МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ
УМБАЛ „АЛЕКСАНДРОВСКА“, КЛИНИКА ПО КАРДИОЛОГИЯ

МАРИЯНА КОСТОВА ХРИСТОВА

ФАКТОРИ ЗА ПРОМЕНЕН ТЕРАПЕВТИЧЕН ОТГОВОР ПРИ ЛЕЧЕНИЕ НА АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТОНИЯ С РАС БЛОКЕРИ

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
Област на висше образование: 7. *Здравеопазване и спорт*
Професионално направление: 7.1. *Медицина*
По научна специалност 03.01.47 – *Кардиология*

Научни ръководители:

Доц. д-р Емил Иванов Манов, дм
Доц. д-р Маргарит Маринов Пенев,д м

София 2020

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ 6

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 8

1. Епидемиология. Рискови фактори в генезата на АХ. Хипертензивен контрол 8

2. Генетика на артериалната хипертония 12

3. Роля на ренин–ангиотензин–алдостероновата система (РААС) 20

3.2. Компоненти на РААС 20

3.3. Локална (тъканна и органна) ренин-ангиотензиновата система 22

4. Инхибиторите на РААС при хипертония 23

4.1. Кратки исторически данни 23

4.2. Действие на АСЕ инхибиторите 23

4.2.1. Ангиотензин-конвертиращ ензим 23

4.2.2. Алтернативни ангиотензин II-образуващи пътища. Видова и органна специфичност 25

5. Оксидативен стрес и сърдечно-съдови заболявания 26

5.2. Физиологично значение на ROS. Състояния, свързани с дисрегулация на ROS метаболизма 27

5.3. Синтез на NO-условия и функция 28

5.4. Ендотелна дисфункция 30

5.5. ROS и атеросклероза 31

5.6. ROS и съдово ремоделиране 33

5.7. Източници на ROS в съдовите клетки. Ензимни системи 33

5.7.1. NADPH оксидаза. Роля в патогенезата на хипертонията 33

5.7.2. Ксантиноксидаза 36

5.7.3. NO синтетаза 38

5.7.4. Митохондриална дихателна верига 39

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 42

1. Цел 42

2. Задачи 42

IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ 43

1. Клиничен материал 43

1.1. Получаване на информирано съгласие 44

1.2. Формиране на групи 47

1.2.1. Изследване на оксидативен статус 47

1.2.2. Изследване серумни нива на химаза и ангиотензин 2 48

1.2.3 Определяне честотата на ACE I/D полиморфизма 48
1.2.4. Изследване на серумно ниво на ангиотензин конвертиращ ензим 48
1.2.5. Изследване на серумните нива на ACE 2 48
1.3. Получаване на биологичен материал 48
1.3.1. Определяне оксидативен статус 48
1.3.2. Определяне на серумната химаза 49
1.3.3. Биологичен материал за изследване на плазмено ниво на протеини от RAS системата 49
1.3.4. Биологичен материал за изолиране на генома ДНК 49
2. Химикали и реактиви 49
2.1. Химикали и реактиви за определяне оксидативен стрес 49
2.2. Химикали и реактиви за изолиране на геномна ДНК 49
3. Методи 51
3.1. Изследвания на оксидативен стрес 51
3.1.1. Биохимични методи 51
3.1.2. Спектрофотометрични методи 51
3.1.3. ЕПР методи 52
3.1.4. Имуно-ензимни методи 53
3.2. Молекулярно биологични методи 55
3.2.1. Изолиране на ДНК 55
3.2.2. Полимеразно-верижна реакция (PCR) 56
3.2.3. Електрофореза на ДНК 59
3.3. Кръвната картина, биохимия и йонограма 59
3.4. Статистически анализи 60
V. РЕЗУЛТАТИ 63
1. Собствено проучване върху показатели на оксидативния стрес и антиоксидантния статус при пациенти с артериална хипертония, разделени според вида на приеманата антихипертензивна терапия, сравнени с нормотензивни контроли 63
1.1. Възрастово разпределение на изследваните пациенти за параметри на оксидативен стрес 64
1.2. Проучване на влиянието на лекарствената терапия върху „real time" показатели на оксидативен стрес – ROS продукти, аскорбатни радикали и •NO радикали 65
1.2.1. Определяне на аскорбатни радикали 65
1.2.2. Определяне на ROS продукти чрез спин-улавящия агент PBN 67
1.2.3. Определяне на •NO радикала чрез спин улавящия агент Carboxy-PTIO 68

