₂ окислява фенол 4-аминофеназол, в присъствие на пероксидаза, до червено оцветен реакционен продукт, чието количество е правопрпорционално на конц. на глюкозата. Реактиви: 0.8 U/L пероксидаза, 10 U/L глюкозооксидаза; 11 mmol/L фенол; 30 % ТХО; 0.77 mmol/L 4-аминофеназон; фосфатен буфер рН=7.0. Ст. D-глю 5.55 mmol/L. 0.1 ml серум + 1 ml депротеинизиращ разтвор. Центрофугиране 3600 об/мин, 5 мин. 0.2 ml супернатант + 2 ml глюкозооксидазен реактив. След 30 минути на тъмно, А се измерват с/у празна проба на реактивите при $\lambda=546$ nm. *Референтни граници:* серумна глюкоза 2.8 - 5.8 mmol/L, плазмена глюкоза 3.1 – 6.1 mmol/L.

4. *Колориметричен метод за определяне на ТГ в кръвен серум.*

Методът се основава на колориметричното определяне на отделения при алкална хидролиза на ТГ глицерол, който се окислява с КЮ₄ до формалдехид, който реагира с метилацетон в присъствие на амониеви йони. Получава се жълто оцветен 3,5-диацетил-1,4-дихидролутидин, чиято А се измерва фотометрично $\lambda=430$ nm. 75 g/L ацетилацетон в 20 % изопропилов алкохол; 0.5 g КЮ₄ в ацетатен буфер с рН= 6.0; Стандарт 3.39 mmol/L триолеин. 0.1 ml серум, 4 ml изопропилов алкохол и 0.4 g адсорбент. Центрофугиране 3600 об/мин. 2 ml супернатант + 0.5 ml КОН. Инкубиране при 60° С на воден термостат 30 мин. А се измерва с/у контрола на реактивите, $\lambda= 430$ nm. *Реф. граници:* възрастни: 0.85 - 1.97 g/L; деца: 074 – 1.72 g/L

5. *Методи за определяне на общ холестерол и холестеролови фракции (HDL-холестерол и LDL- холестерол) в кръвен серум.*

А)Ензимокаталитичен метод. Под действие на холестеролестераза, ХЕ се разграждат до холестерол и МК. Холестеролът се окислява до холестенон и H₂O₂ под действие на пероксидаза. H₂O₂ окислява 4-аминоантипирин и р-хидроксibenzenсулфинат до червено оцветено

хиноново багрило, чиято интензивност е пропорционална на конц. на холестерола. А се измерват на спектрофотометър с/у контрола, $\lambda=520$ nm, Сст.= 5.18 mmol/L.

Б). Колориметричен метод с бензенсулфонова киселина: 0,5 мл серум се прибавят към 0.2 ml фосфоволфрамов реактив. След 15 мин. на стайна Т, пробите се центрофугират 5 мин. на 3000 об/мин. 50 μ l супернатант + 1500 ml реактив 2.5 диметилбененсулфонова киселина. След 5 мин. на стайна Т, се прибавя 0.3 ml к.Н₂SO₄. След 15 мин. се измерва А на Спекорд с/у празна проба на реактивите при $\lambda = 590$ nm. *LDL холестерол = Охол - (ТГ : 2.2) - HDLхол. Реф. граници:* общ холестерол: 1.8 - 5.2 mmol/L; *HDL-хол* 0.9 - 1.7 ♂; 1.1 - 1.9 mmol/L ♀

6. Високоэффективна течна хроматография (HPLC) за определяне серумна концентрация на Витамин В₆ (PAL, PALP). *Принцип:* Високоэффективната течна хроматография за определяне серумната концентрация на Витамин В₆ по метода на D. Durden се основава на йонообменно-хроматографския принцип. Използвани са колонки Marchery Nagel Нуклеозил С18 250 x 8.4 mm 5 μ m. Подвижната фаза съдържа 15 % ацетонитрил и 0.05 М КН₂РО₄ /7:1/, рН=2.9. Отчитането на елуираните фракции се извършва с флуоресцентен детектор при ексцитация 370 nm и емисия 470 nm. Спектро-флуориметричното определяне на Витамин В₆ се основава на флуоресценцията на получени при взаимодействие със семикарбазидхидрохлорид деривати. *Инструментарий:* Аналитична колонка Nagel Нуклеозил С 18 250 x 8.4 mm 5 μ m /Merck-Hitachi/; Подготвителна колонка Нуклеозил 120-7 С18 30 x 4 mm /Merck-Hitachi/; HPLC-помпа М 6000 АМ45 /Waters/; Мануална инжекционна система U6К /Waters/; Флуоресцентен детектор F 1000 /Merck-Hitachi/; Интеграторатор HP 3390 А /Hewlett-Packard/. *Реактиви:* Ацетонитрил 15 % CH₃CN /Merck/; 0.05 М КН₂РО₄ /Merck/; Семикарбазидхидрохлорид 0.05 М H₂N-NH₂-HCl /Merck/; ССl₃.COOH (ТХО) 0.5 М /Merck/; 1 М NaOH /Merck/; 99.9 % (C₂H₅)₂O /Merck/; 99 % CH₂Cl₂ /Merck/. *Стандарт* PAL= 12 ng/ml /Merck/; *Ст.* PALP 20 ng/ml /Merck/. *Ход на анализа:* 1ml ЕДТА-плазма + 1 ml 0.5 М ТХО. След 10 мин. центрофугиране 5 мин. при 4000 об/мин. 1 ml супернатант + 0.1 ml 0,5 М семикарбазидхидрохлорид. Теemperирание на водна баня при 45° С за 15 мин. След охлаждане се добавя 3 ml диетилетер. Центрофугиране 5 мин, 4000 об/мин. Органичната фаза се отстранява. Екстракцията с 3 ml диетилетер се повтаря. Добавят се 4 ml дихлорметан и пробата се центрофугира за 5 мин. на 4000 об/мин. Надстоящата фаза се използва за хроматографски анализ. Техника: 1000 μ l от пробата се инжектират чрез мануална

инжекция система U6K /Watters/ в хроматографското ложе. HPLC – подвижната фаза се вкарва чрез вакуумна система Millipore Waters. Стандарти: PAL 12 ng/ml и PALP 20 ng/ml /Merck/. Отчитането на елуираните фракции (флуоресциращи производни на PAL и PALP) се извършва флуориметрично при ексцитация 370 nm и емисия 470 nm. CV =1.14 %. Линейност: 2 – 500 ng/ml PALP. Референтни граници: PAL: 16 - 32 ng/ml; PALP: 12 – 54 ng/ml. Методът е проведен от специалист-химик в Катедра «Клинична фармакология», Университетска клиника, Франкфурт на Майн, Германия.

7. Имунохимичен метод за определяне концентрацията на α 1-антитрипсин (A-1-AT) в кръвен серум чрез ракетна имуноелектрофореза по Axelsen. Използвана е агароза (MERCK-Sevac), α 1-антитрипсин антитела (Sevac), вероналов буфер pH = 8.6 (Merck). На импрегниран с антитела агарозен гел в жлебчетата са нанасяни по 5 μ l от пробите. Плаката е включена за електрофореза на 20 volt/cm. Измервани са преципитационните пикове на проби и стандарт. Резултатите са изразявани в mg% или g/L. Референтни граници за A-1-AT = 1.5 - 3.5 g/L.

8. Статистически методи. Статистическата обработка на резултатите е осъществена чрез статистически програми STATGRAPHICS Plus 4.1 for Windows, SPSS 14 (Statistical Package for the Social Sciences), Exel Office 2007/. Резултатите са описани чрез таблици, графики и числови показатели за структура, честота, средни стойности, корелационни коефициенти. При анализа на резултатите са приложени параметрични тестове за проверка на хипотези при нормално и близко до нормалното разпределение на случаите: t-тест, ANOVA с post hoc test Tukey, Scheffe, Bonferroni, Newman-Keuls, Duncan и непараметрични тестове при различно по нормалното разпределение на случаите Pearson' χ^2 test, Mann-Whitney, Kruscal-Wallis H-test. Данните са представен като средностатистически и стандартна грешка (m \pm SEM). Значимостта на резултатите и изводите е определяна при p < 0.05. Корелационен анализ за взаимовръзката между явлението и причинната обусловеност се изчислява коефициент на корелация r. Ако r е < 0.3 - слаба корелационно зависимост, r \geq 0.7 значителна, при тристепенна скала за зависимост. Коефициентът може да се изчисли по Пирсон: $r^{(p)} = \frac{ad - bc}{\sqrt{[(a + b) \cdot (c + d) \cdot (a + c) \cdot (b + d)]}}$. При качествени алтернативни признаци може да се използва специален критерий за факторно влияние OR /odds risk/, като OR = ad : bc. Ако OR е по-висок от 1, изследваният експониращ фактор е рисков, ако OR < 1, се касае за положителен експониращ фактор.

Резултати и дискусии по поставените задачи

По задача № 1. Адаптиране колориметричния метод с NBT за определяне на концентрациите на фруктозамин (ФА) в кръвен серум, чрез изследване влиянието на някои аналитични параметри.

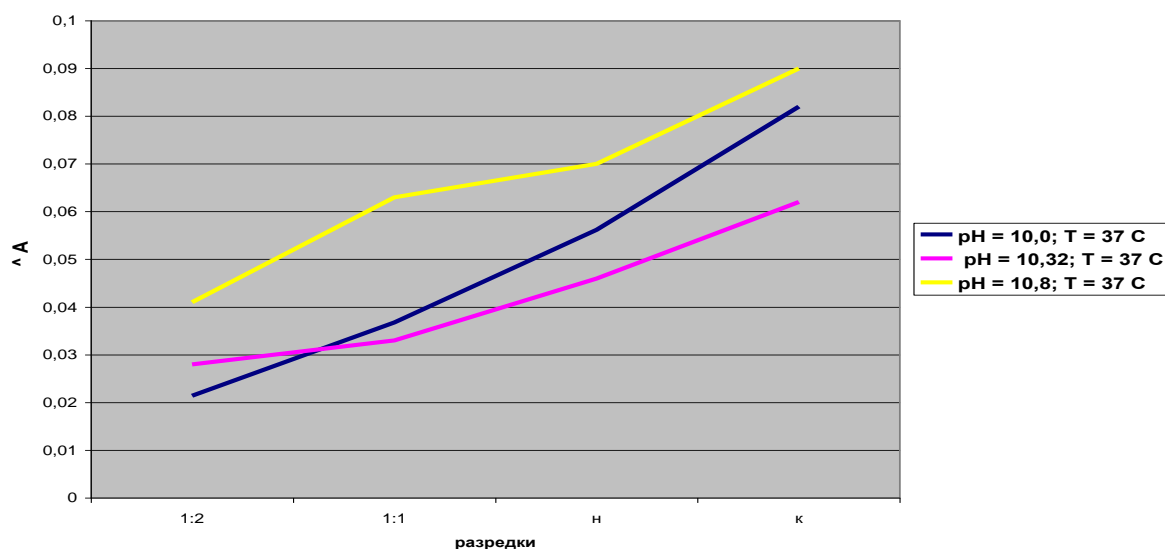
Експериментална постановка: В сух термостат при $T = 37^{\circ} \text{C}$ за 7 дни са инкубирани 40 g/L Humanserumalbumin (Sigma), 20 mmol/L D-Glucose (Merck), 0.1% NaN_3 във фосфатен буфер с $\text{pH} = 7.4$. За определяне на получените кетоамини (фруктозамин) е използван колориметричния метод с NBT. *Начин на работа:* 100 μl от реакционната смес + 1ml 0.25 mmol/L NBT-реактив. Абсорбциите на получения цветен продукт формазан са измервани на Спекорд на 10-та и 15-та мин. при постоянно темпериране на воден термостат, като за анализиране температурното влияние са проведени серии при $T = 25^{\circ}$ и $T = 37^{\circ} \text{C}$. Използван е вторичен стандарт, чиято концентрация на ФА е сравнена с тази на синтетичен DMF /Hofman la Roche/. Резултатите са изразени в $\mu\text{mol/L/g}$ белтък НМФ. Експерименталните изследвания за анализиране влиянието на T и pH , са проведени със сборен кръвен серум при разреждания 1:2; 1:1; неразреден (н) и еквивалент на концентриран (к). За анализиране влиянието на pH върху колориметричния метод с NBT, са изследвани пробни серии с карбонатен буфер $\text{pH} = 10.0$; $\text{pH} = 10.32$; $\text{pH} = 10.8$. *Резултати:* На Фиг. № 3 са представени резултатите от проучване *влиянието на pH върху колориметричния метод с NBT* за определяне концентрациите на ФА в серум. Проследени са абсорбциите (ΔA) в различни серии: карбонатен буфер с $\text{pH} = 10.0$; $\text{pH} = 10.32$ и $\text{pH} = 10.8$. Извършвани са десетократни измервания на всяка серия.

Табл. № 1. Влияние на pH върху колориметричния метод с NBT за определяне на ФА

I. NBT реактив $\text{pH} = 10.80$				
Серум разредки	1:2	1:1	Неразреден серум	Концентриран серум
№	ΔA	ΔA	ΔA	ΔA
1	0.040	0.060	0.070	0.090
2	0.038	0.067	0.072	0.080
3	0.044	0.070	0.072	0.088
4	0.041	0.062	0.072	0.090
5	0.043	0.065	0.065	0.092
6	0.036	0.065	0.069	0.092
7	0.038	0.060	0.069	0.090
8	0.050	0.064	0.072	0.091
9	0.049	0.065	0.068	0.088
10	0.042	0.065	0.070	0.090
\bar{x}	0.042	0.065	0.070	0.090

II. NBT реактив рН = 10.32				
Серум разредки	1:2	1:1	неразреден	концентриран
№	ΔA	ΔA	ΔA	ΔA
1	0.028	0.030	0.048	0.062
2	0.028	0.030	0.046	0.066
3	0.028	0.030	0.054	0.060
4	0.030	0.033	0.050	0.058
5	0.028	0.033	0.052	0.064
6	0.030	0.035	0.049	0.062
7	0.028	0.034	0.051	0.062
8	0.028	0.032	0.051	0.063
9	0.028	0.032	0.050	0.062
10	0.034	0.033	0.049	0.064
\bar{x}	0.028	0.032	0.050	0.062
III. NBT реактив рН = 10.00				
Серум разредки	1:2	1:1	неразреден	концентриран
№	ΔA	ΔA	ΔA	ΔA
1	0.020	0.030	0.052	0.090
2	0.020	0.040	0.060	0.090
3	0.020	0.040	0.060	0.095
4	0.018	0.040	0.052	0.095
5	0.024	0.030	0.052	0.097
6	0.026	0.035	0.056	0.090
7	0.024	0.030	0.050	0.090
8	0.024	0.035	0.050	0.093
9	0.022	0.033	0.050	0.093
10	0.022	0.037	0.056	0.093
\bar{x}	0.022	0.035	0.056	0.093

Колориметричен метод с NBT за ФА - влияние на рН



Фиг. № 3. Влияние на рН върху колориметричния метод с NBT за определяне на ФА в серум

Обсъждане: Анализът на резултатите за получените абсорбции на пробите при колориметричния метод с NBT за определяне на ФА показва, че при рН = 10.8, ΔA са по-високи в сравнение с останалите експериментирани серии рН (Фиг.№ 3). Тази тенденция се демонстрира при всички серии на кръвния серум - разреден 1:1, 1:2, неразреден и еквивалент на концентриран серум. Получените резултати потвърждават становището на редица изследователи, че при алкални стойности на рН интерфериращо влияние оказва свободната, несвързана с протеините глюкоза, което може да бъде причина за фалшивоположителни резултати. От друга страна, провеждането на анализа при рН = 10.0 създава условия за интерфериране от страна на глутатиона, аскорбата и други редуциращи агенти и също увеличава възможността за лабораторна грешка. Това се потвърждава от получените в настоящия експеримент по-високи стойности на ΔA при рН = 10.0, в сравнение с тези при рН = 10.32. Средностатистически стойности на ΔA при неразреден серум: $\bar{x} = 0.070$ при рН 10.80; $\bar{x} = 0.050$ при рН 10.32 и $\bar{x} = 0.056$ при рН 10.00. Резултатите налагат *извода*, че анализът протича с оптимален ход, линейност и възпроизводимост при рН = 10.32. Добрата възпроизводимост на метода се доказва чрез изчисления вариационен коефициент $V_C = 3.9\%$ при $n = 10$.

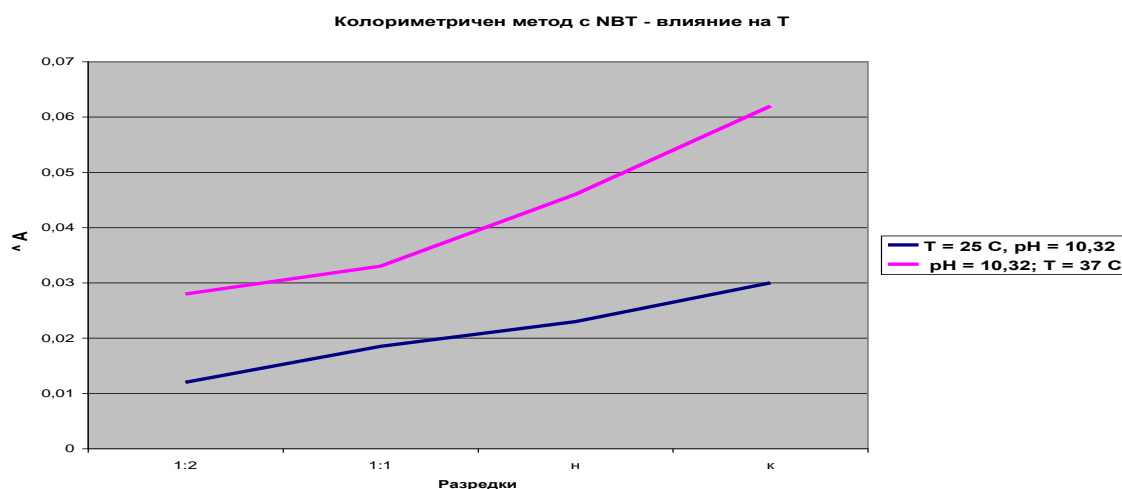
За проследяване *температурното влияние върху колориметричния метод с NBT*, са проведени експериментални серии *in vitro* при $T = 37^\circ C$ и $T = 25^\circ C$. (Табл. № 2, Фиг. № 4). Получените стойности на ΔA при различните разреждания показват, че при $T=25^\circ C$, зависимостта на ΔA /разредки на серума, има почти хоризонтален ход. Тези резултати доказват, че при $T=25^\circ C$ реакцията не протича. Оптималият ход на анализа се наблюдава при $T=37^\circ C$, където с повишаване концентрацията на ФА, се повишава линейно и A на цветния продукт формазан.

Извод: Експерименталните резултати от нашето изследване налагат извода, че оптималните стойности за аналитичните параметри на колориметричния метод с NBT за определяне на ФА в кръвен серум са: рН = 10.32; $T = 37^\circ C$ при $\lambda = 530\text{ nm}$.

Табл. № 2. Колориметрично определяне на ФА с NBT - влияние на T°

T = 25 ° C; NBT реактив с рН = 10.32				
Серум разредки	1:2	1:1	Неразреден	концентриран
№	ΔA	ΔA	ΔA	ΔA
1	0.028	0.032	0.045	0.062
2	0.032	0.032	0.044	0.062
3	0.024	0.033	0.044	0.066
4	0.028	0.033	0.046	0.060

5	0.026	0.033	0.046	0.058
6	0.026	0.035	0.047	0.058
7	0.032	0.035	0.047	0.064
8	0.028	0.034	0.045	0.063
9	0.028	0.034	0.044	0.062
10	0.028	0.033	0.043	0.062
\bar{x}	0.028	0.033	0.045	0.062
T = 37 ° C; NBT реактив с рН = 10.32				
Серум разредки	1:2	1:1	неразреден	концентриран
№	ΔA	ΔA	ΔA	ΔA
1	0.014	0.019	0.023	0.030
2	0.012	0.020	0.022	0.030
3	0.012	0.020	0.025	0.028
4	0.014	0.021	0.023	0.032
5	0.016	0.022	0.021	0.032
6	0.016	0.019	0.025	0.028
7	0.012	0.019	0.022	0.028
8	0.013	0.020	0.023	0.030
9	0.013	0.021	0.023	0.030
10	0.012	0.019	0.023	0.030
\bar{x}	0.012	0.019	0.023	0.030



Фиг. № 4. Влияние на T върху колориметричния метод с NBT за определяне на ФА в серум

По задача № 2. Определяне собствени референтни граници на фруктозамин в кръвен серум за детска възраст, чрез адаптирания колориметричен метод с NBT.

Реализирането на поставената задача на дисертационния труд за анализиране концентрациите на фруктозамина като маркер на ретроспективния гликемичен контрол при деца със захарен диабет, наложи разработване на собствени референтни граници, поради липсата на такива до момента на анализа, съобразени с

използвания лабораторен метод, стандартизирането му и референтната популация. Правилното интерпретиране стойностите на фруктозамин изисква съблюдаване на референтните граници, съобразно използвания лабораторен метод и стандарт. Цитираните от чужди автори референтни граници за фруктозамин, не можеха да бъдат използвани за целите на нашето проучване, поради методични различия, а за българска популация такива липсваха до момента на изследването.