1.3. Проучване на влиянието на лекарствената терапия върху подбрани показатели на оксидативния стрес – крайни продукти на окисление на липиди, протеини и нуклеинови киселини 71
1.3.1. Определяне нивото на продуктите на липидно перокисление (MDA) 71
1.3.2. Определяне на протеин карбонилно съдържание (PCC) 72
1.3.3. Продукти на ДНК увреждане, измерено като количество 8-OHdG 73
2. Изследване на плазмено ниво на протеини от РААС системата и химаза 75
2.1 Изследване серумни нива на ангиотензин-конвертиращ ензим (ACE) 75
2.1.1 Демографски данни 75
2.1.2 Серумна конценрация на ангиотензин-конвертиращият ензим 76
2.2. Серумните нива на ACE2 80
2.3. Изследване серумните нива на ангиотензин 2 81
2.4. Определяне на серумните нива на химаза 82
3. Честоти на ACE I/D полиморфизма при пациенти и контроли 86
3.1. Демографска структура 86
3.2. Генотипно разпределение на ACE полиморфизма при пациенти и контроли 88
3.3. Ефект на I/D ACE полиморфизма върху фенотипа при пациентите с АХ и при нормотензивните контроли 90
V. ОБСЪЖДАНЕ 97
1. Артериална хипертония и оксидативен стрес 97
1.1 Перспективи на антиоксидантната терапия 97
1.2. Причини за разочароващите резултати от опитите с антиоксиданти 99
1.3. Влияние на лекарствената терапия върху подбрани „real time" показатели на оксидативен стрес – ROS продукти, аскорбатни радикали и •NO радикали 102
1.4. Влияние на лекарствената терапия върху подбрани показатели на оксидативния стрес – крайни продукти на окисление на липиди, протеини и нуклеинови киселини 107
2. Протеини от РААС системата 111
3. ACE I/D полиморфизъм при пациенти и контроли 119
VII. ИЗВОДИ 126
VIII. ПРИНОСИ 127
IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 128
X. БИБЛИОГРАФИЯ 130
XI. ПРИЛОЖЕНИЯ 147
XII. БЛАГОДАРНОСТИ 155

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

АН	артериално налягане
АРБ	ангиотензин-рецепторен блокер
АХ	артериална хипертония
ДАН	диастолно артериално налягане
ЕД	ендотелна дисфункция
ИБС	исхемична болест на сърцето
РААС	ренин-ангиотензин-алдостеронова система
САН	систолно артериално налягане
СН	сърдечна недостатъчност
ХБН	хронична бъбречна недостатъчност

На латиница

ACE	ангиотензин-конвертиращ ензим
AI	ангиотензин I
AII	ангиотензин II
ROS	реактивни кислородни видове

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Артериалната хипертония (АХ) е един от социалнозначимите проблеми, поради високата заболяемост, болестност, инвалидизация и смъртност. Високото артериално налягане трябва да бъде разглеждано като прогресиращ кардиоваскуларен синдром с не напълно изяснена етиопатогенеза, водещ едновременно до морфологични и функционални разстройства в сърдечно-съдовата система.

Хипертонията е основен рисков фактор за развитието на инсулт, миокарден инфаркт, периферна артериална болест, зрителни, бъбречни и други нарушения, което изисква прилагане на своевременна и адекватна терапевтична схема. АХ е изведена на първо място сред най-честите рискови фактори като причина за смърт във всички региони на света. Разходите, свързани с контрол на артериалното налягане, са значително по-ниски от разходите за лечение на усложненията.

За съжаление данните от много държави по света сочат, че по-малко от 30% от пациентите постигат добър контрол на кръвното налягане. В субанализ на артериалната хипертония в мащабното епидемиологично проучване PURE (Prospective Urban Rural Epidemiology), проведено в 17 страни на 5 континента и включващо над 140 000 пациенти, честотата на АХ е 40.8%, а с контролирана АХ са само 13.2% от болните (1).

Резултатите от проучването EUROASPIRE (European Action on Secondary and Primary Prevention by Intervention to Reduce Events) представят как европейските препоръки за профилактика на сърдечно-съдовите заболявания се въвеждат в реалната практика за лечение на пациентите с висок риск без коронарна болест на сърцето и при болните с доказана коронарна болест на сърцето. България участва в третата част на EUROASPIRE. За високорисковото население констатацията е тревожна. Предвид средната стойност на систолното налягане 145 mm Hg в цялата група на EUROASPIRE III, средното измерено систолно налягане в групата от България е 160 mm Hg (157.4 mm Hg при мъжете и 161.8 mm Hg при жените). Средната стойност на диастолното налягане е 87.7 mm Hg в цялата група на EUROASPIRE III, при средно измерено диастолно налягане в групата от България 96 mmHg (94.6 mm Hg при мъжете и 96.4 mm Hg при жените). С най-високи стойности на артериалното налягане е групата с високорискови пациенти от България .

Прогнозите са болните с АХ в световен мащаб да нараснат до 1.56 милиарда през 2025 г., т.е. увеличение с близо 60%, като успоредно с това нараства и делът на възрастните хора с АХ.

България е сред страните с висока обща смъртност и много висок дял на смъртност от сърдечно-съдови заболявания. Съществено е т.нар. *натрупване* на рискови фактори при пациентите с АХ. В нашата страна около 93% от хипертониците имат и други рискови фактори (затлъстяване, дислипидемия, тютюнопушене), като 57% имат над два допълнителни фактора. Кумулацията на рискови фактори многократно повишава глобалния сърдечно-съдов риск и поставя високи изисквания към терапевтичното поведение.

Сред основните цели на клинициста е да се подпомогнат хората с нисък сърдечно-съдов риск да задържат нивото му така максимално дълго, а на лицата с повишен риск – да го намалят. Редукция на систолното кръвното налягане с 10-12 mm Hg и на диастолното с 5-6 mm Hg понижава възникването на мозъчен инсулт с 39% и на сърдечно-съдови заболявания (вкл. миокарден инфаркт) с около 16%.

Предвид сериозността и глобалността на проблема трябва да се отбележи, че контролът на артериалната хипертония е решим проблем в съвременната кардиология. Правилното и ранно лечение на заболяването е крайъгълен камък при първичната и вторичната профилактика на сърдечно-съдовите заболявания. За част от пациентите с лекостепена АХ и без рискови фактори би била достатъчна модификацията в начина на живот. Например редукцията на теглото с около 1-2 kg може да понижи артериалното налягане средно с x1,6/1,3 mm Hg, съответно за систолно и диастолно. Промяната в начина на живот е трудно приложим, а понякога и недостатъчен подход, което налага своевременно провеждане на медикаментозна терапия.

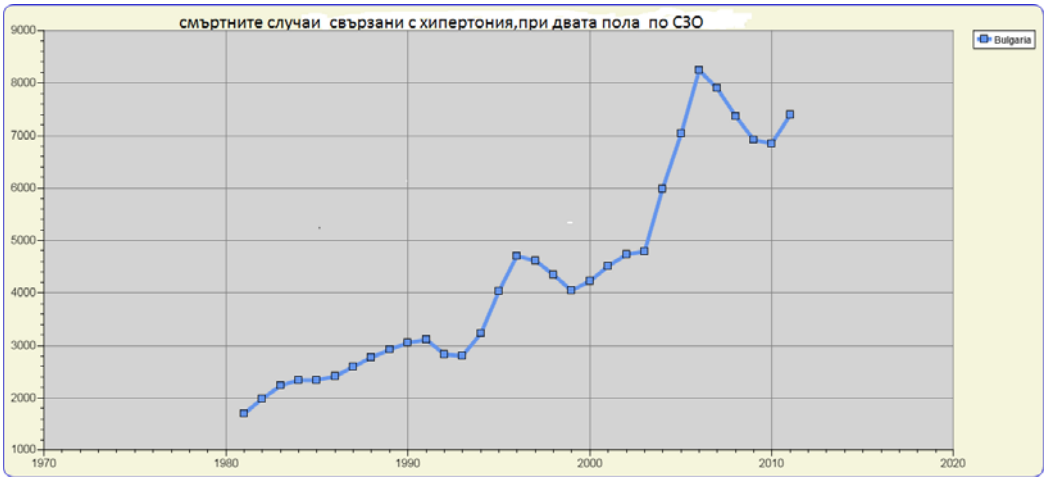
Поради утвърдената в редица проучвания базова роля на ангиотензин II в патологията на сърдечно-съдовата хомеостаза, не само що се отнася до системната циркулация, но и на тъканно ниво (участва в ремоделирането на сърцето и съдовата система при патологични състояния), приложението на АСЕ инхибитори се счита за една от най-успешните терапевтични възможности в лечението на хроничните сърдечно-съдови заболявания. Въпреки това по литературни данни около 20-40% от пациентите не се повлияват или не толерират терапевтично АСЕ инхибиторите (2). Тази констатация е причината за задълбочени проучвания по отношение патогенезата на АХ, като сред най-често разглежданите въпроси и дискусии са: алтернативните ангиотензин II образуващи пътища; генетичните фактори за есенциалната хипертония и техните взаимодействия с факторите на средата; състояния, потенциращи свободно-радикално инициирана ендотелна дисфункция и др.