Материали и методи: За определяне референтните граници на фруктозамин в детска възраст, е анализирана референтна група от $n = 85$ деца от Централна Северна България. Възрастовият диапазон е от 0 до 15 години, разделени в две възрастови подгрупи: а) от 0 до 1 год.; б) от 1 до 15 години. Разпределение по пол: 45 момчета и 40 момичета. Децата са без данни за нарушения на гликемичния статус и без фамилна обремененост за захарен диабет. Няма симптоматика за заболявания на пикочополовата система. Изследваните деца са контингент на Детска клиника, МУ-Плевен. Референтният колектив е рандомизиран по отношение наследственост за захарен диабет, гликемичен контрол и бъбречни заболявания. За целите на изследването е вземана 1.5 мл кръв от кубиталната вена на гладно. Изследвани са серумните концентрации на ОБ, глюкоза и фруктозамин (ФА).

Резултати: Резултатите от изследването на серумните концентрации на ФА, ОБ и серумна глюкоза при референтната популация, са представени на Табл. № 3.

Табл. № 3. Концентрации на ФА, ОБ и сер. глюкоза при деца в референтната популация

Момчета ♂					Момичета ♀				
№ ♂	Възраст	ФА μmol/L	Сер. глю mmol/L	ОБ g/L	№ ♀	Възраст	ФА μmol/L	Сер. глю mmol/L	ОБ g/L
1	10 мес.	0.890	3.63	70.00	1	3 мес.	1.203	3.60	73.99
2	6 мес.	0.932	3.77	76.75	2	5 мес.	1.090	2.90	54.79
3	7 мес.	0.861	2.98	65.18	3	8 мес.	0.831	3.22	81.00
4	7 мес.	1.149	3.69	78.75	4	8 мес.	0.977	3.22	79.65
5	11 мес.	1.113	3.96	64.95	5	5 мес.	0.527	3.70	50.53
6	3 мес.	1.211	3.18	54.26	6	7 мес.	1.592	3.76	61.93
7	6 мес.	1.053	4.72	72.87	7	3 мес.	1.195	4.60	60.51
8	4 мес.	0.631	3.93	74.15	8	3 мес.	1.278	4.04	69.59
9	6 мес.	0.975	3.68	63.35	9	3 мес.	1.652	4.33	67.99

10	10 мес.	1.050	3.05	80.43	10	4 мес.	1.163	3.18	62.39
11	2 мес.	1.180	2.64	61.09	11	6 мес.	1.053	3.45	59.99
12	4 мес.	1.041	3.05	64.50	12	7 мес.	0.369	4.41	81.04
13	3 мес.	1.076	2.90	62.38	13	11 мес.	0.429	4.04	74.15
14	4 мес.	0.959	4.04	67.67	14	5 мес.	0.906	4.27	90.87
15	11 мес.	1.002	3.31	46.88	15	1 месяц	1.001	2.90	61.71
16	7 мес.	0.812	3.92	77.99	16	7 мес.	0.829	3.13	76.76
17	4 мес.	1.002	3.44	71.10	17	10 мес.	0.609	3.34	80.99
18	2 мес.	0.829	3.23	54.94	18	6 мес.а	0.729	2.79	73.48
19	4 мес.	1.204	4.73	65.77	19	2 мес.а	0.911	3.31	63.00
20	8 мес.	0.348	2.46	67.23	20	8 мес.	0.752	4.23	81.62
21	7 мес.	0.917	3.21	66.31	21	4 мес.	0.832	2.60	57.10
22	3 мес.	1.109	4.10	65.39	22	5 мес.	0.847	3.06	58.12
23	7 мес.	0.530	4.05	75.93	23	2 мес.	0.905	4.83	64.31
24	1 мес.	1.186	2.39	50.95	24	8 мес.	1.266	4.14	60.98
25	6 мес.	0.905	3.96	74.20	25	8 мес.	1.223	3.57	65.49
26	5 мес.	0.522	4.65	64.31	26	1 мес.	1.427	4.14	48.69
27	7 год.	1.489	4.42	69.14	27	6 год.	0.943	3.50	62.39
28	6 год.	1.349	4.22	65.70	28	2 год.	0.1879	3.05	66.95
29	7 мес.	1.475	4.48	65.92	29	5 мес.	0.994	2.98	67.60
30	9 мес.	1.134	4.05	70.64	30	9 год.	0.816	3.67	81.52
31	4 мес.	0.98	2.90	64.34	31	13 год.	0.976	5.71	89.13
32	13 год.	1.040	5.61	83.69	32	11 год.	1.135	4.79	90.22
33	11 год.	1.090	4.08	89.13	33	14 год.	0.868	4.59	82.60
34	14 год.	0.861	4.08	89.13	34	8 год.	0.675	3.58	81.29
35	13 год.	1.014	5.00	85.86	35	12 год.	1.195	4.90	77.90
36	14 год.	1.126	5.40	74.99	36	6 год.	0.596	4.44	88.06
37	7 год.	1.207	5.10	86.95	37	9 год.	0.675	3.33	81.29
38	9 год.	0.737	7.03	80.94	38	14 год.	0.777	3.80	90.05
39	9 год.	0.936	5.50	89.19	39	12 год.	0.939	4.00	66.52
40	11 год.	0.394	3.95	84.67	40	6 год.	1.410	4.10	72.66
41	5 год.	0.768	4.32	89.93					

42	11 год.	1.041	2.23	77.90					
43	4 год.	0.975	5.42	88.06					
44	14 год.	0.803	4.40	77.77					
45	4 год.	1.202	4.30	66.52					
		ФА ♂ $\bar{x} = 0.980$ $\mu\text{mol/L}$	Сер.глю $\bar{x}=3.98$ mmol /L	ОБ $\bar{x}=71.95 \text{ g}$ $/\text{L}$			ФА ♀ $\bar{x} = 0.962$ $\mu\text{mol/L}$	Сер. глю $\bar{x} = 3.78$ mmol /L	ОБ $\bar{x}= 71.47$ g/L

Статистическата обработка на резултатите е направена чрез количествен вариационен анализ за определяне на \bar{x} ($\bar{x} = \Sigma x : n$, където Σx е сумата от измерените стойности, n е брой случаи). Определяна е вариабелност стандартно отклонение $s / \sigma = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$. Използван е метода на Мартин за сигмалните отклонения. На базата на получените резултати и чрез метода на вариационния анализ, са изчислени референтни граници на фруктозамин за детска възраст, а именно:

0.441 - 1.502 $\mu\text{mol/L}$ ($\bar{x} \pm 2\sigma = 0.972 \pm 2 \times 0.265$).

За възрастовите подгрупи, референтните граници за ФА са:

а) от 0 до 1 години: 0.431 – 1.547 $\mu\text{mol/L}$ ($\bar{x} \pm 2\sigma = 0.988 \pm 2 \times 0.279$)

б) от 1 до 15 години: 0.474 – 1.386 $\mu\text{mol/L}$ ($\bar{x} \pm 2\sigma = 0.930 \pm 2 \times 0.228$)

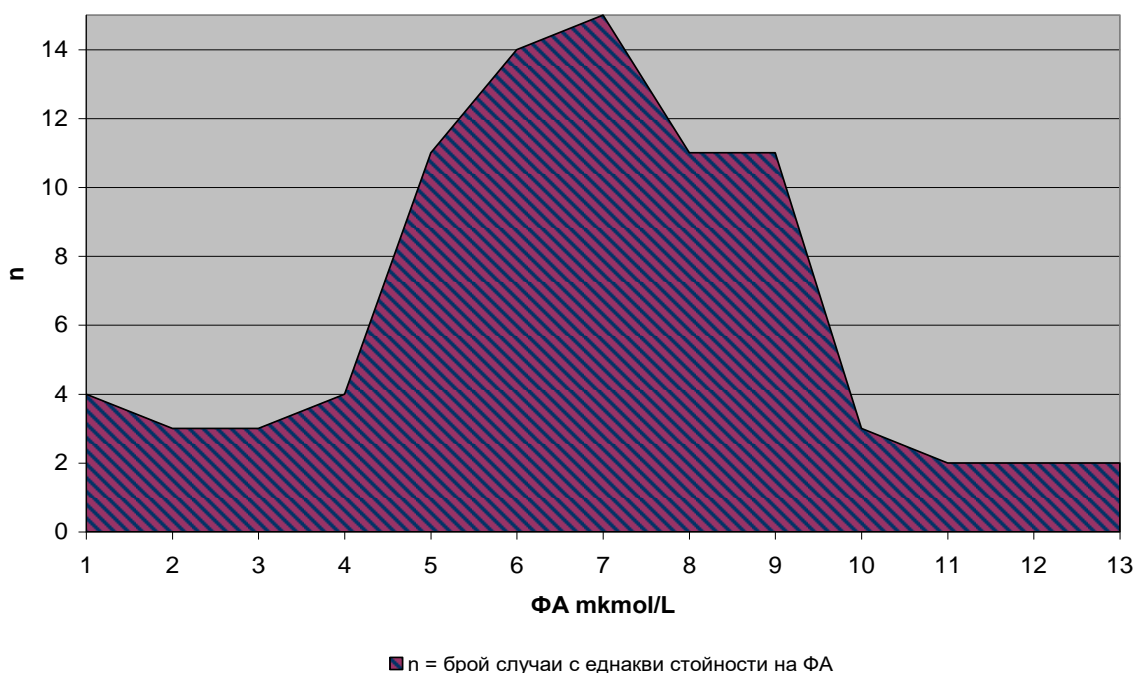
Статистическата обработка на получените от нас данни за стойностите на фруктозамин в референтната популация показва, че не се установяват значими различия в концентрациите на фруктозамина между кърмачета (подгрупа а) и деца от 1 до 15 години (подгрупа б). Статистически достоверни разлики по пол за ФА също не са установени: $p > 0.10$ ($\bar{x} \text{ ♂} = 0.980 \mu\text{mol/L}$; $\bar{x} \text{ ♀} = 0.962 \mu\text{mol/L}$ НМФ).

Обсъждане и изводи: На базата на получените стойности за фруктозамин и серумна глюкоза е изчислена корелационна зависимост между тези два показателя на гликемичния статус $r = 0.062$. Статистическият анализ показва, че между фруктозамина и серумната глюкоза липсва корелационна зависимост. Отсъствието на корелация между двата показателя потвърждава информационната значимост на фруктозамина. ФА е индекс на гликемията за предходния период от 2-3 седмици, докато концентрациите на глюкозата отразяват моментния статус. Тези резултати потвърждават литературните данни за необходимостта от изследване на ФА като допълнителен маркер на гликемичния контрол.

Определените от нас референтни граници за фруктозамин ФА в детска възраст (0.441 - 1.502 $\mu\text{mol/L}$) отговарят на нормалното Гаусово разпределение за референтната популация (Фиг. № 5) и се различават от литературатурната справка. По литературни данни, референтните граници на ФА в детска възраст, изследвани чрез колориметричния метод с NBT и стандарт DMF са 1.50 - 2.70 mmol/L .

Настоящото определяне референтните граници на фруктозамин за детска възраст при българска популация регион Плевен, има оригинален характер. Потвърждава се необходимостта от разработване на собствени референтни граници, съобразно използвания метод, стандарт и референтната популация.

Референтни граници на ФА в детска възраст - Гаусово разпределение



Фиг. № 5. Референтни граници на ФА за детска възраст – Гаусово разпределение

По задача № 3. Изследване на фруктозамин като критерий на метаболитния контрол при захарен диабет в детска възраст.

Спецификата на захарния диабет в детска възраст с чести флукуации на серумната глюкоза, както и ранната профилактика на усложненията, са предисторията на биохимичните проучвания за осъвременяване на метаболитния контрол. Процесът на неензимно гликиране на белтъците играе съществена роля в патогенезата диабетните микроангиопатии. Това налага въвеждане на показатели,

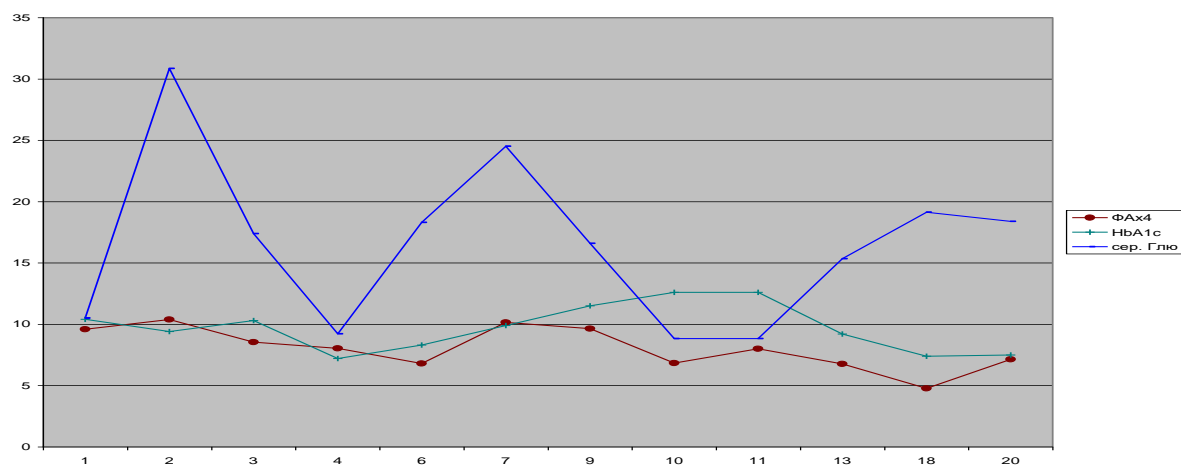
отразяващи ретроспективната хипергликемия, довела до трайно свързване на глюкозните молекули с полипептидните вериги. Утвърден критерий на ретроспективния гликемичен статус за период от 2 месеца е гликираният хемоглобин HbA_{1c} . По-динамичен показател на НЕГ е фруктозаминът (маркер на неензимното гликиране на серумните белтъци). Той все още не намира широко приложение в клиничната практика, въпреки неговата различна информационна стойност от тази на гликирания хемоглобин. Най-нови проучвания върху Амадори-продуктите на гликирания серумен албумин сочат, че те се асоциират в по-голяма степен с диабетната нефропатия, в сравнение с гликирания хемоглобин, а имунореактивен Амадори-албумин е открит в ретинни капиляри на диабетици. ФА отразява по-обективно ретроспективния гликемичен статус в сравнение с HbA_{1c} при нестабилни хипергликемии, каквито често се наблюдават в детска възраст, както и при хемоглобинопатии и анемии.

Целта на настоящото проучване е изследване серумните концентрации на фруктозамин (ФА) като допълнителен критерий на метаболитния контрол при захарен диабет в детска възраст и аргументиране приложението на този показател в клиничната практика. *Материали и методи:* Изследвани са $n = 21$ деца със захарен диабет тип 1, от които 9 момчета и 12 момичета, на възраст между 6 и 15 години ($\bar{x} = 10.9$ год). Таргентната група е контингент на Детска клиника МУ-Плевен. Пациентите са лекувани по утвърдените сандарти на клиничната практика. За целите на изследването е вземана 2.0 мл кръв от кубиталната вена сутрин на гладно. Определяни са утвърдените за метаболитния контрол показатели - общ белтък, серумна глюкоза, холестерол и ТГ, по описаните методи. За целите на клиничното проучване върху НЕГ, са изследвани съвременните маркери за степента на неензимно гликиране на белтъците: ФА (колориметричния метод с NBT) и HbA_{1c} (колориметричен метод с 2-ТБК). *Резултатите* от клиничното проучване при деца със захарен диабет тип 1, са представени на Табл. № 4, Фигури № 6, № 7, № 8.

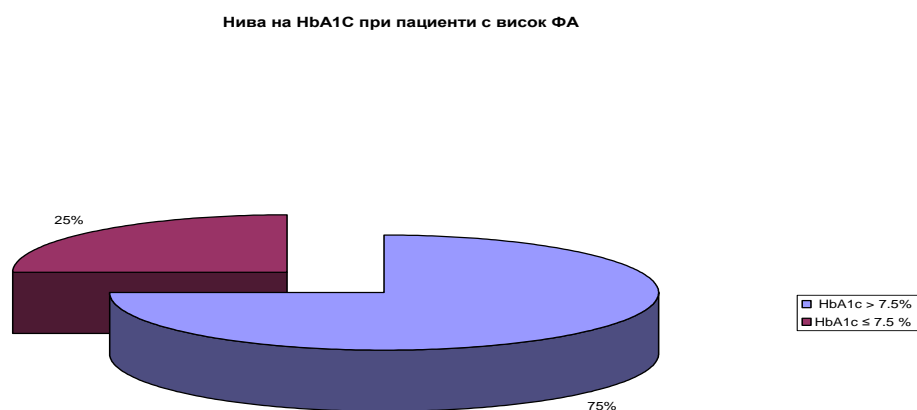
Табл. № 4. Стойности на **ФА**, **HbA_{1c} %** и липиден профил при деца със ЗД тип 1

№	Пол	Възраст	Де/компенсация ЗД	ФА $\mu\text{mol/L}$	Сер глю mmol/L	Кр. зах профил	HbA_{1c} %	О Хол mmol/L	ТГ mmol/L	ОБ g/L
1	Момче	15 год.	Д 1	2.397	10.50	+	10.4	5.54	2.06	68.81
2	момче	14 год.	Д 2	2.596	30.86	+	9.4	5.54	4.08	84.73

3	момче	13 год.	Д 1	2.137	17.39	+	10.3	5.22	1.22	73.68
4	момче	15 год.	Д 1	2.009	9.22	+	7.2	4.13	1.03	77.11
5	момче	9 год.	К	1.070	8.50	-	6.9	4.53	0.49	76.03
6	момче	5 год.	ДП	1.700	18.31	+	8.3	5.46	1.56	71.17
7	момче	12 год.	ДП	2.536	24.52	++	9.9	4.77	1.92	73.28
8	момче	9 год.	ДП	1.013	7.40	-	8.5	5.31	1.15	79.80
9	момче	6 год.	ДП	2.409	16.60	++	11.5	7.00	2.37	74.70
10	момиче	14 год.	ДП	1.708	8.83	+	12.6	4.72	1.74	88.98
11	момиче	11 год.	ДП	2.001	8.83	++	12.6	5.67	2.02	75.93
12	момиче	15 год.	К	1.390	7.00	-	7.1	3.70	1.04	70.00
13	момиче	15 год.	ДП	1.690	15.34	+	9.2	5.47	1.24	72.45
14	момиче	13 год.	К	1.290	7.41	-	7.3	3.58	2.34	71.22
15	момиче	6 год.	К	1.150	4.13	-	7.5	3.32	0.62	78.59
16	момиче	8 год.	К	1.268	3.47	-	7.4	3.68	0.67	67.00
17	момиче	8 год.	К	1.143	6.80	-	8.8	4.12	0.73	89.73
18	момиче	13 год.	ДП	1.932	19.13	+	7.4	4.13	1.23	97.78
19	момиче	14 год.	К	1.220	6.10	-	7.5	4.27	1.18	85.68
20	момиче	7 год.	ДП	1.785	18.39	++	7.5	4.44	0.81	73.28
21	момиче	7 год.	К	1.077	6.80	-	7.5	3.50	0.63	74.32
х		<i>10.9</i>		<i>1.691</i>	<i>12.16</i>		8.8	4.66	1.43	77.34

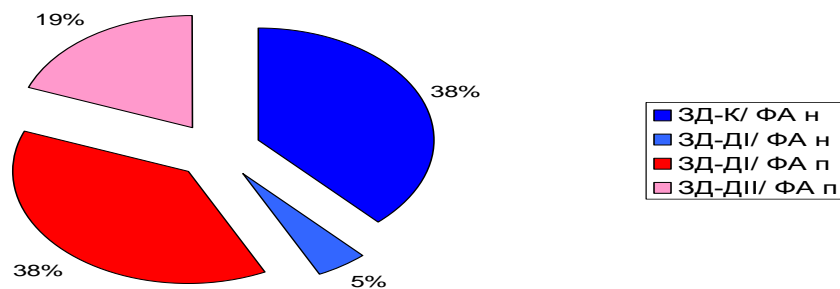


Фиг. № 6. ФА, сер. глюкоза, HbA_{1c} - клинично изследване при деца със ЗД



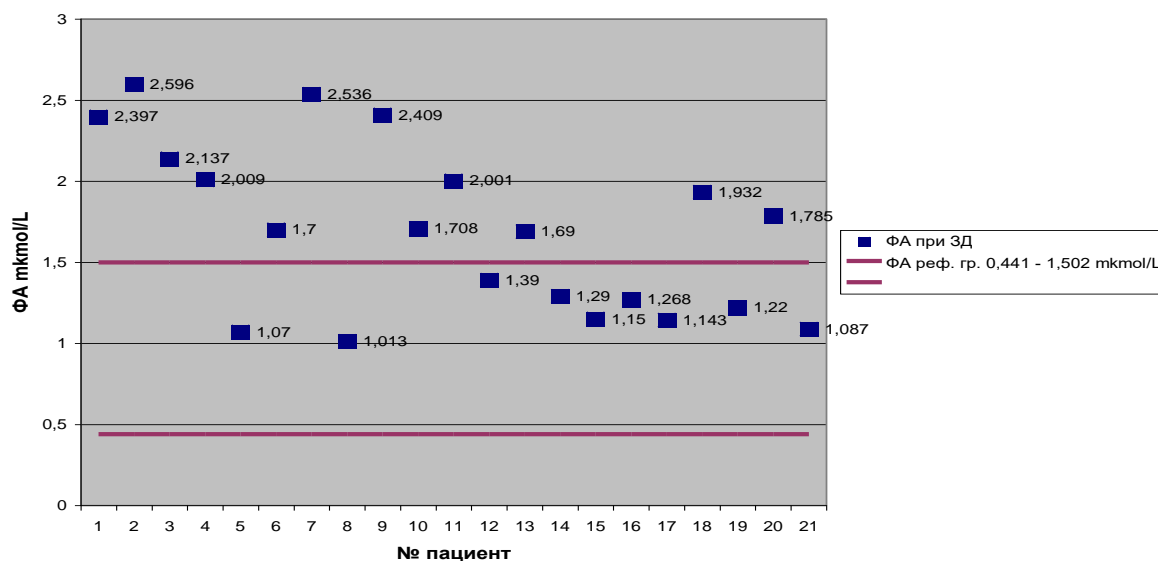
Фиг. № 7, а. Зависимост между стойностите на ФА и HbA_{1c} при деца със ЗД

Зависимост между ФА и степента на компенсация на ЗД



Фиг. № 7,б. Съпоставка между ФА и степента на компенсация на захрния диабет

ФА при деца със ЗД / съпоставка с референтни граници



Фиг. № 8. Съпоставка между стойностите на ФА при деца със ЗД и референтните граници

Обсъждане: Резултатите от нашето проучване показват, че при 12 от изследваните деца със захарен диабет тип 1, т. е. при 57% от случаите, нивото на ФА е повишено в сравнение с референтните граници (Фиг. № 8). Серумната глюкоза е повишена при 11 от тях, като при пациент № 2 наблюдаваме високостепенна хипергликемия. При един пациент (случай № 4) серумната глюкоза е в референтни граници. Липсата на корелация между стойностите на серумна глюкоза и ФА ($p > 0.05$) се обяснява с различната информационна значимост на тези показатели по отношение на хипергликемията – единият показател отразява моментното състояние, а другият степента на хипергликемия в предхождания триседмичен период.

При комплексна преценка по утвърдените клинични и лабораторни критерии (КЗП, липиден профил и др.), всички деца с високи стойности на ФА се оказват с лош метаболитен контрол. Пациентите със захарен диабет тип 1 и декомпенсация I степен (ДИ) са 38 % от таргентната група (Фиг.7 а,б). При всички тях и ФА е повишен, като корелационният анализ между степента на декомпенсация и стойностите на ФА показва, че $p < 0.005$. Тази висока корелационна зависимост между стойностите на ФА и комплексната оценка за степента на компенсация, се потвърждава и при пациентите с декомпенсация II степен (ДИІ), които по утвърдените клинични и лабораторни критерии са 19 %. Всички пациенти със захарен диабет с втора степен на декомпенсация, имат повишени концентрации на

фруктозамин. Фактът, че всички пациенти със захарен диабет тип 1, които са в декомпенсация на заболяването, имат повишени серумни концентрации на ФА, доказва надеждността на този показател като маркер на метаболитния дисбаланс при захарния диабет. Същевременно изследването на показателя фруктозамин носи допълнителна информация за пациентите с лош метаболитен контрол. Повишените му стойности показват, че хипергликемията е персистирала през предходния триседмичен период. Екстремно повишените концентрации на неензимно гликираните серумни белтъци (ФА) дават насоки за анализиране медикаментозното поведение и прецизиране на дозировките от страна на лекуващите лекари, с оглед факата, че повишената степен на неензимно гликиране на серумния албумин променя неговите фармакобиохимични характеристики.

Холистичната оценка на състоянието при изследваните деца със захарен диабет, има допълнителна опорна точка чрез интерпретацията на стойностите на неензимно гликираните серумни белтъци. Например тези пациенти, които имат нормални (референтни) нива на ФА, ако и да са били класифицирани до този момент като декомпенсирани, получават допълнителна информация за по-добър метаболитен контрол през изминалия 3-седмичен период. При 5 % от изследваните пациенти, които са в декомпенсация по утвърдените критерии, стойностите на ФА са в референтни граници (Фиг. № 7 а, б). За тези пациенти резултатите от настоящото изследване дават допълнителна информация за по-добра прогноза на гликемичния контрол, в сравнение с пациентите, при които стойностите на ФА са повишени, спрямо референтните стойности.

Необходимостта от осъвременяване на гликемичния контрол чрез изследване на ФА се доказва и чрез съпоставка на стойностите на фруктозамин при пациентите със захарен диабет тип 1 с референтните граници за детска възраст (Фиг. № 8). Анализът показва, че нивото на ФА е в референтните граници при 9 от изследваните деца със захарен диабет (43%). От тях 8 са с добър метаболитен контрол (89%), а пациент № 8 е с лош контрол - в случая се касае за декомпенсация с малка давност, недостатъчна да повлияе степента на гликиране на сер. албумин.

Нашите изследвания за степента на неензимно гликиране на белтъците доказват високата информационна стойност на ФА като един допълнителен обективен показател на гликемичния контрол. При съпоставка на получените от нас резултати за ФА и HbA_{1c} (Фиг. № 7 а) е видно, че 75 % от пациентите с високи стойности на ФА, имат и повишени нива на HbA_{1c} – положителна корелационна зависимост

$r = 0.76$. Интерпретацията на хипергликемичния статус и процеса на НЕГ указва, че високите нива на серумна глюкоза са персистиращи не само 21 дни ретроспективно на изследването, но и в предходния 2-месечен период. Положителна корелация между ФА и HbA_{1c} се съобщава и от други автори. Нашето проучване има потвърдителен характер за ФА и HbA_{1c} при пациенти със захарен диабет.

Изводи: Резултатите от нашето клинично проучване за ролята на неензимно гликираните белтъци при деца със захарен диабет тип 1 доказват, че комплексната оценка на метаболитните промени при захарния диабет налага изследване на актуални показатели за неензимно гликиране на белтъците, каквито са гликираният хемоглобин и фруктозаминът. Като по-динамичен показател, ФА може да допринесе за по-доброто обективизиране метаболитния дисбаланс за предхождащия триседмичен период, особено при пациенти с флукуираща серумна глюкоза.

Високите стойности на фруктозамин са надежден допълнителен показател за декомпенсация на захарния диабет. Стойностите на ФА в референтните граници носят информация за по-добър гликемичен контрол, дори при случаи, когато гликираният хемоглобин е повишен.

Нашите изследвания имат потвърдителен характер за ролята на ФА при комплексната оценка на метаболитния статус при нестабилни хипергликемични състояния. Принос има интерпретирането на фруктозамина като допълнителен критерий за преценка степента на компенсацията на захарния диабет тип 1 в детска възраст, популяризирането му сред практикуващите лекари и въвеждането му като допълнителен метаболитен критерий у нас.

По задача № 4. Изследване серумните концентрации на фруктозамин (ФА) и алфа-1-антитрипсин (А-1-АТ) при пациенти с диабетна ретинопатия.

Микроваскуларните усложнения на захарния диабет (диабетна ретинопатия и нефропатия) са обект на редица научни проучвания, които анализират патобиохимичните механизми на съдовите лезии при персистиращи хипергликемични състояния. Късните усложнения на ЗД се обуславят от комплексни патобиохимични механизми, между които неензимното гликиране на белтъците и микроваскуларния интегритет заемат особено важно място. Фруктозамин-тест отразява степента на НЕГ на всички серумни белтъци – албумин, хаптоглобин, трансферин, имуноглобулини, алфа-1-антитрипсин (α -1-АТ) и др. Албуминът има най-високо процентно съдържание при електрофоретично разделяне на плазмените белтъци, поради което в клиничен аспект терминът ФА,

често се идентифицира с неензимно гликиран серумен албумин. Детайлното анализиране на показателя обаче би трябвало да съблюдава факта, че колориметричният метод с NBT отразява получените при неензимно гликиране фруктозамини на всички серумни белтъчни фракции, между които и А-1-АТ. α 1-антитрипсинът е острофазов гликопротеин от групата на сериновите протеазни инхибитори (СЕРПИНИТЕ). Сериновите протеинази са лизозомални неутрофилни ензими, които обичайно са в неактивна форма, благодарение на СЕРПИНИТЕ, какъвто е α 1-антитрипсинът. Дефицит на А1АТ е предпоставка за повишена пропускливост на съдовата стена и съединителнотъканни увреждания. Каква е ролята на ензимите от групата на протеазите и техните инхибитори при диабетните микроангиопатии, е въпрос който е застъпен ограничено в научната литература и данните са противоречиви. Справката сочи, че дисбалансът протеинази/антипротеинази е от значение за диабетните микроангиопатии, но проучвания за взаимоотношката между фруктозамин и алфа-1-антитрипсин не са открити.

Целта на настоящото проучване е да анализира взаимоотношката между неензимното гликиране на белтъците и васкуларната дисфункция при диабетна микроангиопатия чрез изследване корелационната зависимост между фруктозамин (ФА) и α 1-антитрипсин (А-1-АТ) при пациенти с диабетна ретинопатия.

Дизайн на проучването: В открито клинично проучване са включени $n = 18$ пациента със захарен диабет с непролиферативна диабетна ретинопатия, хоспитализирани в Катедра „Пропedeutика на Вътрешните болести” МУ-Плевен. От тях 8 мъже и 10 жени на възраст от 38 до 80 години и давност на захарния диабет повече от 10 години. Контролната група обхваща $n = 20$ здрави доброволци от Централна Северна България на възраст от 28 до 62 години, между които 8 мъже и 12 жени без данни за нарушен глюкозен толеранс. Методи: За целите на настоящата клинична студия при пациенти с диабетна ретинопатия са изследвани серумните концентрации на фруктозамин (маркер на неензимно гликирани белтъци) и алфа-1-антитрипсин (СЕРПИНИ). Концентрациите на ФА са изследвани чрез колориметричния метод с NBT. Серумните концентрации на α 1-антитрипсин са определени чрез имунохимичен метод ракетна имуноелектрофореза по Axelsen. Измервани са преципитационните пикове на пробите и стандартата, като резултатите за А-1-АТ са изразявани в mg%. Анализите са осъществени в Сектор „Биохимия” МУ-Плевен.

Резултати и обсъждане: Резултатите от нашето проучване за серумните концентрации на ФА и А-1-АТ са представени на Тбл. № 5, № 6 и Фиг. № 9, 10. Средностатистическите концентрации на показателя за неензимно гликирани белтъци (ФА) и тези на α 1-антитрипсин при таргентната група пациенти с диабетна ретинопатия са: ФА $\bar{x} = 2.667 \pm 3.283 \mu\text{mol/L}$; А-1-АТ $\bar{x} = 291.38 \pm 1.280 \text{ mg\%}$.

Получените данни за изследваните показатели в таргентната група пациенти с диабетна ретинопатия показват по-високи концентрации на ФА спрямо реф. граници, а средностатистическите стойности на А1АТ са по-ниски от тези на контролната група. Нашите резултати не потвърждават данните на М. Hashemi, за повишени стойности на А1АТ при пациенти със ЗД и тромбоваскуларни усложнения. Данните от нашето проучване показват тенденция за по-ниски от референтните конц. за А1АТ при 13 (72 %) от изследваните пациенти. Анализирайки получените резултати и възможните причини за девиацията в концентрациите на А1АТ, ние стигнахме до извода, че повишени стойности на А1АТ при някои от пациентите (№3, 12, 17) са индикатор за инфламаторносъдови усложнения, тъй като този маркер се причислява по принцип към инфламаторните показатели. В контекста на цялата информация от литературната справка и нашите резултати, считаме че установените от нас по-ниски средностатистически за таргентната група нива на А1АТ $\bar{x} = 291.38 \text{ mg\%}$ (при А1АТ на контролна група $\bar{x} = 436.15 \text{ mg\%}$), са индикатор за повишена микроваскуларна пропускливост при пациентите с диабетна ретинопатия, тъй като при дефицит на естествените инхибитори на сериновите протеази, базалномембранните фибрилари белтъци са подложени на усилено фибринолитично разграждане, водещо до нарушен интегритет на съдовата стена.

Ние отчетохме повишени концентрации на α 1-антитрипсин само при четирима пациента с диабетна ретинопатия (22,2 %) с вероятна инфламаторна компонента. При един пациент (5,5 %) А1АТ е в референтни граници. По отношение анализирания маркер за НЕГ, серумните концентрации на фруктозамин показват тенденция за по-високи стойности на неензимно гликиране при таргентната група пациенти с диабетна ретинопатия, в сравнение с реф. граници. Концентрациите на ФА са повишени при 10 от изследваните пациенти (55,5 %), понижени при двама (11,1 %) и в референтни граници при петима (27,7 %). Статистическият анализ доказва корелационна зависимост между понижените стойности на А1АТ и високите нива на фруктозамин при изследваните пациенти с диабетна ретинопатия $p < 0.05$. Все пак таргентната група включва ограничен брой

пациенти ($n = 18$) и статистическата достоверност би следвало да се потвърди при бъдещи проучвания.

При стартиране на настоящото проучване, ние предполагахме наличието на повишени нива на неензимно гликирани белтъци при пациентите с микроваскуларни усложнения, тъй като НЕГ представлява риск от дегенеративни увреждания на съдовата мембрана. Нямаше яснота какви са нивата на протеазните инхибитори (A1AT) при тези пациенти. Получените от нас данни за корелация между високата степен на неензимно гликиране на серумните белтъци (ФА) и понижените концентрации на A1AT при пациенти с диабетна ретинопатия, налагат извода за утежняващи фактори по отношение късни усложнения на захарния диабет. Тази взаимовръзка е от особено значение за прогнозата на заболяването.

Нееднозначната патогенетична роля на сериновите протеазни инхибитори при съводегенеративните процеси на захарния диабет би могла да се търси както в генетични модели, така също в степента на неензимно гликиране на белтъците при хипергликемични състояния или съпътстващи инфламаторни състояния. Тъй като процесът на НЕГ засяга предимно лизиновите остатъци на A1AT, а те са във функционално активните участъци на молекулата, би следвало да се очаква повишена ензимна активност на еластазата и други протеолитични ензими при пациенти с продължителна хипергликемия и по-ниски концентрации на СЕРПИНИ.

Изводи: Резултатите от нашето проучване за показателите на НЕГ и СЕРПИНИ показват тенденция за повишени концентрации на ФА и понижени на A1AT. При съпоставка на нашите резултати с литературните данни, можем да направим извода, че пациенти с високи нива на ФА и ниски на A1AT, са застрашени в по-голяма степен от неоваскуларизация и фиброзиране.

Анализът на взаимовръзката между неензимното гликиране на белтъците и инхибиторите на сериновите протеази показва, че нарушеният баланс протеази/антипротеази в полза на неконтролирана активност на неутрофилните лизозомални протеази (ниски конц. на $\alpha 1$ -AT), допринася за развитие на микроваскуларните усложнения при ЗД, в степен съпоставима с неензимното гликиране на белтъците.

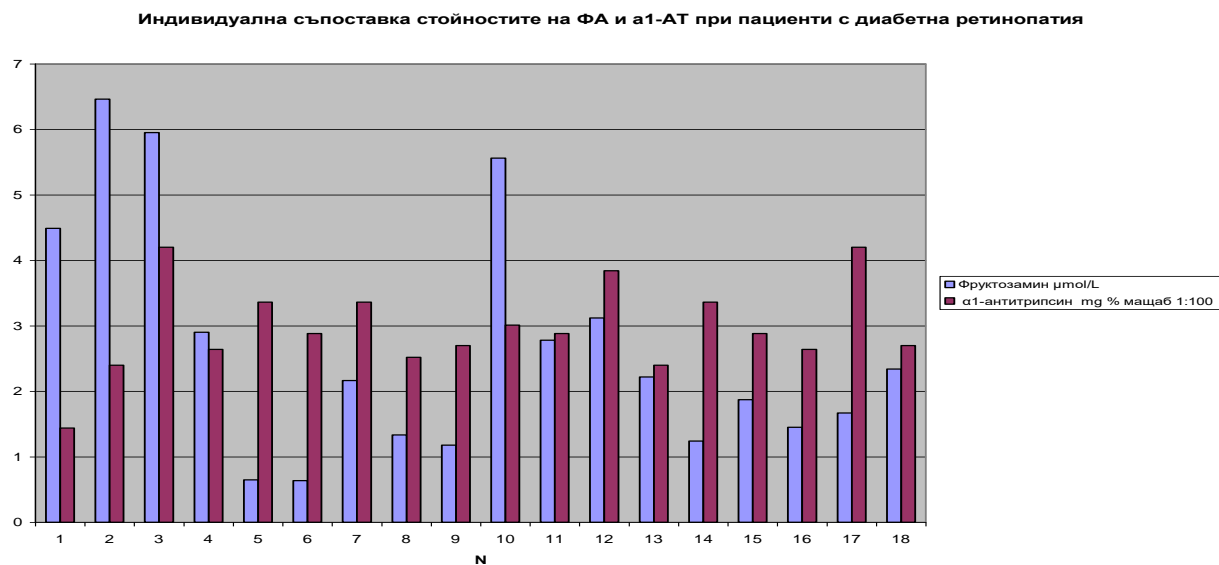
Изследването на показателите $\alpha 1$ -антитрипсин и фруктозамин в клинично-лабораторната практика би допринесло за по-комплексното интерпретиране метаболитния статус при пациенти със захарен диабет.

Табл. № 5. **ФА и α_1 АТ** при пациенти с диабетна ретинопатия

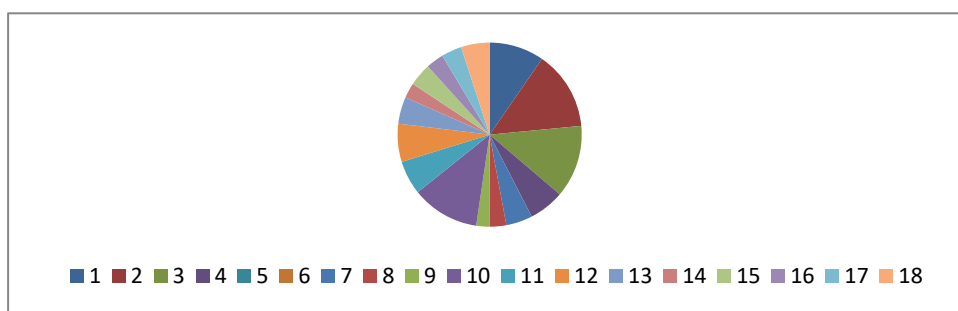
№	Пол	Възраст (год.)	ФА $\mu\text{mol/L}$	α -1-АТ $\text{mg}\%$
1	м	64	4.490	44.43
2	ж	58	6.460	240.27
3	ж	48	5.950	420.19
4	м	62	2.900	264.58
5	м	53	0.649	336.18
6	м	49	0.635	288.19
7	ж	66	2.165	336.27
8	ж	64	1.335	252.22
9	м	60	1.177	270.00
10	м	51	5.560	301.04
11	ж	38	2.780	288.00
12	ж	46	3.120	384.40
13	м	62	2.220	240.12
14	ж	75	1.240	336.21
15	ж	77	1.870	288.18
16	м	80	1.450	264.46
17	ж	70	1.670	420.00
18	ж	61	2.340	270.10
\bar{x}		56.6	2.667	291.38

Табл. № 6. **ФА и α_1 АТ** - контролна група

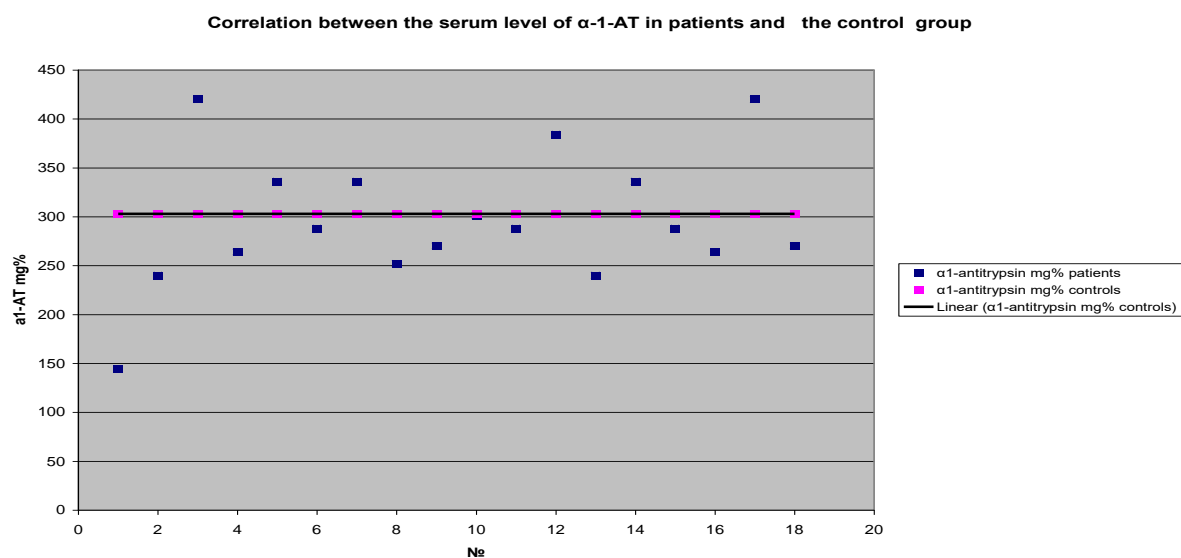
№	Пол	Възраст ГОД.	α -1-АТ $\text{mg}\%$	№	Пол	Възраст ГОД.	α -1-АТ $\text{mg}\%$
1	м	42	325.80	11	ж	55	275.20
2	м	60	325.22	12	м	42	240.44
3	м	50	325.44	13	ж	58	350.54
4	ж	53	325.64	14	м	47	300.30
5	ж	54	325.28	15	м	42	260.36
6	ж	56	440.88	16	ж	52	260.28
7	м	48	310.66	17	ж	62	275.22
8	ж	45	270.40	18	ж	48	290.42
9	м	56	300.20	19	ж	38	280.88
10	ж	36	325.20	20	ж	28	260.60
				\bar{x}		51.6	436.15



Фиг. № 9а. ФА $\mu\text{mol/L}$ и А1АТ $\text{mg}\%$ при пациенти с диабетна ретинопатия ($n = 18$)



Фиг. № 9.б. Разпределение на ФА $\mu\text{mol/L}$ при таргентна група пациенти с диабетна ретинопатия ($n = 18$)



Фиг. № 10. α 1АТ $\text{mg}\%$ пациенти с диабетна ретинопатия ($n=18$); контр. група ($n = 20$)

Относно задача № 5. Изследване инхибиторния ефект на Ацетилсалицилова киселина, Витамин В₆ и Коензим Q₁₀ върху НЕГ in vitro, опитни животни, здрави доброволци и пациенти със захарен диабет.

5. 1. Инхибиране процеса на НЕГ на белтъците чрез Ацетилсалицилова киселина. Ацетилсалициловата киселина (АСК) е тествана като инхибитор на НЕГ въз основа способността на алдехидната й група да образува киселинно-амидни връзки, т.е. да конкурира глюкозата за местата на свързване в полипептидните вериги. Khatami M. провокира интереса към АСК, доказвайки in vitro, че дори и в ниски концентрации АСК може да конкурира глюкозата в процеса на НЕГ. До момента на настоящите изследвания липсват комплексни данни за повлияване степента на НЕГ от ацетилсалицилова киселина в терапевтични дози при опитни животни и пациенти със ЗД. Отговор на този въпрос се опитва да даде нашето комплексно проучване in vitro, опитни животни и клинично изследване на пациенти със ЗД.

А) Експеримент in vitro: С цел определяне концентрациите на ФА и влиянието на АСК върху НЕГ, in vitro са инкубирани албуминум бовинум, D-глюкоза и АСК в серии с покачващи дози на инхибиторната субстанция (Табл. № 7). За анализиране ефекта на АСК като инхибиторен агент по отношение неензимното гликиране на серумния албумин, резултатите от пробните серии са сравнени с контролните, в които отсъства медикамент. Методично за определяне концентрациите на гликиран серумен албумин е използван колориметричния метод с NBT. Анализът е осъществена чрез десетократно повторение на всяка серия. Инкубирането на реакционната смес в 0.1 М фосфатен буфер с рН = 7.4 при T = 37° C в сух термостат за 7 дни с натриев азид за предотвратяване растеж на патогенна микрофлора.

Табл. № 7. Инхибиторен ефект на АСК върху НЕГ in vitro - експериментална постановка

<i>Проба</i>	<i>Контрола</i>
<u>1^{-ва} серия</u>	
Албуминум бовинум (Sigma) – 60 g/L	Албуминум бовинум (Sigma) – 60 g/L
D-глюкоза (Merck) – 30 mM/L	D-глюкоза (Merck) – 30mM/L
АСК – 3.3 mM/L	-
NaN ₃ – 0.05%	NaN ₃ – 0.05%
<u>2^{-ра} серия</u>	
Албуминум бовинум (Sigma) – 60 g/L	Албуминум бовинум (Sigma) – 60 g/L

D-глюкоза (Merck) – 30 mM/L	D-глюкоза (Merck) – 30mM/L
АСК – 6.6 mM/L	-
NaN ₃ – 0.05%	NaN ₃ – 0.05%
<u>3^{-та} серия</u>	
Албуминум бовинум (Sigma) – 60 g/L	Албуминум бовинум (Sigma) – 60 g/L
D-глюкоза (Merck) – 30 mM/L	D-глюкоза (Merck) – 30mM/L
АСК – 10 mM/L	-
NaN ₃ – 0.05%	NaN ₃ – 0.05%
<u>4^{-та} серия</u>	
Албуминум бовинум (Sigma) – 60 g/L	Албуминум бовинум (Sigma) – 60 g/L
D-глюкоза (Merck) – 30 mM/L	D-глюкоза (Merck) – 30mM/L
АСК – 20 mM/L	-
NaN ₃ – 0.05%	NaN ₃ – 0,05%
<u>5^{-та} серия</u>	
Албуминум бовинум (Sigma) – 60 g/L	Албуминум бовинум (Sigma) – 60 g/L
D-глюкоза (Merck) – 30 mM/L	D-глюкоза (Merck) – 30mM/L
АСК – 30 mM/L	-
NaN ₃ – 0,05%	NaN ₃ – 0.05%

Б) Инхибиторен ефект на АСК при опитни животни с експериментален ЗД.

Б.1. Остра фаза на експериментален захарен диабет при опитни животни n = 40:

а) пробна група n = 19; б) контролна група n = 21.

Експериментът за проследяване ефекта на АСК при опитни животни е проведен с n = 40 бели мъжки плъха порода Wistar с тегло 250-300 грама с експериментален алоксанов захарен диабет. Интраперитонеално от автора на дисертацията е инжектиран Алохан 35 mg/100g тегло. Животните са отглеждани във вивариума на МУ-Плевен при температура 22.0° +/- 2.0° C; 12 ч.:12 ч. светъл/ тъмен цикъл и свободен достъп до храна и вода. За целите на проучването животните са декапитирани чрез декапитиране. От каротидната вена е взимана по 2.0 мл кръв за изследване показателите на метаболитния контрол. Опитните животни са разделени в две групи: а) Пробантната група включва n = 19 опитни животни, разделени в три серии, като на всяка серия е въвеждан със стомашна сонда Aspirin (Bayer) в дози

25мг/кг; 50мг/кг и 75мг/кг в продължение на 14 дни ежедневно от сътрудниците по проекта от Катедра „Клинична и експериментална фармакология“ МУ-Плевен.

б) Контролна група $n = 21$ мъжки плъха с алоксанов захарен диабет, без прием на медикамента Aspirin (Bayer). С цел анализиране степента на неензимно гликиране на белтъците при хипергликемични състояния и ефекта на АСК, опитните животни са декапитирани, в кръвния серум са изследвани следните показатели: серумна глюкоза (глюкозооксидазен метод), общ белтък (Биуретов метод), фруктозамин (колориметричен метод NBT), HbA_{1c} (колориметричен метод с 2-ТБК).

Б.2. Хронична фаза на експериментален ЗД (заложени $n = 40$; преживяли $n = 12$).

Първоначалната експериментална постановка включва 40 мъжки плъха, порода „Wistar“ с тегло 250-300 грама с алоксанов захарен диабет. Поради високата леталност на опитните животни от токсичния хипергликемичен ефект и този на алоксана, в края на анализирания 3-месечен период, беше възможно проследяването на 12 опитни животни - мъжки плъхове порода „Wistar“ с тегло 250-300 грама с алоксанов захарен диабет (Aloxan 35 mg/100g тегло, интраперитонеално). Опитните животни са разделени на две групи: а) пробна $n = 6$ и б) контролна $n = 6$. Пробната група включва две подсерии с различна концентрация на тествания медикамент. Първа серия животни е третирана с Aspirin (Bayer) 100 mg/kg, въвеждан чрез стомашна сонда, в продължение на 1 месец ежедневно. Дозировката на Aspirin за втора серия опитни животни е 75 mg/kg, въвеждан чрез стомашна сонда, в продължение на 1 месец ежедневно. Инхибиторният ефект на АСК върху процеса на НЕГ е анализиран чрез проследяване интраиндивидуалната динамика на гликирания серумен албумин (ФА) и гликирания хемоглобин (HbA_{1c}) в рамките на анализирания период на 1^{-ви} и 90^{-ти} ден от експеримента. Настоящото проучване е проведено с партньорството на Катедра „Клинична фармакология“ МУ-Плевен.

В) Клинична студия за анализиране инхибиторния ефект на АСК върху НЕГ. С цел проследяване ефекта на АСК върху степента на НЕГ, са изследвани седем пациента със захарен диабет тип 2 ($n = 7$), мъже и жени на възраст от 30 до 60 год. хоспитализирани в Катедра Пропедевтика на вътрешните болести, МУ-Плевен. Освен стандартната терапия по утвърдени клинични алгоритми, пациентите приемат и Aspirin (Bayer) 20 mg/kg ежедневно в продължение на 3 седмици. За целите на проучването е вземана 2 мл венозна кръв на гладно на 1^{-ви} и 21^{-ви} ден от

проучването. За анализиране интраиндивидуалната динамика на НЕГ, са изследвани ФА чрез колориметричен метод с NBT и HbA_{1c} чрез колориметричен метод с 2-ТБК. Резултатите от нашето проучване за инхибиторния ефект на Ацетилсалициловата киселина върху неензимното гликиране на белтъците *in vitro* са представени на Табл. № 8 (\bar{x} за сериите са изчислени при 10-кратни измервания).

Табл. № 8. Средностатистически стойности на ФА: Инхибиторен ефект на АСК *in vitro*

Експериментални серии	Проби \bar{x} ФА $\mu\text{mol/L}$	Контроли \bar{x} ФА $\mu\text{mol/L}$
1 ^{-ва}	2.155	2.155
2 ^{-ра}	1.716	2.555
3 ^{-та}	1.556	2.120
4 ^{-та}	1.716	1.956
5 ^{-та}	1.616	1.956
\bar{x} (всички серии)	1.752	2.148

Б.1.) На Табл. № 9. са представени резултати от проучване инхибиторния ефект на АСК върху НЕГ при опитни животни с алоксанов захарен диабет – *остра фаза*

Табл. № 9.І. Група: Алохан 33 mg/kg - ASA 25 mg/kg

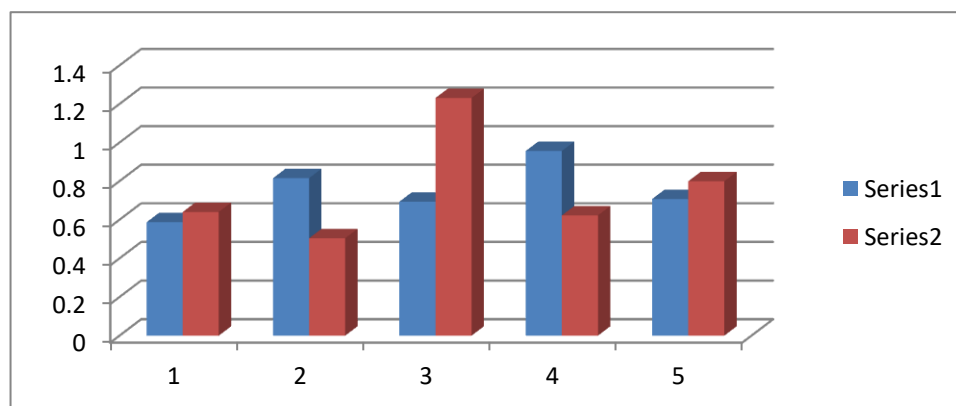
Показател	Глю mmol /L		ФА $\mu\text{mol/L}$		ОБ g/L		HbA ₁ %		Hb g/L	
	Проба	Контр	Проба	Контр.	Проба	Контр.	Проба	Контр	Проба	Контр
№ Опитни жив.↓										
1	12.50	74.80	0.406	0.213	86.24	102.49	3.50	7.00	200.2	202.2
2	6.29	14.90	0.567	-	88.74	77.49	4.50	3.50	152.1	210.1
3	29.92	16.50	0.507	0.601	94.99	87.50	3.80	2.90	166.5	230.3
4	16.92	53.50	0.504	0.469	82.49	88.74	4.50	4.50	140.7	236.3
5	16.92	40.10	0.963	0.994	88.74	83.74	4.90	3.50	140.1	186.1
\bar{x}	<i>18.63</i>	<i>40.90</i>	0.737	0.569	<i>88.24</i>	<i>87.99</i>	4.20	4.30	<i>159.9</i>	<i>213.0</i>

II група : Aloxan 40 mg/kg - ASA 50 mg/kg

Показател	Глюкоза mmol /L		ФА $\mu\text{mol/L}$		ОБ g/L		HbA ₁ %		Hb g/L	
	Проба	Контр	Проба	Контр.	Проба	Контр	Проба	Контр	Проба	Контр
1	3.20	7.80	0.587	0.640	89.31	88.10	5.83	4.08	196.4	54.00
2	4.20	11.00	0.815	0.504	96.55	85.69	6.41	5.83	248.3	74.20
3	6.00	38.40	0.693	1.231	82.07	94.14	5.83	5.25	230.2	90.10
4	3.60	9.00	0.956	0.622	86.89	80.86	5.25	5.60	200.1	61.90
5	3.00	7.60	0.707	0.799	98.96	82.07	5.83	6.06	204.2	94.80
\bar{x}	<i>4.16</i>	<i>14.76</i>	<i>0.752</i>	<i>0.761</i>	<i>90.75</i>	<i>86.17</i>	<i>5.83</i>	<i>5.36</i>	<i>180.2</i>	<i>75.00</i>

III група : Aloxan 40 mg/kg - ASA 75 mg/kg

Пок.	Глюкоза mmol /L		ФА $\mu\text{mol/L}$		ОБ g/L		HbA ₁ %		Hb g/L	
	Проба	Контр.	Проба	Контр.	Проба	Контр	Проба	Контр	Проба	Контр
1	3.94	3.41	0.873	0.873	86.89	86.89	5.90	5.90	134.10	134.00
2	3.24	2.53	0.602	0.602	98.96	98.96	4.00	4.00	138.20	138.00
3	1.65	5.88	0.506	0.506	85.69	85.69	5.50	5.50	112.20	112.90
4	5.00	3.74	0.505	0.505	96.55	96.55	4.30	4.30	126.40	126.70
\bar{x}	<i>3.450</i>	<i>3.892</i>	<i>0.621</i>	<i>0.621</i>	<i>92.020</i>	<i>92.020</i>	<i>4.912</i>	<i>4.937</i>	<i>127.7</i>	<i>127.9</i>

Фиг. № 11. ФА $\mu\text{mol/L}$: алоксанов ЗД – остър опит; серия 1- контрола, серия 2 -проба

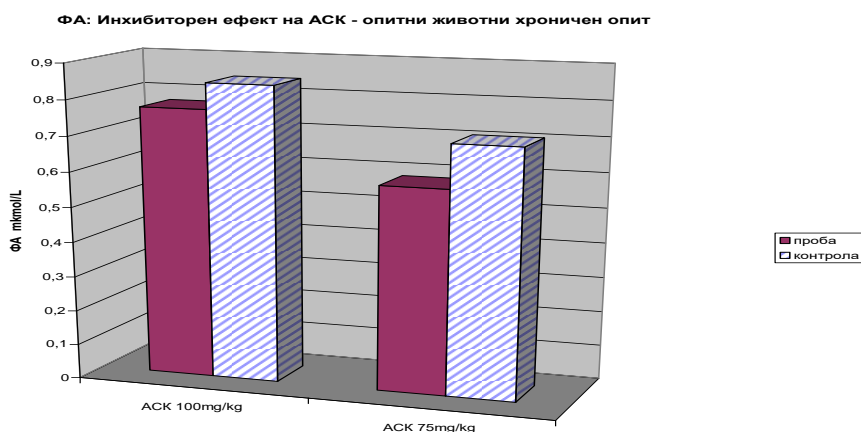
Б.2. Табл. № 10. Резултати от изследване инхибиторния ефект на АСК върху НЕГ при
опитни животни със захарен диабет - *хронична фаза*

I група - ASA 100 mg/kg

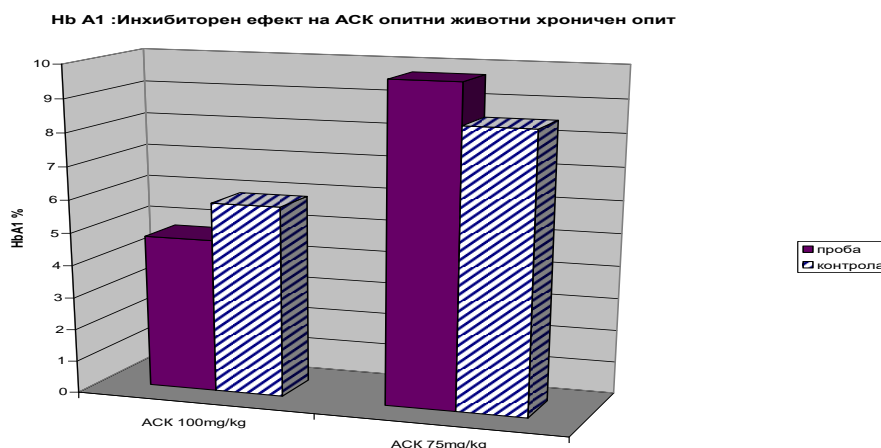
Показатели →	Глюкоза mmol /L		ФА $\mu\text{mol/L}$		ОБ g/L		HbA ₁ %		Hb g/L	
	Проба	Контр	Проба	Контр.	Проба	Контр	Проба	Контр.	Проба	Контр
1	5.61	32.32	0.858	0.894	108.33	119.99	5.50	4.90	23.00	14.60
2	5.73	11.83	0.841	0.755	108.33	111.66	4.10	5.70	21.80	12.60
3	6.09	7.56	0.615	0.882	113.33	108.33	4.60	7.00	28.60	17.60
\bar{x}	5.81	17.24	0.771	0.884	110.00	113.33	4.73	5.87	24.44	14.93

II група : ASA 75 mg/kg

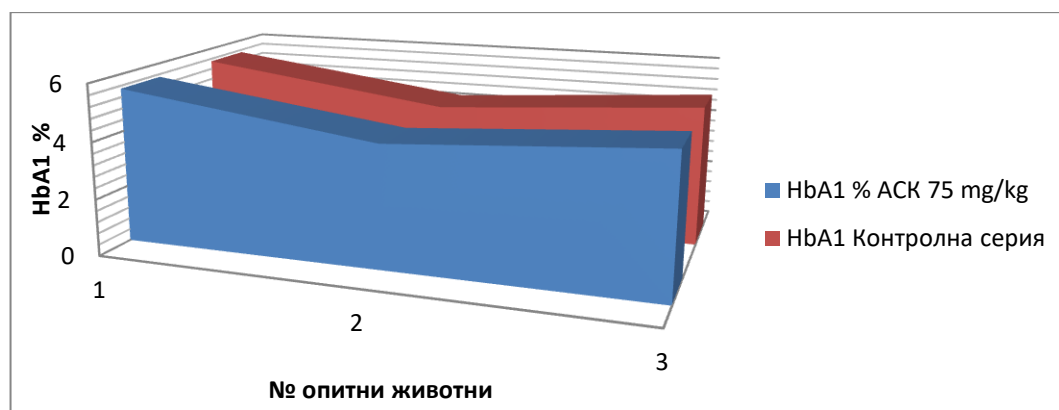
Показатели	Глюкоза mmol /L		ФА $\mu\text{mol/L}$		ОБ g/L		HbA ₁ %		Hb g/L	
	Проба	Контр	Проба	Контр.	Проба	Контр	Проба	Контр	Проба	Контр
1	5.73	7.20	0.579	0.649	84.81	88.30	9.50	8.5	12.10	6.50
2	17.44	9.60	0.549	0.852	95.59	91.54	10.50	9.5	7.70	6.90
3	8.66	9.20	0.608	0.623	80.77	91.54	9.20	7.5	10.40	9.80
\bar{x}	10.61	8.67	0.585	0.708	87.05	90.46	9.73	8.5	10.02	7.73



Фиг. № 12. ФА $\mu\text{mol/L}$: хроничен експеримент опитни животни със ЗД; АСК 100 и 75 mg/kg



Фиг. № 13. HbA_{1c}; АСК 100 mg/kg - хроничен експеримент опитни животни със ЗД



Фиг. № 14. HbA_{1c}; АСК 75 mg/kg - хроничен експеримент опитни животни със ЗД

Обсъждане на резултатите и изводи: Получените резултати от нашите изследвания показват, че АСК инхибира НЕГ на албумина *in vitro* със статистически значим ефект при АСК 10 mM ($p < 0.01$). Не се наблюдава линейна зависимост между концентрацията на АСК и степента на инхибиране процеса на неензимно гликиране на белтъците, като при концентрации на АСК 20 mM са отчетени по-високи нива на гликирания серумен албумин в сравнение със серията АСК 10 mM. Тази зависимост би могла да се обясни с ефекта на насищане с химичната субстанция и стерично пречене на молекулите при взаимодействието с NH₂-ПП на серумния албумин.

Експериментален захарен диабет при опитни животни – остра фаза: Представените резултати за концентрациите на ФА и HbA_{1c} при опитните животни с алоксанов захарен диабет остра фаза са измерени на 14^{-ия} ден от индуцираната хипергликемия при опитните животни. Данните доказват инхибиторния ефект на АСК върху НЕГ на албумина *in vivo*, при опитна постановка с приложение на Aspirin със стомашна сонда в терапевтични дози. Най-отчетливи резултати за

инхибиране неензимното гликиране на серумния албумин (ФА) се наблюдават при дозировка на Aspirin 75 mg/kg. Статистическият анализ показва сигнификантни разлики между пробантна и контролна серия ($p < 0.05$), като контролните серии опитни животни са с алоксанов захарен диабет без прием на медикамент. Степента на гликиране на хемоглобина е повлияна в по-малка степен ($HbA_{1c} p > 0.05$), поради краткия експериментален срок, сравнен с неговия полуживот. Литературната справка за ГСА при *in vitro*-инкубиране на проба кръвен серум от животни с експериментален захарен диабет в присъствие на АСК, показва резултати, аналогични на получените при настоящия експеримент.

Експериментален захарен диабет при опитни животни – хронична фаза: Анализът на резултатите при опитните животни с алоксанов захарен диабет, третирани с Aspirin в продължение на 4 седмици, показва по-ниски стойности на ФА в пробната серия опитни животни $\dot{x} = 0.771 \mu\text{mol/L}$ (серия 1) и $\dot{x} = 0.585 \mu\text{mol/L}$ (серия 2) в сравнение с контролите (опитни животни с алоксанов захарен диабет без суплементация на Aspirin), където ФА $\dot{x} = 0.844 \mu\text{mol/L}$ (1-ва серия) и ФА $\dot{x} = 0.708 \mu\text{mol/L}$ (2-ра серия). Тази тенденция се наблюдава както при дозировка на Aspirin 100 mg/kg (I група), така също и при терапевтични дози - 75 mg/kg (II група).

Инхибиторният ефект на АСК се потвърждава и от стойностите на HbA_{1c} , като пробните серии и от двете групи имат по-ниски концентрации на HbA_{1c} , сравнени с контролните. Съпоставката с острия експериментален захарен диабет показва, че степента на инхибиране неензимното гликиране на Нв от АСК при хроничния опит е по-ясно изразена. Този резултат е логичен спрямо полуживота на Нв, съвпадащ с продължителността на експерименталната постановка. Резултатите от нашите проучвания за ефекта на АСК при опитни животни с експериментален алоксанов захарен диабет в хронична фаза, имат потвърдителен характер по отношение повлияване степента на гликиране на хемоглобина.

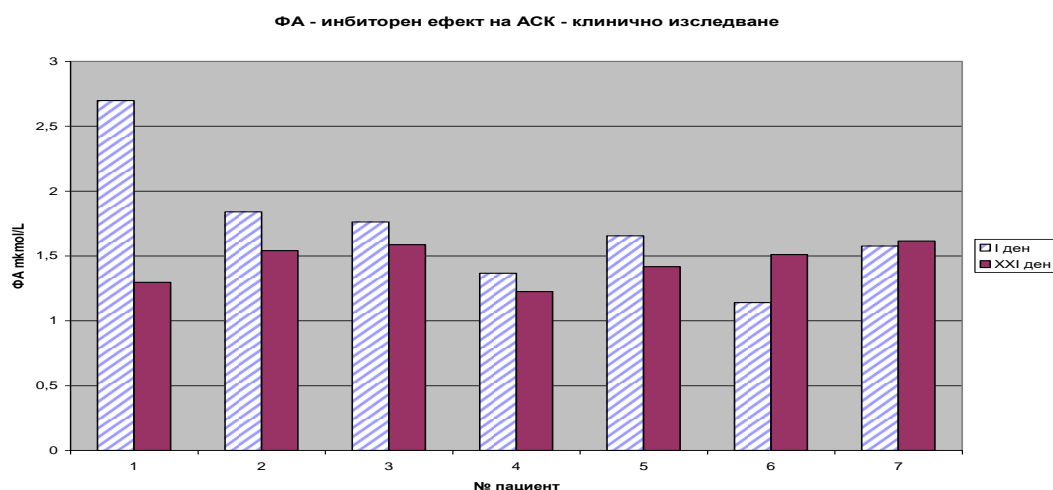
Приносен характер по отношение инхибиторния ефект на Ацетилсалициловата киселина върху процеса на неензимно гликиране имат нашите изследвания за степента на гликиране на албумина, изразени като фруктозамин, при опитната постановка в остра фаза на индуцирана хипергликемия. При краткосрочни студии изследването на ФА има по-голяма достоверност, съобразно полуживота на албумина. Статистическият анализ на резултатите показва сигнификантно значим инхибиторен ефект на АСК върху степента на гликиране на белтъците ($p < 0.05$).

Може да се направи извода, че правилният подбор на биохимичните показатели спрямо експерименталната постановка е от съществено значение, което намалява замъгляващите фактори при интерпретиране резултатите за основната идея на проучванията. Нашите резултати потвърждават необходимостта от верифициране на ретроспективната гликемия и чрез двата показателя, отразяващи степента на неензимно гликиране на белтъците - HbA_{1c} и ФА. Изследването само на гликирания хемоглобин, в острия опит не би дало обективна информация за процеса на НЕГ и обратно – изследването само на фруктозамина при хроничния опит не би отразило достатъчно достоверно инхибиторния ефект на АСК. Изследвани са и серумните глюкозни концентрации. Наблюдава се тенденция за по-ниски стойности в пробните серии животни със захарен диабет, третирани с АСК в сравнение с контролите – плъхове с алоксанов диабет без прием на тествания медикамент. Тези резултати потвърждават хипогликемизиращ ефект на АСК, но същевременно с това поставят въпроса дали понижените нива на серумна глюкоза не детерминират и по-ниските стойности на гликираните белтъци в пробните серии, или това се дължи на инхибиторния ефект на АСК върху Майлард-реакцията. Отговор на този въпрос не биха могли да ни дадат средностатистическите данни за ФА и HbA_{1c}. Анализ на взаимовръзката между серумната глюкоза, концентрацията на АСК и степента на гликиране на белтъците, би могъл да се направи при интраиндивидуално сравнение на тези показатели. Такава съпоставка показва, че корелация между степента на гликиране на белтъците и серумната глюкоза при опитните животни съществува. Т.е. наблюдаваният ефект за понижаване степента на гликиране на белтъците в присъствие на АСК, би могъл да се дължи не само на инхибиторните свойства спрямо НЕГ. Тъй като при експеримента *in vitro* отсъства ефекта за утилизирание на глюкозата в тъканите, а нашите резултати показват по-ниски стойности на ФА в присъствие на АСК, следва да се направи извода, че именно чрез конкурентно инхибиране на НЕГ се постига наблюдавания ефект за намаляване степента на неензимно гликиране на белтъците.

В.) Резултатите от клинична студия с АСК са представени на Фиг.№15 и Табл. №11. Проследена е интраиндивидуалната динамика на серумната глюкоза и неензимното гликиране на белтъците при пациенти със захарен диабет тип 2. Изследвани са гликиран албумин и гликиран хемоглобин на 1^{-ви} ден от приемането на АСК-съдържащ медикамент и на 21^{-ви} ден от студията.

Табл. № 11. Пациенти със ЗД тип 2: влияние на АСК в/у конц. на ФА и HbA_{1c}

№	ФА $\mu\text{mol/L}$		HbA _{1c} %		Сер. глю mmol/L		ОБ g/L		Hb %	
	1-ви ден	21-ви ден	1-ви ден	21-ви ден	1-ви ден	21-ви ден	1-ви ден	21-ви ден	1-ви ден	21-ви ден
1	2.697	1.296	16.12	15.80	15.54	11.60	70.92	88.66	118.00	120.00
2	1.840	1.540	9.71	10.81	7.50	11.50	91.72	79.99	102.30	102.30
3	1.762	1.586	7.93	11.22	9.37	10.20	94.13	61.25	116.00	116.40
4	1.365	1.225	9.74	13.72	13.22	9.56	91.24	91.24	71.00	70.50
5	1.655	1.417	13.61	13.71	10.00	10.96	95.71	83.74	73.00	78.30
6	1.140	1.510	9.56	9.24	12.20	18.40	88.57	90.87	94.70	95.10
7	1.577	1.614	12.63	12.55	19.90	20.00	79.18	83.50	85.70	88.10
\bar{x}	1.494	1.455	11.33	12.40	12.53	13.17	87.35	82.75	94.38	5.81

Фиг. № 15. АСК: ФА $\mu\text{mol/L}$; клинична студия при пациенти със захарен диабет тип 2

Обсъждане и изводи: Резултатите от клиничното изследване показват, че при 58% от пациентите със захарен диабет тип 2, приемали фармацевтичния препарат, съдържащ АСК, серумните концентрации на фруктозамина са по-ниски в сравнение с изходните стойности. Въпреки ограничения брой пациенти в клиничната студия, се наблюдава тенденция АСК да инхибира НЕГ на белтъците - интраиндивидуалната динамика отчита по-ниски стойности на ФА при пробантите след прием на АСК, в сравнение с изходните сер. концентрации на фруктозамина.

Комплексните изводи от трите нива на проучване инхибиторния ефект на АСК върху степента на неензимно гликиране на белтъците (in vitro, опитни

животни и пациенти със захарен диабет) показват статистически значимо понижаване степента на неензимно гликиране на серумния албумин и гликирания хемоглобин в присъствие на тествания медикамент. Някои от нашите опитни пастановки и резултати имат потвърдителен характер, а комплексното тристепенно проследяване медикаментозното инхибиране на серумния албумин, отразено чрез стойностите на ФА, има приносен характер. Интерпретирането на резултатите за понижаване на ФА в присъствие на АСК, съпоставено с литературната справка за механизмите на действие на АСК, ни дават основание да заключим, че въз основа инхибиторния ефект на АСК, е показан за приложение в профилактиката на микро- и макроваскуларните усложнения на захарния диабет. Нашите изследвания и данните от литературния обзор налагат извода, че АСК инхибира значимо процеса на неензимно гликиране и може да бъде включена в схемите за профилактика късните усложнения на захарния диабет при пациенти, които нямат противопоказания.

5.2. Относно инхибиране процеса на НЕГ на белтъците чрез Aminoguanidine (AG)

Литературните данни за повлияване процеса на неензимно гликиране на белтъците чрез Aminoguanidine, както и действието му върху ензима NOS с особено важно значение за хиперактивните ендотелни клетки при микроваскуларните усложнения на ЗД, провокираха нашия интерес за тестване инхибиторния ефект на аминогуанидина върху неензимното гликиране на белтъците.

Материал и методи: In vitro в продължение на 10 дни във фосфатен буфер с рН = 7.4 при 37° C в сух термостат са инкубирани: 40 g/L Хумансерумалбумин (Sigma); 20 mmol/L D-глюкоза (Merck); 20 Mmol/L Аминогуанидин (AG); 0.1% NaN₃. От реакционата смес са вземани по 250 µl на 1^{-ви}, 3^{-ти}, 6^{-ти} и 10^{-ти} ден и са диализирани за 48 ч. при 4° C. Диализираната проба е използвана за афинитетно-хроматографско определяне на гликирания албумин (Pierce). Проучването е проведено в Клинична фармакология, Франкфурт на Майн, Германия.

Резултати и обсъждане: Резултатите от нашето изследване за инхибиторния ефект на Аминогуанидин in vitro са представени на Табл. № 16 и Фиг. № 35. Експерименталната серията с Humanserumalbumin без инхибиращ агент и без глюкоза - I серия контрола а. показва на 1^{-ви} ден референтна степен на гликиране на серумния албумин от 10.1 % (отговоряща на фирмените данни на Sigma), което доказва надеждността на използвания метод за изследване на GSA чрез афинитетна хроматография Pierce. В последващите дни (3^{-ти}, 6^{-ти} и 10^{-ти}) степента на гликиране

на албумина намалява, макар и незначително, което индикира възможността за обратима реакция - фруктозелизинът да освободи част от неензимно свързаните глюкозни молекули към албумина в отсъствие на суплементиране с глюкоза. Резултатите от експериментална серия II контрола б. (Humanserumalbumin + Dglucose), показват линейно повишаване степента на гликиране на серумния албумин при инкубиране с глюкоза 20 mmol/L, като \bar{x} GSA% за 1^{-ви} ден е 10.10 % , за 3^{-ти} ден - 28.80 % , за 6^{-ти} ден - 32.00 % и за 10^{-ти} ден – 42.60 % . Обсъждането на тези резултати е нееднозначно, тъй като повечето автори считат максимална степен на гликиране на протеините при инкубиране с монозахари от 3-ти до 6-ти ден. Ние отдаваме линейното прогресивно покачване степента на гликиране на серумния албумин до 10-ти ден на чистотата на използваните субстанции, което протектира серумния албумин от реакционни примеси и интерфериращи фактори.

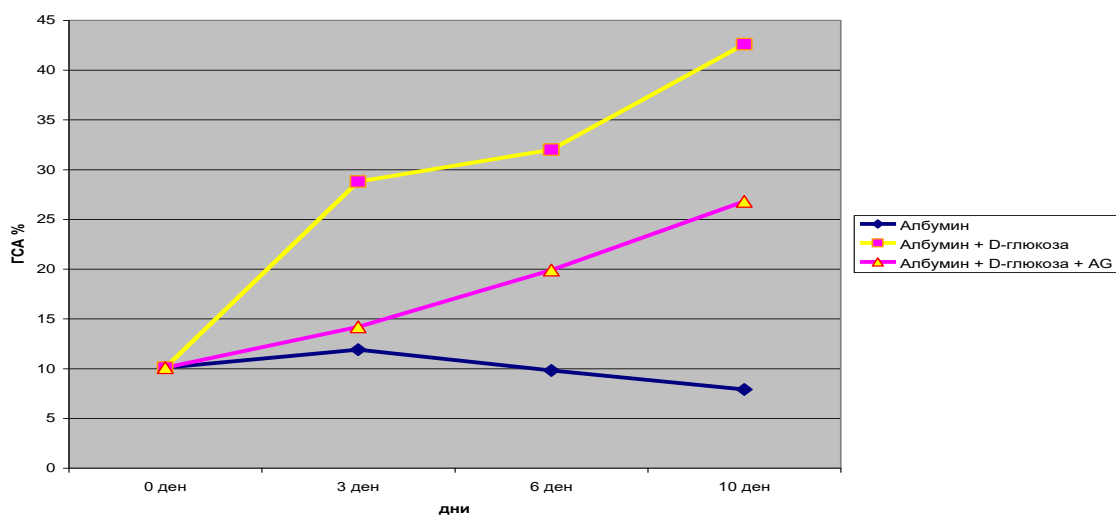
Резултатите за инхибиторния ефект на Аминогуанидин за експериментална серия III проба (Humanserumalbumin + D glucose +AG) са: GSA% за 1^{-ви} ден \bar{x} = 10.10 % , 3^{-ти} ден \bar{x} = 14.20% , за 6^{-ти} ден \bar{x} = 19.90% и за 10^{-ти} ден \bar{x} = 26.80%. Нашите резултати потвърждават инхибиторния ефект на Аминогуанидин по отношение НЕГ на серумния албумин. Най-отчетливо този ефект е изразен на 3^{-ти} ден от инкубиране на реакционната смес. Средностатистическата стойност на GSA за пробната серия (албумин + глюкоза + AG) е \bar{x} = 28.8 % , т.е. двукратно по-ниско в сравнение с контролата (албумин + глюкоза), където GSA \bar{x} = 14.2 % .

Табл. № 12. GSA% - нхибиторен ефект на Аминогуанидин (AG) in vitro

Експериментални серии	№	GSA%	GSA%	GSA%	GSA%
		1-ви ден	3-ти ден	6-ти ден	10-ти ден
I. Контрола А. Humanserumalbumin	1	10.10	10.43	10.42	7.90
	2	10.10	10.76	9.42	7.85
	3	10.10	10.25	9.56	7.55
	4	10.00	10.16	10.24	7.55
	5	10.00	10.50	10.24	8.00
	6	10.10	10.29	9.10	7.65
	7	10.10	10.84	10.55	7.95
	8	10.10	10.20	9.64	7.80
	9	10.10	10.35	10.15	7.70
	10	10.10	10.73	9.40	8.25
	\bar{x}	10.10	10.43	9.88	7.95
II. Контрола Б: Humanserumalbumin + D glucose (проба)	1	10.10	27.60	32.48	42.03
	2	10.10	29.00	31.08	42.60
	3	10.10	28.72	32.55	42.64

	4	10.00	28.94	32.43	42.70
	5	10.00	29.42	32.07	43.00
	6	10.10	28.89	32.45	41.98
	7	10.10	27.64	32.98	42.60
	8	10.10	28.50	32.60	42.55
	9	10.10	28.49	32.02	42.60
	10	10.10	26.80	32.40	42.00
	\bar{x}	10.10	28.80	32.00	42.60
III. Проба: Humanserumalbumin + D glucose + AG	1	10.10	14.02	20.00	26.60
	2	10.10	14.02	19.60	26.80
	3	10.10	14.60	19.70	27.00
	4	10.00	13.90	20.06	26.50
	5	10.00	14.80	19.90	27.10
	6	10.10	14.00	19.80	26.80
	7	10.10	14.00	19.90	26.80
	8	10.10	14.20	19.00	26.80
	9	10.10	14.40	19.85	26.80
	10	10.10	14.60	19.30	26.14
	\bar{x}	10.10	14.20	19.90	26.80

НЕГ - ГСА %: Ефект на Aminoguanidine in vitro



Фиг. № 16. ГСА % - инхибиторен ефект на AG – експеримент in vitro

Изводи: Нашите изследвания имат потвърдителен характер по отношение инхибиторния ефект на AG върху неензимното гликиране на белтъците in vitro. Тези проучвания не бяха продължени в клинични студии, тъй като данни от научната литература доказаха нежелани странични действие на Aminoguanidine.

5.3. Относно инхибиране на НЕГ на белтъците чрез Витамин В₆. Витамин В₆ е тестван като инхибитор на НЕГ на белтъците, въз основа на химичната структурна формула на пиридоксал/фосфата (PALP). Алдехидната група на PALP

би могла да конкурира алдохексозите за местата на свързване при аминокрупите в полипептидните внериги в реакцията на Майлард (Фиг. № 17). Литературните данни показват, че PALP (доминиращия в плазмата витаминер на Витамин В₆) може да инхибира НЕГ на белтъците при експеримент *in vitro* в еквимоларни съотношения на реагиращите субстанции. В клиничната практика Витамин В₆ е прилаган при лечение на диабетни полиневропатии въз основа познатите в биохимията свойства на пиридоксалфосфата като кофактор на ензимите от обмяна на аминокеселините с важна значение за невробиохимията. Експериментални изследвания за влиянието на високи дози Витамин В₆ върху сензорната невропроводимост при диабетни плъхове показва клинично подобрене, регистрирано чрез патофизиологични тестове като инфрачервена термография. Тези данни са публикувани от изследователски екип на Клиниката по клинична фармакология, Франкфурт на Майн, където по-късно ние осъществихме съвместно проучване за повлияване процеса на неензимно гликиране на белтъците чрез Витамин В₆ - съдържащи медикаменти. Проучването си поставя за *цел* да бъде изследван инхибиторния ефект на Витамин В₆ върху НЕГ *in vitro* и при здрави доброволци. Материал и методи: А) *In vitro* са инкубирани: 40 g/L Human serum albumin /Sigma/; 20 mM D-glucose /Merck/; 1 mM Pyridoxalphosphate (PAL) /Sigma/ в 0.1 mM фосфатен буфер с рН= 7.4 при Т = 37° С в сух термостат за 10 дни + NaN₃ 0.05%. Степента на гликиране на серумния албумин (ГСА%) е определена чрез афинитетна хроматография (Glycogel Kit Pierce).

Б) Клинична студия със здрави пробанти. В открито моноцентрично пилотно проучване за ефекта на Витамин В₆ върху неензимното гликиране на белтъците са включени n = 8 здрави доброволци. В продължение на 4 седмици пробантите приемат Витамин В₆-съдържащи перорални медикаменти, доза 400 mg/24h (1 драже В₆ Vicotral forte /Heyl/, съдържащо 300 mg Витамин В₆ и 1 драже Benadon /Roche/ със съдържание на Витамин В₆ 100 mg). За целите на студията са изследвани следните биохимични показатели: GSA% - колонна афинитетна хроматография /Pierce/; HbA_{1c} – йонообменна хроматография /Bio-Rad/; HbA_{1c} – йонообменна хроматография /Bio-Rad/; Серумна глюкоза – глюкозооксидзен тест /Merck/; PALP и PAL – HPLC /Watters, Hitachi/. *Резултати и обсъждане:* Резултатите от експеримента за инхибиторните свойства на Вит. В₆ върху НЕГ *in vitro* са представени на Фиг. № 17 и Табл. №13. Нашите изследвания *in vitro* показват понижаване степента на гликиране на серумния албумин в присъствие на инхибиращия агент Витамин В₆, най-ясно изразено на 6-^{ти} ден от инкубирането.

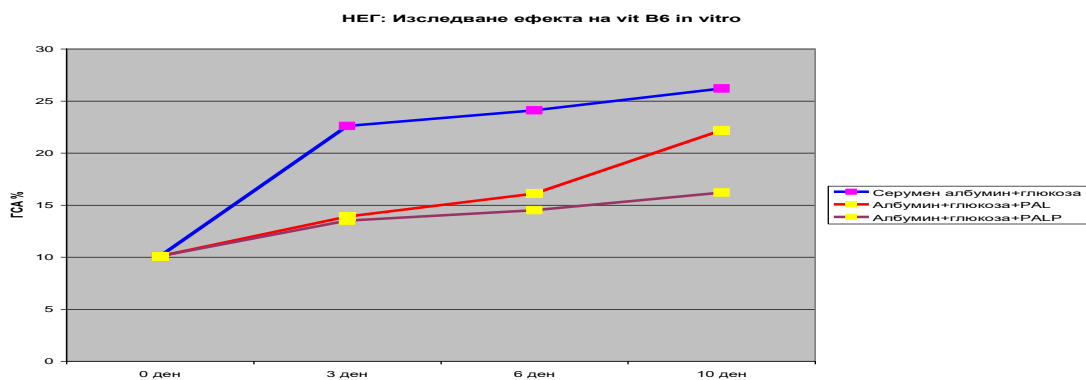
Инхибиторният ефект за PALP е средно с 36%, а за PAL – с 40%, отнесени спрямо контролната серия без медикамент. Променената зависимост през следващите дни се обяснява с изчерпване концентрацията на фармацевтичните препарати в реакционните смеси. Литературните данни за *in vitro* инхибиране с PALP показват, че инхибиторен ефект върху НЕГ се наблюдава при по-високи концентрации на Витамин В₆, или при еквимоларни съотношения с глюкозата.

Нашите резултати показват, че витамин В₆ инхибира НЕГ на белтъците *in vitro*, дори при концентрации 20-кратно по-ниски от тези на глюкозата. Едно от обясненията за това е използването на прецизни и високочувствителни методи за детекция степента на неензимно гликиране на белтъците (йонообменна афинитетна хроматография и HPLC), които бяха приложени за изследване на гликиран серумен албумин и гликиран хемоглобин при настоящото проучване в Катедрата по Клинична фармакология, Франкфурт на Майн, Германия. Установените инхибиторни свойства на PALP по отношение неензимното гликиране на белтъците *in vitro* дават основание за провеждане на следващ етап от проучване ефекта на Вит В₆ върху НЕГ - клинична студия със здрави доброволци, приемащи Витамин В₆ в продължение на 1 месец. Резултатите за концентрациите на GSA%, HbA_{1c}% и PAL/P ng/ml при пилотната студия със здрави доброволци са представени на Фиг. № 17, 18, 19 и Табл. № 13а и 3б. Интраиндивидуалната динамика на GSA% и HbA_{1c}% е проследена на 1^{-ви}, 13^{-ти} и 28^{-ми} ден от приема на тествания медикамент.

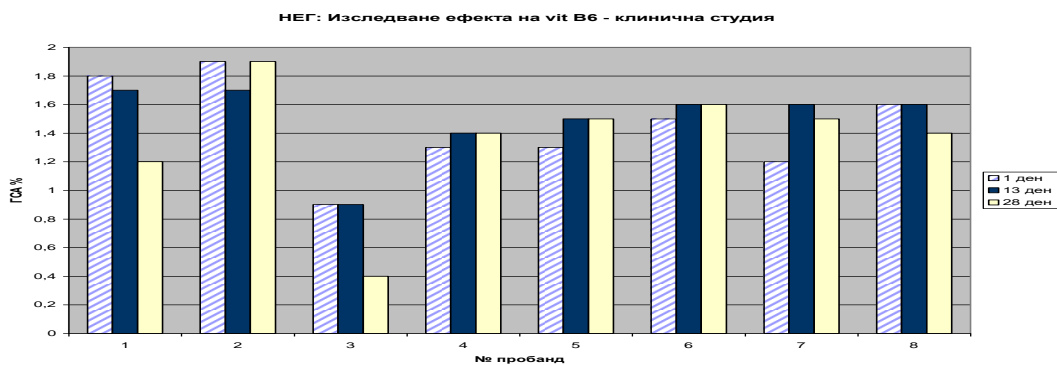
Табл. № 13. GSA%: Изследване ефекта на PAL върху НЕГ на албумин *in vitro*

Опитни серии №	GSA% 1 ^{-ви} ден	GSA% 3 ^{-ти} ден	GSA% 6 ^{-ти} ден	GSA% 10 ^{-ти} ден
I. Проба: Humanserumalbumin + D glucose + PAL				
1	10.10	14.00	16.00	22.20
2	10.10	13.80	16.00	22.00
3	10.10	13.90	16.40	22.60
4	10.10	13.90	16.10	22.00
5	10.10	13.90	16.30	22.40
6	10.10	14.00	16.10	22.30
7	10.10	14.10	16.10	22.10
8	10.10	13.70	16.40	22.20

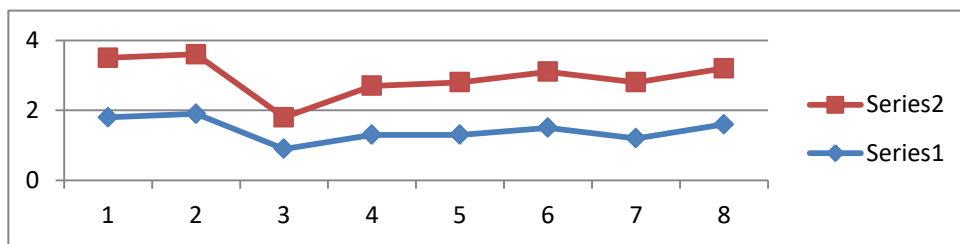
9	10.10	13.80	16.20	22.20
10	10.10	13.90	16.00	22.20
\bar{x}	10.10	13.90	16.16	22.22
I. Контрола:Humanserum-albumin + D glucose				
1	10.10	22.00	24.00	26.60
2	10.10	22.60	24.10	26.10
3	10.10	22.60	24.20	26.60
4	10.10	22.80	24.15	26.00
5	10.10	22.64	24.30	26.20
6	10.10	22.06	24.10	26.20
7	10.10	22.90	24.00	26.50
8	10.10	22.30	24.80	26.15
9	10.10	22.70	24.00	26.20
10	10.10	22.60	24.25	26.20
\bar{x}	10.10	22.60	24.10	26.27



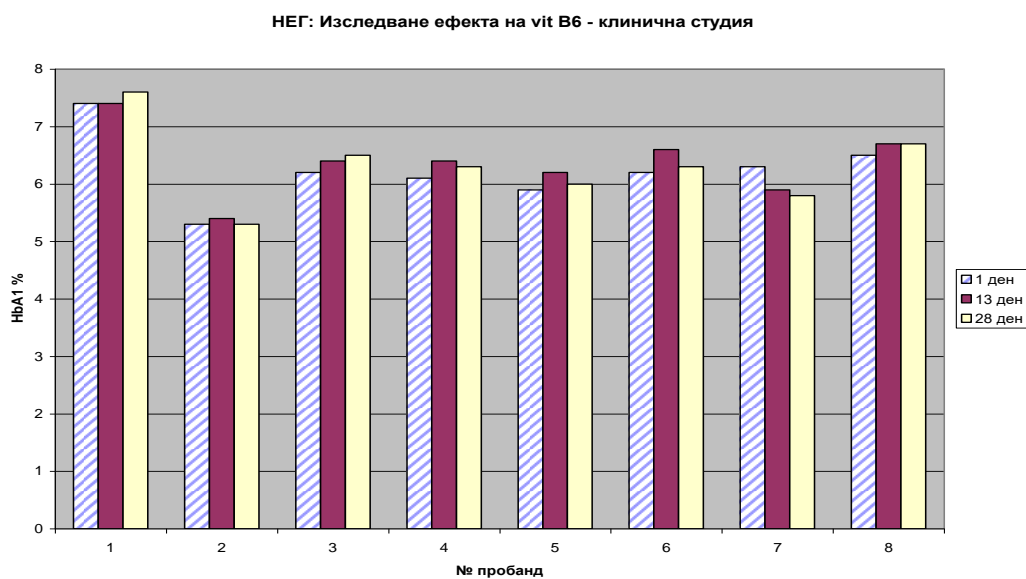
Фиг. № 17. GSA%: Инхибиторен ефект на Вит. В₆ – експеримент in vitro



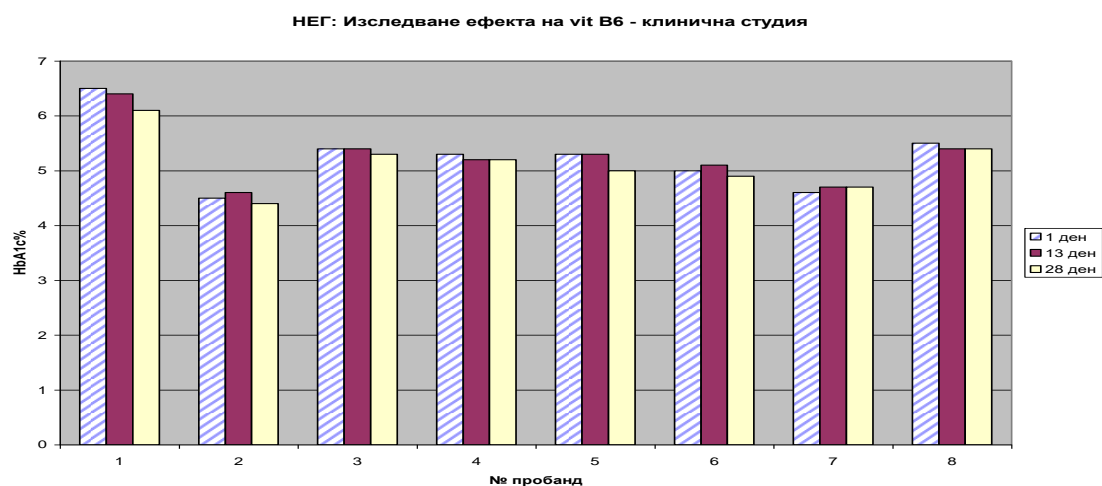
Фиг. № 18а. GSA%: Инхибиторен ефект на Вит. В₆ - студия със здрави доброволци



Фиг. № 18.б. серия 1 GSA% здрави доброволци след прием на Витамин В₆
серия 2 GSA% здрави доброволци преди прием на Витамин В₆



Фиг. № 19. HbA_{1c} % студия с прием на Витамин В₆ при здрави доброволци



Фиг. № 39. Повлияване на HbA_{1c} (HPLC) от Витамин В₆ при здрави доброволци

Табл. № 18а. GSA% и HbA_{1c}% - ефект на Витамин В₆ в/у НЕГ при здрави доброволци

№	GSA%			HbA ₁ %			HbA _{1c} %			Сер. глюкоза mmol/L		
	1 ^{-ви} ден	13 ^{-ти} ден	28 ^{-ми} ден	1 ^{-ви} ден	13 ^{-ти} ден	28 ^{-ми} ден	1 ^{-ви} ден	13 ^{-ти} ден	28 ^{-ми} ден	1 ^{-ви} ден	13 ^{-ти} ден	28 ^{-ми} ден
1	1.80	1.70	1.20	7.40	7.40	7.60	6.50	6.40	6.10	5.40	5.70	5.30
2	1.90	1.70	1.90	5.30	5.40	5.30	4.50	4.60	4.40	4.10	5.40	4.00
3	0.90	0.90	0.40	6.20	6.40	6.50	5.40	5.40	5.30	4.40	5.10	4.00
4	1.30	1.40	1.40	6.10	6.40	6.30	5.30	5.20	5.20	3.70	5.10	3.60
5	1.30	1.50	1.50	5.90	6.20	6.00	5.30	5.30	5.00	3.60	4.60	3.60
6	1.50	1.60	1.60	6.20	6.60	6.30	5.00	5.10	4.90	3.90	4.20	3.90
7	1.20	1.60	1.50	6.30	5.90	5.80	4.60	4.70	4.70	4.30	5.10	4.00
8	1.60	1.60	1.40	6.50	6.70	6.70	5.50	5.40	5.40	3.80	4.40	3.60
̄x	1.51	1.50	1.36	6.23	6.37	6.32	5.30	5.26	5.12	4.11	4.95	4.00

Табл. № 13 б. Серумни концентрации на PALP ng/ml - студия със здрави доброволци

Показател	PALP ng/ml	PALP ng/ml	PALP ng/ml	PALP ng/ml	PALP ng/ml	PALP ng/ml
№	1 ^{-ви} ден	13 ^{-ти} ден	28 ^{-ми} ден	1 ^{-ви} ден	13 ^{-ти} ден	28 ^{-ми} ден
1	40.200	-	194.020	25.020	-	71.233
2	23.320	214.100	242.200	26.102	65.022	85.121
3	39.560	94.201	130.000	27.203	50.343	59.454
4	35.650	119.011	177.002	35.212	62.112	67.212
5	40.321	169.111	233.201	26.021	56.654	139.020
6	32.122	109.021	155.112	24.212	52.000	167.000
7	25.212	47.012	43.122	28.431	62.872	36.321
8	30.321	87.120	149.011	48.000	62.200	84.400
̄x	33.820	119.939	165.458	30.022	58.743	88.720

Обсъждане: Изследвана е интраиндивидуалната динамика на GSA% и HbA_{1c}% (Фиг. № 17, 18, 19) при здрави доброволци с прием на Витамин В₆ с цел потвърждаване или отхвърляне на хипотезата, че тестваният медикамент може да понижи степента на гликиране на белтъците, не само in vitro при хипергликемични модули, но и при нормогликемия. Степента на неензимно гликиране на албумина е определена с високочувствителния метод колонно-афинитетно хроматографско разделяне фракциите на албумина. Референтни граници за GSA% 0.8% - 3.2%. Интраиндивидуалното сравнение между изходните и финални стойности на изследваните показатели показва, че след приема на Вит. В₆, GSA% се е понижил при трима от осемте доброволци (37% от случаите). Интраиндивидуалното понижаване степента на гликиране на серумния албумин е както следва: доброволец № 1 - с 22 %, № 3 - с 66 % и доброволец № 8 - с 12 %. Въпреки тенденцията за инхибиране НЕГ чрез Витамин В₆ при здрави доброволци, статистическа достоверност не се доказва ($p > 0.05$), поради ограничения брой случаи.

Гликираният хемоглобин (HbA_{1c}) не показва тенденция за понижаване на 28^{-ми} ден в сравнение с началните стойности (Фиг. № 19). Референтни граници за HbA_{1c}% - 3.6% -5.7%, за HbA₁ 5.0% - 8.0% (HPLC). Липсата на динамика при HbA₁ намира обяснение в по-дългия полуживот на хемоглобина спрямо продължителността на студията. Отсъствието на корелация между HbA_{1c} и GSA% ($r = 0.064$) потвърждава индивидуалната значимост на ФА като индекс на гликемичния контрол за по-кратък ретроспективен период. При интерпретиране на получените резултати за GSA % и HbA_{1c}% от клиничната студия, трябва да се има пред вид, че стойностите на гликираните белтъци при здрави лица са ниски и всяко следващо понижаване е методично трудно доловимо, дори и чрез такъв високоефективен метод какъвто е афинитетната хроматография. Този факт още повече утвърждава инхибиторния ефект на Вит В₆ върху НЕГ на белтъците, дори при невисока степен на неензимно гликиране при здрави лица – пробанти в настоящото проучване.

Коректното приемане на фармацевтичния препарат е обективизирано при проследяване плазмените концентрации на PAL и PALP (Табл. № 13 б) чрез HPLC. Референтните граници за серумните концентрации на пиридоксал/фосфат, изследвани чрез високоефективна течна хроматография са: PALP: 12.10 – 54.00 ng/ml и PAL: 10.01 - 50.21 ng/ml. Витамин В₆ е прилаган във високи терапевтични дози. Странични действия не са наблюдавани.

Изводи: Резултатите от нашето изследване *in vitro* имат потвърдителен характер по отношение инхибиторния ефект на PALP върху НЕГ на белтъците и допълват данните от литературната справка за понижаване степента на неензимно гликиране на белтъците при ниски концентрации на тествания медикамент.

Клиничната студия със здрави доброволци, проведена в Катедрата по Клинична фармакология Франкфурт на Майн, има оригинален характер и принос за инхибиторния ефект на Витамин В₆ върху степента на гликиране на белтъците, дори и при стойности на гликирания серумен албумин в референтни граници.

На базата на настоящите проучвания и литературни данни, може да се очаква, че при пациенти със захарен диабет, където стойностите на гликираните белтъци са много по-високи, а тези на PALP по-ниски, приемането на Вит. В₆ в терапевтични дози може да инхибира процеса на НЕГ с протективен ефект при пациенти със захарен диабет. Представените в литературната справка данни за клиничния ефект на Вит. В₆ при терапия на диабетната полиневропатия, освен познатата роля на PALP като кофактор на ензимите, играещи важна роля в обмяната на аминокиселините в нервната тъкан, с голяма вероятност се дължи също така и на инхибиторния ефект на PALP върху неензимното гликиране на белтъците.

Относно 5.4. Повлияване на НЕГ чрез Coenzyme Q₁₀ - Chromium polynicotinate

Нашата хипотеза, че Coenzyme Q₁₀ и Chromium polynicotinate могат да повлияят степента на неензимно гликиране на белтъците, е тествана чрез изследване концентрациите на ФА и HbA_{1c} при клинично проучване на пациенти със захарен диабет тип 2. Предполагаемият положителен ефект по отношение гликемичния контрол се основава на хипогликемизиращия ефект на Cr³⁺, който има сенсibiliзиращо действие върху инсулиновите рецептори и способства за утилизирането на глюкозните молекули от инсулинозависимите тъкани. Суплиментацията с Co Q₁₀ би подобрила аеробното разграждане на утилизираната от клетките глюкоза с особено значение за инсулинонезависимите митохондри-съдържащи тъкани (ЦНС, периферни нервни влакна, очна леща). Би следвало да се очаква, че Coenzyme Q₁₀, чрез антиоксидантния си ефект и чрез повишавайки капацитета на дихателната верига, би подобрил гликемичния статус с понижаване концентрациите на серумна глюкоза, HbA_{1c} и ФА.

Материал и методи: За проследяване ефекта на Coenzyme Q₁₀ и Cr³⁺ върху процеса на НЕГ са изследвани n = 19 пациента със захарен диабет тип 2 в Катедра „Пропедевтика на вътрешните болести“, МУ-Плевен. Успоредно с Coenzyme Q₁₀, на

пациентите е провеждана терапия по утвърдените клинични стандарти. Клиничното проучване е проведено след положително становище на комисията по етика при МУ-Плевен и при информирано съгласие на пациентите.

Таргентната група пациенти е разделена на две подгрупи:

а) подгрупа $n = 11$ пациента със ЗД с прием на 1 капсула Coenzyme Q₁₀ - Chromium polynicotinate Klamath Lake Algae (Aqua Source) (30 mg CoQ₁₀ и 200 µg Chromium polynicotinate) ежедневн в продължение на 28 дни;

б) контролна подгрупа $n = 8$ пациента със ЗД тип 2, без прием на CoQ₁₀-Chromium polynicotinate. Нашата хипотеза за ефекта на Coenzyme Q₁₀ и Cr³⁺ върху НЕГ е верифицирана чрез съпоставка стойностите на гликираните серумни белтъци и гликирания хемоглобин между групата пробанти и контролна група пациенти.

Степента на гликиране на белтъците е проследена чрез стойностите на фруктозамин (ФА) и гликирани хемоглобин (HbA_{1c}) на 1^{-ви} и 28^{-ми} ден от студията. Статистическият анализ е проведен при интраиндивидуално сравнение на показателите и чрез съпоставяне средните стойности между групата пробанти, приемали фармацевтичната субстанция и контролната група без прием на Co Q₁₀.

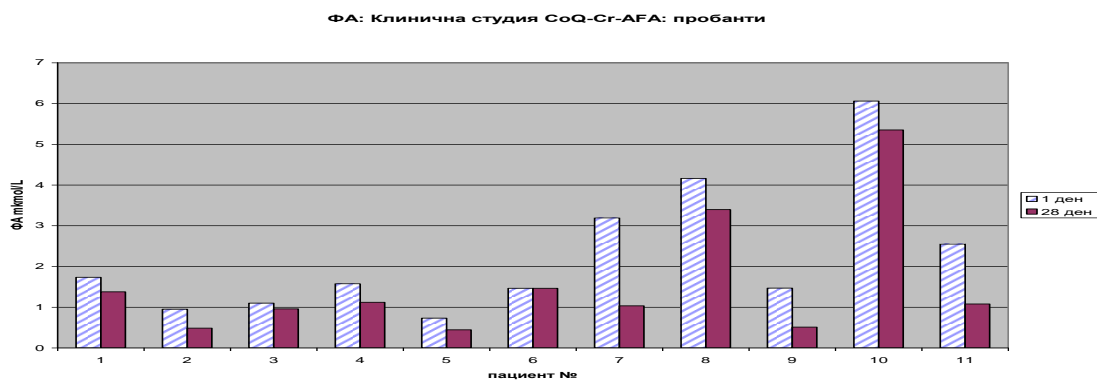
Резултатите са представени на Табл. № 14 а, б; Фиг. № 20, Фиг. № 21 а, б. Интраиндивидуалната съпоставка на изходните и финалните нива на показателя за неензимно гликирани серумни белтъци ФА показва ясно изразена тенденция за понижаване при 99% от пациентите със захарен диабет, приемали тествания препарат Coenzyme Q₁₀-Chromium polynicotinate. Статистическата обработка на резултатите за таргентната група показва, че на 1^{-ви} ден от студията средностатистическите нива на ФА са $\bar{x} = 2.270 \mu\text{mol/L}$. След едномесечен прием на Coenzyme Q₁₀-Chromium polynicotinate, стойностите на ФА са $\bar{x} = 1.560 \mu\text{mol/L}$. Отчита се намаляване концентрацията на ФА за групата пробанти средно с 32%. Тенденцията за понижаване НЕГ се запазва и при HbA_{1c}, макар и в по-малка степен. За групата пациенти, приемали Co Q₁₀, понижаването на HbA_{1c} е 21%. При контролната група пациенти ФА не показва тенденция към понижаване. Концентрациите на серумната глюкоза не корелират с тези на ФА ($p > 0.05$).

Табл. №14а. ФА и HbA_{1c} при пациенти със ЗД тип 2: Влияние на Coenzyme Q₁₀ Chrom

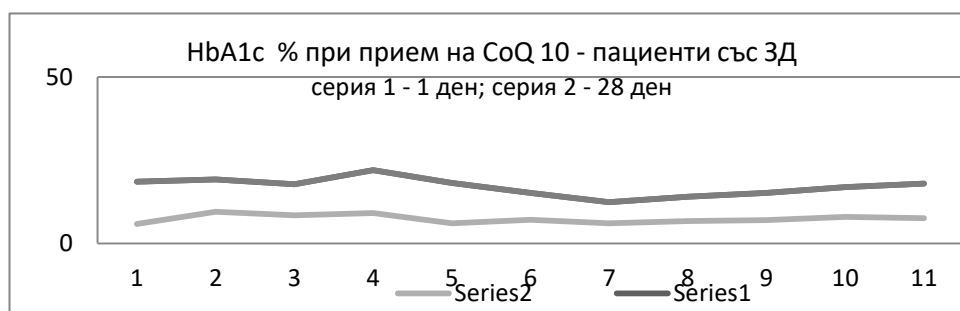
№	Пол	Год.	ФА μmol/L 1 ^{-ви} ден	ФА μmol/L 28 ^{-ми} ден	Δ ФА %	HbA _{1c} % 1 ^{-ви} ден	HbA _{1c} % 28 ^{-ми} ден	Δ HbA _{1c} %
1.	ж	78	1.733	1.374	21.02 ↓	12.70	5.90	53.00 ↓
2.	ж	40	0.948	0.486	49.12 ↓	9.70	9.50	2.01 ↓
3.	м	49	1.097	0.957	13.41 ↓	9.30	8.50	9.21 ↓
4.	м	55	1.575	1.121	29.21 ↓	12.90	9.10	29.11 ↓
5.	ж	62	0.730	0.445	39.42 ↓	12.10	6.10	50.15 ↓
6.	м	65	1.464	1.463	0.00	8.14	7.10	13.03 ↓
7.	м	77	3.190	1.032	68.03 ↓	6.30	6.10	3.18 ↓
8.	м	66	4.159	3.395	18.20 ↓	7.30	6.70	8.04 ↓
9.	м	59	1.467	0.509	65.87 ↓	8.20	7.00	15.45 ↓
10.	ж	76	6.060	5.350	12.45 ↓	8.90	8.00	10.72 ↓
11.	ж	56	2.550	1.076	58.23 ↓	10.40	7.61	7.12 ↓
̄x		62.1	2.270	1.560	33.73 ↓	9.63	7.61	20.99 ↓

Табл № 14 б. ФА и HbA_{1c} при контролна група пациенти без прием на Co Q₁₀

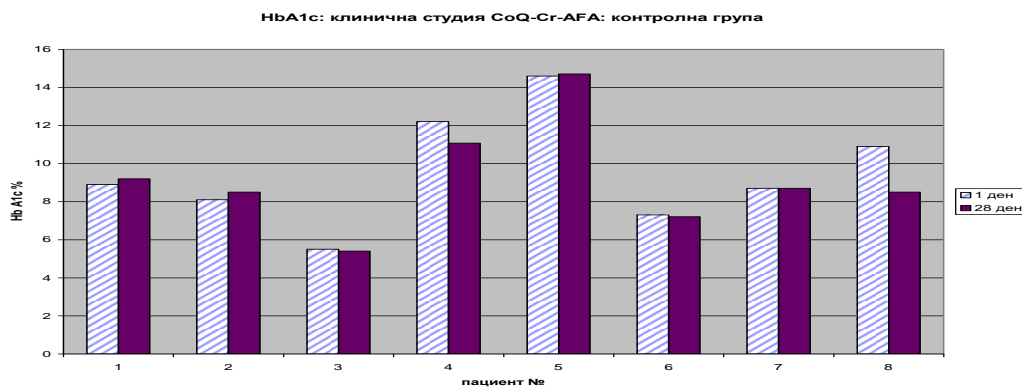
№	Пол	Год	ФА μmol/L 1 ^{-ви} ден	ФА μmol/L 28 ^{-ми} ден	ФА Δ %	HbA _{1c} % 1 ^{-ви} ден	HbA _{1c} % 28 ^{-ми} ден	HbA _{1c} Δ %
1	ж	78	1.110	1.273	15.12 ↑	8.90	9.20	3.61 ↑
2	м	46	1.170	1.280	9.31 ↑	8.10	8.50	5.34 ↑
3	м	50	0.734	0.800	9.02 ↑	5.50	5.40	2.51 ↓
4	ж	54	3.700	3.640	2.12 ↓	12.20	11.07	9.23 ↓
5	ж	67	3.030	3.450	14.21 ↑	14.60	14.70	1.71 ↑
6	м	61	3.320	3.680	11.32 ↓	7.30	7.20	1.02 ↓
7	ж	66	4.040	4.650	15.43 ↑	8.70	8.70	0.00
8	м	67	4.520	4.600	2.54 ↑	10.90	8.50	22.00 ↓
̄x		61.1	2.703	2.922		9.52	9.16	



Фиг. № 20. ФА $\mu\text{mol/L}$: Ефект на Co Q₁₀- Cr³⁺ върху НЕГ при пациенти със ЗД (n = 11)



Фиг. № 21 а. НbA1c; Линейно представяне понижениите стойности след прием на суплементa CoQ10



Фиг. № 21 б. НbA1c %; контролна група пациенти със ЗД без прием на Co Q₁₀ Cr³⁺ (n=8)

Обсъждане и Изводи: Резултатите от проведеното проучване за повлияване степента на неензимно гликиране на белтъците чрез Coenzyme Q₁₀Cr³⁺ при пациенти със захарен диабет, доказват достоверността на нашата хипотеза за инхибиторния ефект на тези суплементи върху НЕГ. При пациентите със ЗД тип 2, приемали ежедневно в продължение на 1 месец Co Q₁₀-Chromium polynicotate, се наблюдава понижаване концентрациите на ФА и НbA_{1c} за анализирания период $p < 0.05$ (Параметричен анализ STATGRAPHICS Plus 4.1 for Windows, SPSS 14, Exel Office 2007).

Тенденцията за повлияване степента на НЕГ на белтъците чрез Co Q₁₀ Chromium polynicotate се потвърждава както при интраиндивидуално сравнение на ФА и НbA_{1c}, така и чрез средностатистическите данни за *таргентната група*:

$$\begin{aligned} \text{ФА} \quad 1^{\text{-ви}} \text{ ден } \dot{x} &= 2.270 \pm 3.790 \mu\text{mol/L}; \quad 28^{\text{-ми}} \text{ ден } \dot{x} = 1.560 \pm 3.790 \mu\text{mol/L}; \\ \text{НbA}_{1c} \quad 1^{\text{-ви}} \text{ ден } \dot{x} &= 9.63 \pm 5.39 \% \quad ; \quad 28^{\text{-ми}} \text{ ден } \dot{x} = 7.61 \pm 5.60 \% \end{aligned}$$

Големите сигмални отклонения за ФА се дължат на екстремно високи концентрации на гликираните серумни белтъци при пациент № 10, въпреки хомогенността на таргентната група по предварителни данни.

Същевременно се наблюдава тенденция за понижаване на ФА след прием на тествания нутриент, дори и при този пациент с лош гликемичен контрол, което доказва ефекта на Co Q₁₀ Chromium polynicotate за подобряване гликемичния статус и понижаване степента на гликиране на белтъците.

Контролната група пациенти със захарен диабет тип 2 без прием на Coenzyme Q₁₀, не демонстрира динамика на показателите за НЕГ. Концентрациите на НbA_{1c} и ФА са без значима промяна в началото и края на анализирания период:

$$\begin{aligned} \text{ФА} \quad 1^{\text{-ви}} \text{ ден } \dot{x} &= 2.703 \pm 1.717 \mu\text{mol/L}; \quad 28^{\text{-ми}} \text{ ден } \dot{x} = 2.922 \pm \mu\text{mol/L}; \\ \text{НbA}_{1c} \quad 1^{\text{-ви}} \text{ ден } \dot{x} &= 9.52 \pm 2.72 \% \quad ; \quad 28^{\text{-ми}} \text{ ден } \dot{x} = 9.16 \pm 5.66 \% . \end{aligned}$$

Получените в настоящата дисертация концентрации на НbA_{1c} и ФА при пациенти със ЗД, приемали Co Q₁₀ и Cr³⁺, доказват превантивния ефект на тези нутриенти по отношение степента на неензимно гликиране на белтъците, което аргументира приложението им при хипергликемични състояния.

Настоящото проучване за влиянието на Коензим Q₁₀ и хром върху степента на неензимно гликиране на белтъците има оригинален характер.

Относно задача № 6. Изследване на фруктозамин в периперативния период при пациенти без данни за нарушен глюкозен толеранс и анализиране влиянието на някои анестетици върху неензимното гликиране на серумния албумин. Метаболитният дисбаланс при хоспитализирани пациенти с хирургични интервенции е актуален проблем на съвременната медицина и верифицирането на гликемичния статус в периперативния период се разглежда като важен фактор във връзка с риска от стрес-индуцирани и медикаментозно-медицирани хипергликемични състояния. Повишени концентрации на серумна глюкоза се наблюдават нерядко в периперативния период, дори и при пациенти без предварителни данни за нарушен глюкозен толеранс. Най-чести причини за нарушения глюкозен толеранс са метаболитните ефекти на стрес-хормоните, както

и хипергликемизиращ ефект на някои медикамент и нутриенти. Асоциират ли се някои от усложненията при транзиторни хипергликемии в периоперативния период с неензимно гликиране на белтъците? Литературните данни в тази насока са ограничени и не насочват към стратегия по отношение стрес-медиации и индуцирани хипергликемии в контекста на неензимното гликиране на белтъците. Клиничният мениджмънт на метаболитния статус е от съществено значение за терапевтичното поведение при хоспитализираните пациенти. Стремежът към понижаване риска от хипергликемични усложнения налага осъвременяване на биохимичния анализ. Европейската асоциация по клинична медицина (ESHM) препоръчва изследването на серумна глюкоза при всички хоспитализирани пациенти, независимо от наличието или не на данни за ЗД, като стойности > 7.8 mmol/L налагат мониториране. Особено внимание се обръща на пациенти с парентерално хранене и медикаментозни хипергликемични състояния.

Настоящото проучване цели подобряване на гликемичния контрол в периоперативния период чрез изследване и анализиране на показателя фруктозамин (маркер на неензимно гликирани серумни белтъци), насочено към актуализиране терапевтичното поведение, нутритивния съпорт и анестезиологичната медикация. ФА е предпочетен при нашето проучване пред HbA_{1c} , поради по-голямата достоверност и надеждност спрямо дизайна и целите на настоящата клинична студия – полуживот на серумния албумин (21 дни); конкурентни транспортни функции за лиганди и медикаменти. Кинетиката на неензимното гликиране на серумния албумин показва линеен ход за свързване на алдохексозите на 3^{-ти} ден от инкубирането, което обоснова избора на методологията в настоящото проучване за проследяване динамиката в концентрациите на ФА предоперативно 1^{-ви} ден и на 3^{-ти} постоперативен ден. Приложената от нас лабораторна методика за изследване на гликирани серумни белтъци (NBT-колориметричен метод) изразява концентрацията на фруктозамина спрямо общия белтък, като по този начин дава информация както за процеса на неензимно гликиране на белтъците, така също за протеинемичния статус. Освен това серумният албумин е транспортър за редица лиганди и медикаменти включително анестетици. Изследването на фруктозамин може да даде полезна информация за фармакодинамиката на някои медикаменти, транспортирани чрез серумния албумин. Литературната справка показва, че гликираният серумен албумин има нарушен свързващ капацитет за лекарствени вещества, чиито предилекционни места за транспорт в молекулата на албумина съвпадат с

позициите на НЕГ. Кристалографски изследвания сочат, че регионите за лигандно свързване на глюкозата при НЕГ на албумина са локализирани в субдомен ПА и ША и ШБ. Тези структурни особености биха могли да променят фармакодинамиката на някои лекарствени вещества при хипергликемии.

Ние си поставихме за *цел* да анализираме влиянието на анестетиците Propofol и Sevofluran върху степента на неензимно гликираните серумните белтъци. Propofol (2,6 диизопропилфенол) е интравенозен анестетик, транспортиран чрез серумния албумин. Неговото анестезиращо действие се основава на потенцирането на GABA-рецепторите в мозъка. Прилага се както за обща анестезия, така и като седращ агент. При въвеждане в анестезия Propofol 1% 20-40 мг/10 сек. в зависимост от отговора на пациента, докато се появят клиничните симптоми, показващи началото на анестезията. За възрастни 1.5 - 2.5 мг Propofol/kg. Транспортира се чрез серумния албумин като са идентифицирани свързващите домени, които са аналогични с тези на глюкозата – ПА, ША и ШБ. Фармакологичните характеристики на Propofol и липсата на информация за степента на НЕГ при венозна анестезия, провокират нашия интерес за проследяване ефекта върху степента на неензимно гликиране на серумния албумин, още повече предилекционните места за свързване на глюкозните молекули към албумина и тези на Propofol, са аналогични. *Нашата хипотеза* гласи, че концентрациите на ФА при пациенти с анестезия Propofol, се очакват постоперативно по-ниски, в сравнение с тези при анестезия със Sevofluran. Основание за това съждение е първичният хипогликемизиращ ефект на Propofol, а така също възможно конкуриране с глюкозата за лизинови остатъци в ПП верига на серумния албумин, което би имало вероятен инхибиторен ефект по отношение процеса на НЕГ на белтъците.

Sevofluran (хексафлуоро-метил-изопропил-етер) е инхалаторен анестетик, който модулира алостерично GABA- и NMDA-рецептори, инхибира Na^+ , K^+ , Cl^- канали, има хипнотично действие, по-малко аналгезиращо и мускулорелаксиращо действие. Плътността на субстанцията като течност 1.52 g/ml, а налягането при 20°C = 23.1 kPa. Биотрансформира се в черния дроб до хексафлуороизопропанол, неорганични флуорирани производни и сулфоестери. Инхалаторният анестетик Sevofluran се транспортира чрез серумния албумин в субдомени ПА и ШБ, където преобладаващата АК е триптофан, която не подлежи на неензимно гликиране. Ние очакваме по-високи концентрации на ФА при анестезия със Sevofluran в сравнение с тези при Propofol, тъй като Sevofluran има по-малко залавни места за албумина, а

така също инхалаторните анестетици притежават ограничена водноразтворимост в кръвната плазма. По отношение клиничните стандарти за анестезията със Sevofluran, се съблюдават утвърдените алгоритми - Sevoflurane Baxter 100 % inhalation vapour liquid инхалаторно - въвеждане 1% севофлуран с O₂, повишаване до 8%, докато се достигне нужната дълбочина на анестезията. Поддържане с 0.5-3%. Фармако-биохимичната справка за анестетиците Propofol и Sevofluran, както и структурните особености на серумния албумин, ни дават основание за хипотезата, че чрез изследване концентрациите на ФА може да се получи оригинална информация за анестезиологичната медикация, съобразно степента на неензимно гликиране на белтъците. *Цели:* 1. Проследяване степента на неензимно гликиране на серумните белтъци в периоперативния период при недиабетни пациенти. 2. Анализирание влиянието на анестезиологичната медикация върху степента на неензимно гликиране на белтъците чрез изследване концентрациите на ФА в периоперативния период при пациенти с коремно-хирургични интервенции без предварителни данни за нарушен глюкозен толеранс.

Резултатите от проучването биха допринесли за клиничната оценка на метаболитния статус и прецизиране на анестезиологичната медикация. Дизайнът на проучването включва сравняване степента на неензимно гликиране на серумните белтъци при хомогенна група пациенти по отношение диагноза Cholecystitis calc. и хирургична интервенция Cholecystaectomy. Проследено е влиянието на анестетиците Propofol и Sevofluran върху концентрациите на ФА.

Материал и методи: В открито моноцентрично клинично проучване са изследвани n = 28 пациента с коремно-хирургични интервенции Cholecystaectomy, предоперативна диагноза Cholecystitis calc. chr. ex., възраст 37 - 78 год., \bar{x} = 60.5 год. Полово разпределение на таргентната група пациенти n = 9 мъже и n = 19 жени. Пациентите са хоспитализирани в КАРИЛ, УМБАЛ – Плевен с предоперативна Дз.Cholecystitis calculosa exacerbata, без анамнестични данни и данни от личното досие за нарушен глюкозен толеранс. Постоперативната парентерална нутритивна поддръжка включва 10 % глюкосолеви разтвори и Insulin actrapid по утвърдени клинични стандарти. Клиничното проучване е проведено по Научен проект №16, 2011 г. МУ-Плевен, съгласно изискванията на етичната комисия и с лист за информирано съгласие на пациента. По отношение анестезиологичната медикация, наблюдаваните пациенти могат да бъдат разделени в две подгрупи: 1 подгрупа - Lysthenon, Propofol, Tracrium; 2 подгрупа - Lysthenon, Sevofluran, Tracrium. За

целите на настоящото проучване е вземана 2 x 3 ml периферна венозна кръв - предоперативно (1^{-ви} ден) и постоперативно (3^{-ти} ден) от анестезиолога. В Сектор Биохимия МУ-Плевен са изследвани концентрации на ФА, ОБ и сер. глюкоза. *Резултати:* Получените резултати за анализираниите биохимични показатели за таргентната група пациенти са представени на Табл № 15 и Фиг. № 22, 23, 24. Ензимните активности на AsAT, AlAT, GGT, AP са изследвани в Клинична лаборатория УМБАЛ, МУ-Плевен и са представени на Табл. № 16.

Табл. № 15. ФА $\mu\text{mol/L}$, сер. глюкоза mmol/L при пациенти с холецистектомия

№	Възраст год.	П О Л	ФА $\mu\text{mol/L}$ 1 ден	ФА $\mu\text{mol/L}$ 3 ден	ОБ 1 ден	ОБ 3 ден	Глю mmol/L 1 ден	Глю mmol/L 3 ден	Анестезия	Диагноза; Оперативна интервенция
1	77	М	0.358	0.858	72.0	71.5	7.80	8.04	Propofol	Cholecystitis calc. chr. ex. /Cholecystactomia/
2	72	Ж	0.317	1.005	80.0	80.0	6.40	7.00	Propofol	Cholecystitis chr.ex. Cholecystactomia
3	60	Ж	1.483	1.873	85.8	85.8	7.06	7.00	Sevofluran	Cholecystitis chr.ex. /Cholecystactomia/
4	67	Ж	1.482	1.154	42.2	40.0	9.12	10.00	Propofol	Cholecystitis acc; Hepatitis B /Cholecystactomia/
5	61	Ж	2.372	6.504	38.8	37.9	5.80	7.40	Sevofluran,	Cholecystitis chr ex (C.a.pancreatic интраоперативно)
6	66	М	6.408	6.504	85.5	86.0	14.40	12.10	Sevofluran,	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
7	76	Ж	1.200	1.320	67.7	67.0	7.70	7.00	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
8	37	Ж	0.385	0.461	68.0	68.0	5.78	5.90	Propofol	Cholecystitis acc. /Cholecystactomia/
9	63	М	0.624	0.452	46.6	46.5	5.78	6.60	Propofol	Cholecystitis chr.ex. /Cholecystactomia/
10	39	Ж	0.312	0.483	42.3	43.0	5.10	5.80	Propofol	Cholecystitis acuta /Cholecystactomia/
11	52	Ж	0.686	1.139	50.0	51.0	5.01	6.90	Sevofluran	Cholecystitis calc. Laparoscopy
12	76	Ж	0.460	10.924	62.2	62.2	5.80	8.96	Propofol	Cholecystitis chr.ex. /Cholecystactomia/
13	58	Ж	1.080	2.045	65.5	65.0	8.78	9.86	Propofol	Cholecystitis calc. chr. ex.Laparoscopy
14	62	Ж	0.745	2.216	44.0	44.0	7.80	8.65	Sevofluran	Cholecystitis acuta /Cholecystactomia/
15	58	Ж	0.468	0.649	48.9	48.0	5.60	6.02	Propofol	Cholecystitis ac. /Cholecystactomia/

16	96	Ж	2.028	0.671	52.3	50.0	8.60	8.56	Propofol	Cholelythiasis /Chole- dochoenterostomia/
17	49	Ж	2.610	3.277	60.0	60.0	7.02	7.60	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
18	78	Ж	1.733	1.374	62.2	62.2	12.7	5.9	Sevofluran	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
19	40	Ж	0.948	0.486	44.0	41.0	9.7	9.5	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
20	49	М	1.097	0.957	60.0	60.0	9.3	8.5	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
21	55	М	1.575	1.121	62.2	62.2	12.9	9.1	Sevofluran	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
22	62	Ж	0.730	0.445	58.0	58.0	7.1	7.1	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
23	65	М	1.464	1.463	44.4	45.0	8.14	7.1	Sevofluran	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
24	77	М	3.190	1.032	67.7	67.7	7.63	6.7	Sevofluran	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
25	66	М	4.159	3.395	70.0	70.0	8.2	7.7	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
26	59	М	1.467	0.509	56.0	56.0	8.9	8.8	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
27	76	Ж	6.060	5.350	80.0	80.0	9.63	7.61	Sevofluran	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
28	56	Ж	2.550	1.076	76.0	75.0	10.4	7.61	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
х	60.5		1.714	2.097			8.43	7.82		

Табл. № 16. Други биохимични показатели при пациенти с холецистектомия

№	ГОД	Пол	AsAT	AlAT	GGT	AP	Bill T	Анестезия	Диагноза; ОП интервенция
1	77	М	98.00	109.00	86.00	-	24.00	Propofol	Cholecystitis calc. chr. ex. /Cholecystactomia/
2	72	Ж	87.77	120.00	-	-	17.80	Propofol	Cholecystitis chr.ex. Cholecystactomia
3	60	Ж	74.00	87.00	46.00	67.00	24.17	Sevofluran,	Cholecystitis chr.ex. /Cholecystactomia/
4	67	Ж	833.00	1384.00	118.00	-	128.40	Propofol	Cholecystitis ;Hepatitis B /Cholecystactomia/
5	61	Ж	243.21	196.63	1175.70	-	314.30	Sevofluran,	Cholecystitis chr ex (C.a.pancreatic)
6	66	М	75.00	88.90	100.00	-	15.00	Sevofluran,	Cholecystitis calc chr ex Cholecystactomia
7	76	Ж	88.00	96.80	46.00	86.00	18.00	Propofol	Cholecystitis calc chr ex /Cholecystactomia/

8	37	Ж	17.00	24.00	37.00	78.00	12.30	Propofol	Cholecystitis acc. /Cholecystactomia/
9	63	М	86.00	97.00	117.00	-	9.4	Propofol	Cholecystitis chr.ex. /Cholecystactomia/
10	39	Ж	36.00	16.00	42.50	117.00	7.00	Propofol	Cholecystitis accuta /Cholecystactomia/
11	52	Ж	35.00	24.70	40.00	80.00	9.8	Sevofluran	Cholecystitis calc. chr. ex. Laparoscopy
12	76	Ж	20.00	80.00	-	80.00	9.30	Propofol	Cholecystitis chr.ex. /Cholecystactomia/
13	58	Ж	16.00	14.00	40.00	77.00	8.40	Propofol	Cholecystitis calc. chr. ex. Laparoscopy
14	62	Ж	65.92	109.28	655.50	590.00	199.90	Sevofluran	Cholecystitis accuta /Cholecystactomia/
15	58	Ж	66.00	87.00	42.00	56.00	24.00	Propofol	Cholecystitis ac. /Cholecystactomia/
16	96	Ж	379.00	360.00	-	729.6	31.87	Propofol	Cholelythiasis /Choledocho-enterostomia/
17	49	Ж	23.40	28.80	40.00	50.00	8.70	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
18	78	Ж	66.70	88.00	50.00	63.88	16.70	Sevofluran	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
19	40	Ж	22.00	26.00	43.00	16.00	8.30	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
20	49	М	40.00	48.00	78.00	16.60	9.20	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
21	55	М	46.80	86.80	111.00	18.80	12.00	Sevofluran	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
22	62	Ж	20.00	28.00	44.00	17.00	8.30	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
23	65	М	65.66	190.00	255.00	88.00	24.00	Sevofluran	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
24	77	М	88.00	140.00	96.00	65.00	18.00	Sevofluran	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
25	66	М	66.00	96.00	122.00	40.00	12.02	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
26	59	М	40.00	86.98	100.00	56.00	18.00	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
27	76	Ж	86.00	160.80	150.00	18.00	15.00	Sevofluran	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/
28	56	Ж	30.00	46.00	42.00	17.70	9.80	Propofol	Cholecystitis calc.chr.ex. /Cholecystactomia/

Обсъждане: За целите на проучването е подбрана хомогенна група пациенти по отношение предоперативна диагноза Cholecystitis calculosa chronica exacerbata. По отношение метаболитния контрол, е съблюдувано пациентите да нямат данни от личното досие за нарушен глюкозен толеранс. В хода на проучването се оказва, че интраоперативно на пациент № 5 е поставена диагноза С.а. pancreatic, а при № 12 е отчетено екстремно повишаване концентрацията на ФА постоперативно, което наложи при статистическата обработка да бъде използван непараметричен анализ. Статистическият анализ на получените данни за серумните концентрации на ФА пред- и постоперативно е осъществен чрез статистически програми STATGRAPHICS Plus 4.1 for Windows, SPSS 14, Excel Office 2007 при $n = 28$.

1 ден (предоперативно)	3 ден (постоперативно)
$\bar{x} = 1.713$	$\bar{x} = 2.097$
Median = 1.332	Median = 1.130
Minimum = 0.312	Minimum = 0.445
Maximum = 6.408	Maximum = 10.924
OR = 0.299	OR = 0.461
Lower quartile = 0.655	Lower quartile = 0.660

Сумарна статистика за ФА $\mu\text{mol/L}$ в таргентната група пациенти при $n = 27$:

1 ден (предоперативно)	3 ден (постоперативно)
$\bar{x} = 1.713$	$\bar{x} = 1.771$
Median = 1.332	Median = 1.121
Minimum = 0.312	Minimum = 0.445
Maximum = 6.408	Maximum = 6.504
OR = 0.299	OR = 0.337
Lower quartile = 0.655	Lower quartile = 0.649

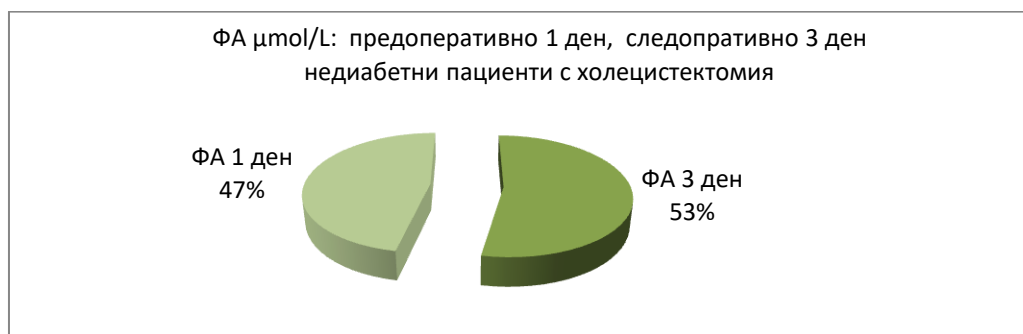
Обсъждането на тези данни показва, че при $n = 28$, вътрегруповата девиация на наблюдавания показател ФА е твърде голяма, най-вече поради извънредно високата стойност на ФА постоперативно при пациент № 12 (ФА=10.924 $\mu\text{mol/L}$), който може да бъде разглеждан като отделен казус. При него се наблюдава както постоперативно повишаване на ФА, така и на серумната глюкоза (стресмедирана хиперглицемия), която дори и в тези кратки срокове е довела до повишаване НЕГ. Иновативното изследване на ФА при такива пациенти има приносен характер за детайлното интерпретиране на гликемичния статус, дори и при референтни предоперативни нива на сер. глюкоза. Проследяването на ФА след изписване на пациента, би дало информация за транзитория характер на хиперглицемията.

Статистическият анализ показва постоперативно повишаване стойностите на фруктозамина както при първоначалната, считана за хомогентна таргентна група пациенти $n = 28$ (ФА предоперативно $\dot{x} = 1.713 \mu\text{mol/L}$; ФА постоперативно $\dot{x} = 2.097 \mu\text{mol/L}$). При статистическата обработка с вторично коригирания брой пациенти, изключващ № 12 ($n=27$), предоперативно ФА $\dot{x}=1.713 \mu\text{mol/L}$; постоперативно ФА $\dot{x} = 1.771 \mu\text{mol/L}$). Резултатите от нашето клинично проучване за метаболитния контрол в периоперативния период на недиабетни пациенти, показват тенденция за постоперативно повишаване концентрациите на ФА средно с 6 % за таргентната група. Статистическият корелационен непараметричен анализ за пред- и постоперативните конц. на ФА обаче не показва сигнификантна разлика ($p = 532$), т.е. отхвърля нулевата хипотеза за статистически значимо повишаване степента на неензимно гликиране постоперативно при недиабетни пациенти.

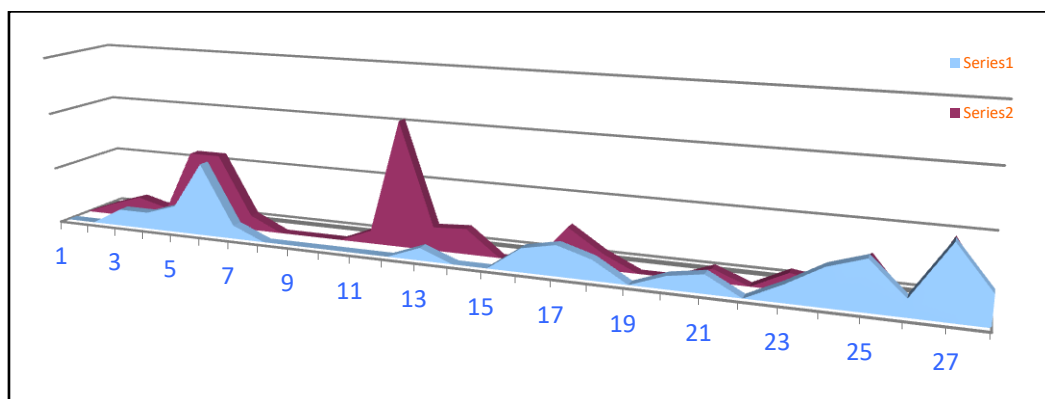
Наблюдават се следните *тенденции*: 1. Средностатистическите концентрации на ФА при изследваните пациенти без предварителни данни за захарен диабет, са по-високи от референтните граници. Данните от нашето проучване за степента на неензимно гликиране на серумните белтъци при пациенти с коремнохирургични интервенции показват по-високи стойности на ФА както предоперативно, така и постоперативно, в сравнение с референтните граници за ФА за българска популация (0.960 - 1.560 $\mu\text{mol/L}$). В търсене на възможни причини за установените по-високи стойности на ФА, бихме могли да обсъждаме възрастовия фактор (средната възраст в таргентната група е $\dot{x} = 60.5$ год.) като причина за по-високата степен на неензимно гликиране на белтъците, каквито данни има от литературната справка, както и по-високите от референтните нива на сер. глюкоза (лимитиращ фактор в процеса НЕГ). Установените повишени концентрации за серумна глюкоза, въпреки липсата на предварителни данни за ЗД при пациент № 6 сер. глю предоперативно = 14.40 mmol/L, постоперативно = 12.10 mmol/L; пациент № 27 сер. глюкоза предоперативно = 10.4 mmol/L и постоперативно = 7.61 mmol/L. Граничните и умерено повишените нива на серумна глюкоза при изследваните пациенти биха могли да бъдат обяснени със стрес-медирана хипергликемия при хирургичните интервенции. Фактът, че при двамата пациенти предоперативните стойности на серумната глюкоза са по-високи от постоперативните, навежда на заключение за стрес-медирана хипергликемия, която адекватно е била купирана по време на водене на реанимационните мероприятия по утвърдени клинични стандарти. При пациент № 12, въпреки невисоките постоперативни нива на серумна

глюкоза 8.96 mmol/L, се наблюдава екстремно повишаване степента на неензимно гликиране на серумния албумин $\text{FA}=10.924 \mu\text{mol/L}$. Тези данни потвърждават индивидуалната значимост на показателя FA за гликемичния контрол.

2. Интраиндивидуалната динамика на показателя FA демонстрира тенденция за постоперативно повишаване спрямо изходните стойности при 53% от случаите (Табл. №15, Фиг. №22). Статистическият корелационен непараметричен анализ за пред- и постоперативните конц. на FA обаче не показва сигнификантна разлика ($p = 532$), т.е. отхвърля нулевата хипотеза за статистически значимо повишаване степента на НЕГ постоперативно при недиабетни пациенти (добър клиничен анализ). Все пак наблюдаваната тенденция при 53% от пациентите за интраиндивидуално повишаване концентрациите на FA постоперативно (Фиг.№ 23), указва значимостта на FA за метаболитния контрол. Такъв род динамика показва, че въвеждането в клиничната практика на показателя фруктозамин би допринесло за нов прочит на метаболитния статус, а също дава информация за фармакологията на транспортираните чрез серумния албумин медикаменти и анестетици.



Фиг. № 22. FA - пред- и постоперативно при пациенти с холецистектомия (n= 28)



Фиг. № 23. $\text{FA} \mu\text{mol/L}$: серия 1 – предоперативно; серия 2 – постоперативно (n= 28)



Фиг. № 24 . Интраиндивидуална динамика на ФА в периоперативния период (n= 28)

Въпреки хомогенността на таргентната група по отношение на предоперативната диагноза и метаболитен статус, анализираният от нас показател ФА има голямата вътрегрупова девиация. В търсене на възможните причини, ние анализирахме следните фактори: влияние на приложените анестетици, настъпили интраоперативни промени в диагнозата и хирургичния план, както и влияние на стресиндуцирани хипергликемии и протеинемичния статус върху стойностите на неензимно гликираните серумни белтъци. Различията в протеинемичния статус биха могли да бъдат една от причините за неенднородните като степен и посока промени в концентрациите на ФА.

При някои пациенти концентрациите на общ белтък са силно понижени, особено при тези с данни за хепатит и холангиопанкреатит – пациенти № 4 и 5, което математически се отразява на цифровото изразяване на ФА, тъй като той представлява отношение на гликираната към негликирана фракция на серумните белтъци - $\mu\text{mol NMF}$ на g белтък. При пациент № 4 с Дз. Cholecystitis acc; Hepatitis В, бяха определени концентрации на ОБ 38 g/L , а при пациент № 5 с предварителна Дз. Cholecystitis chr ex и интраоперативна диагноза С.А. pancreatic, ОБ= 30.38 g/L . Интересното е, че при тези пациенти, въпреки ниските концентрации на ОБ, стойностите на ФА са по-високи от референтните. Едно от възможните обяснения е, че въпреки нозологично обусловената хипопротеинемия, установените повишени глюкозни концентрации (пац. № 4 предоперативно сер. глю = 9.12 mmol/L , постоперативно = 10.00 mmol/L ; пациент № 5 – предоперативно сер. глю = 5.80 mmol/L и постоперативно = 7.40 mmol/L), обуславят по-висока степен на НЕГ, като по литературни данни стабилната кетоаминна фракция се образува на 3 ден. При критични по отношение постоперативна кахексия пациенти с много ниски стойности на ОБ, ФА дава допълнителна информация за протеинемичния статус. При такъв метаболитен дисбаланс с ниски концентрации на серумните протеини,

постоперативна хипергликемия и повишени нива на ФА, би могло да се направи препоръка за нутритивна поддръжка с аминокиселинни разтвори и *S. Physiologicum* вместо *S. Glucosae*. Постоперативните хипопротеинемии трябва да се интерпретират и като замъгляващ статистическия анализ фактор за ФА.

Получените резултати в настоящото проучване доказват значимостта на съвременния биохимичен анализ, както и необходимостта от правилна интерпретация на показателите. Клинико-диагностичната стойност на показателя фруктозамин се подчертава и от факта, че при някои от пациентите с ниски стойности на ФА, концентрациите на серумна глюкоза са повишени (пациент №1). Това в клиничен план означава, че установените по-високи нива на серумна глюкоза са транзиторни, най-вероятно стрес-обусловени, и не се отразават неблагоприятно върху степента на неензимно гликиране на серумните белтъци. Дори и да се наблюдава моментно повишаване на серумната глюкоза, ако стойностите на ФА не показват такава тенденция, това е индикация за благоприятна прогноза за гликемичния статус. Литературните данни указват липсата на корелационна зависимост между HbA_{1c} и серумната глюкоза при транзиторни хипергликемии.

Важен фактор при обсъждане динамиката на показателя за неензимно гликиране на белтъците ФА в периоперативни период е влиянието на анестезиологичната медикация. Ние сравнихме нивата на ФА пред- и следоперативно в две подгрупигрупи от таргентната група пациенти с холецистектомия: **1** подгрупа: Lysthenon, Propofol, Tracrium; **2** подгрупа: Lysthenon, Sevofluran, Tracrium.

По отношение сравнителния анализ на ФА при пациентите, анестезирани с Propofol и пациентите с анестезия Sevofluran, беше отчетено, че стойностите на ФА са понижени постоперативно при общо 14 пациента, като 5 от тях са с анестезия Sevofluran, а 9 пациента са от 1 подгрупа с венозни анестетици. Обсъждането на тези резултати може да се отнесе към хипогликемизиращия ефект на венозните анестетици, което се отразява и върху понижаване степента на гликиране на серумните белтъци постоперативно. Трима от проследените пациенти нямат промяна в концентрациите на ФА пред- и постоперативно. При 11 от пациентите се наблюдава постоперативно повишаване концентрациите на ФА, като при някои са по-високи от референтните граници. Анализирайки данните за концентрациите на ФА пред- и постоперативно спрямо приложената анестезия (група 1 - Propofol $n=18$; група 2 - Sevofluran $n=10$), не се доказват статистически значима разлика за стойностите на ФА ($p=0.030$).

Предоперативно: 1 група ФА $\dot{x} = 1.237$; медиана - 1.014

2 група ФА $\dot{x} = 2.571$; медиана - 1.654

Постоперативно: 1 група ФА $\dot{x} = 1.675$; медиана – 0.907

2 група ФА $\dot{x} = 2.857$; медиана – 1.668

При инхалаторния анестетик Sevofluran, стойностите на ФА постоперативно демонстрират тенденция за повишаване в степен по-голяма, отколкото при венозна анестезия. По отношение прогнозата за пациентите с повишени конц. на ФА, по-скоро акцентът трябва да бъде върху възможни постоперативни супурации, във връзка с това, че неензимното гликиране на серумните белтъци засяга острофазовите белтъци и имунокомпетентни медиатори. Нашето проучване за проследяване концентрациите на фруктозамин в периоперативния период при пациенти без нарушен глюкозен толеранс има оригинален характер и насочва към иновативно приложение на този показател не само гликемичен индекс при пациенти със ЗД, но също така за актуализиране на периоперативния биохимичен анализ. ФА дава допълнителна информация за метаболитния статус, както и за медикаментозното поведение при пациенти с повишена степен на неензимно гликиране на белтъците. Резултатите от нашето клинично проучване налагат следните *изводи*:

1. Средностатистическите стойности на показателя за неензимно гликирани серумни белтъци ФА при изследваните пациенти с коремнохирергични интервенции без данни за нарушен глюкозен толеранс, показват тенденция за постоперативно повишаване, но без статистически достоверна разлика в степента на гликиране на белтъците пред- и постоперативно.

2. Установените от нас концентрации на фруктозамин в периоперативния период при недиабетни пациенти налагат извода, че няма статистически достоверна разлика на показателя в зависимост от типа анестезия, но при медикация с инхалаторни анестетици, тенденцията за постоперативно повишение на ФА е по-изразена, отколкото при венозна анестезия.

3. Фруктозаминът е иновативен показател на гликемичния контрол в периоперативния период и дава допълнителна информация за метаболитния статус не само при пациенти със захарен диабет.

4. При пациенти с повишени и гранични предоперативни стойности на фруктозамин, би следвало да се прецизира медикаментозното поведение и анестезиологичната медикация.

ИЗВОДИ

1. Референтните граници на фруктозамин за детска възраст за Централен Северен район на България, чрез колориметричния метод с NBT, са: 0.441- 1.502 $\mu\text{mol/L}$.
2. Изследването на фруктозамин при деца със захарен диабет тип 1 дава допълнителна информация за метаболитния контрол и повишава оценъчните критерии.
3. Повишените серумни концентрации на фруктозамин и понижените на алфа-1-антитрипсин при пациенти с диабетна ретинопатия доказват, че НЕГ и повишената ензимна активност на протеазите, са синергични фактори в патогенезата на микроваскуларните усложнения при диабетната ретинопатия.
4. Инхибиторният ефект на медикаментите Ацетилсалицилова киселина, Витамин В₆ и Коензим Q₁₀.Cr³⁺ по отношение неензимно гликиране на белтъците, обосновават тяхното приложение за превенция на късни усложнения при захарния диабет.
5. Осъвременяването на гликемичния контрол в периоперативния период при всички пациенти, независимо от наличието или не на данни за захарен диабет, чрез изследване на фруктозамин, дава допълнителна информация за метаболитния статус и може да подобри нутритивния съпорт и анестезиологичната медикация.

ПРИНОСИ И ОРИГИНАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ

1. Установени са собствени референтни граници на фруктозамин за детска възраст на Централен северен район на България.
2. Нашите изследвания за ролята на фруктозамин като допълнителен маркер на метаболитния контрол при деца със захарен диабет тип 1, имат приносен характер за клиничната биохимия и детската ендокринология у нас, повишавайки оценъчните критерии за де/компенсация на заболяването.
3. Нашето проучване за взаимовръзката между повишените концентрации на ФА и понижените на А-1-АТ при пациенти с диабетна ретинопатия има приносен характер за диагностиката и прогнозата на микроваскуларни усложнения при хипергликемични състояния.
4. Оригинален характер има проучването за повлияване на НЕГ на белтъците при пациенти със захарен диабет тип 2, суплиментирани с Коензим Q₁₀ и Cr³⁺.
5. Оригинален харктер има изследването на фруктозамин като маркер на метаболитния контрол в периперативния период при всички пациенти, с цел оптимизиране анестезиологичната медикация.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Mihaylova M., Komsa-Penkova R., Bogdanov S., Radev R.; Investigation of fructosamine as a new biochemical marker of the perioperative glycemic control - response of fructosamine to anesthetics; *Анестезиология и интензивно лечение, NLIV*, 1/2015, pp 42-46
2. Nankova D., Mihaylova M., Tzinlikov I., Mihaylov V.; Comparison of Fructosamine and Alpha-1-antitrypsin in patients with diabetic retinopathy; *Scripta scientifica medica*, 2012, vol. 44 (2), pp 45-48
3. Михайлова М., Генов Ч., Михайлов В., Цинликов И.; Повлияване процеса на неензимно гликиране на белтъците чрез КоQ₁₀-Chromium polynicotinate; *Бюлетин за излезлите в България нови лекарствени средства*, 2008; (27), с. 3-9
4. Михайлова М., Цинликов И., Чолаков С., Генов Ч., Михайлов В. и Алексиев А.; Повлияване процеса на неензимно гликиране на белтъците при пациенти с диабет тип 2 чрез КоQ₁₀-Chromium polynicotinate-Klamath Lake Algae; *Doctor D*, 2000, (2), с. 28 -29
5. Mihaylova M., Alexiev A.; Acetylsalicylic acid and Pyridoxalphosphate as inhibitors of nonenzymatic glycosylation of proteins; *Scripta scientifica Medica*, 1997; Vol. 29, pp 3-5
6. Michailova M., Keita Y., Caspary S., Solem E., Kratzer W., Worner G., Rietbrock N.; Inhibitory effect of vitamin B₆ on nonenzymatic glycation of albumin and hemoglobin; *International Journal of Clinical pharmacology therapy and toxicology*; 1992, vol 30 (11), pp 547-48
7. Keita Y., Michailova M., Kratzer W., Worner G., Worner W., Rietbrock N.; Influence of penicillamine on the formation of early nonenzymatic glycation products of human serum proteins; *International Journal of Clinical pharmacology therapy and toxicology*; 1992, vol 30 (11), pp 441-42