В настоящия труд ще бъдат разгледани някои от широко дискутираните фактори с възможно отношение при терапевтичния толеранс към АСЕ инхибиторите с акцент върху ролята на I/D полиморфизма в АСЕ гена, оксидативния статус на пациента и активността на АСЕ независимите пътища.

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Епидемиология. Рискови фактори в генезата на АХ. Хипертензивен контрол

Артериалната хипертония (АХ) е основната причина за болестност и смъртност вследствие на усложнения като исхемична болест на сърцето (ИБС), мозъчни съдови усложнения, хронична бъбречна недостатъчност (ХБН) и сърдечна недостатъчност (СН) (3). Тя остава основния рисков фактор за сърдечно-съдова смъртност и на нея ежегодно се дължат 7,5 млн. смъртни случаи (4). Има тясна връзка между честотата на заболяването и смъртността от мозъчен инсулт (3). В световен мащаб около 22% от населението на възраст над 18 години е с повишено кръвно налягане (към 2014 г.), с малко по-висока честота при мъжете. (С най-висока честота е населението в Африка – 30%, а с най-ниска – Северна и Южна Америка – 18% и за двата пола) (World Health Organization. Health statistics and information systems. Достъпно на: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/ blood_pressure_text/en/ [15.08.16]) (5).

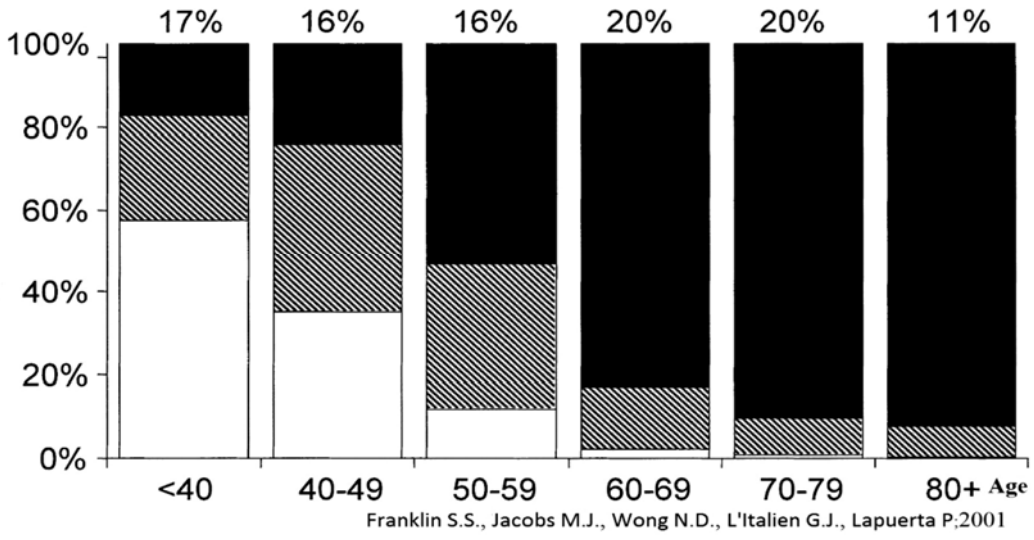


Фиг. 1. Смъртни случаи, свързани с хипертония. Статистика – СЗО Достъпно на: http://apps.who.int/healthinfo/statistics/mortality/whodpms/ [15.08.2016]

Въз основа на данните от NHANES III 42.7 млн. възрастни американци са диагностицирани с хипертония, което представлява 24% от възрастното население в САЩ. Общо 23,6% от хипертониците са лекувани с достигане на таргетни стойности на кръвното налягане. Общо от останалите – *нелекувани* (47,8%) и *недостатъчно лекувани* (28.6%) *болни*, 64,9% са с изолирана систолна хипертония, 21,1% са със смесена – систолна и диастолна хипертония, и 14,0% са с изолирана диастолна хипертония. Участниците ≥ 50-годишна възраст съставляват три четвърти от всички

пациенти с хипертония. "Най-възрастната група" е предимно от женски пол (58%), докато при "по-младата група" преобладават мъже (62.5%). Доминиращ хипертоничен подтип при по-възрастните е изолираната систолна хипертония – 79.8% (75% със степен 1 и 25% със степен 2 или повече АХ). В "по-младата група" преобладава изолирана диастолна хипертония – 42.8% (98% степен 1 и 2% степен 2 или по-висока). Този, свързан с възрастта модел на преобладаване на изолираната систолна хипертония при пациенти ≥ 50 години, не се наблюдава само при NHANES III, но и във Framingham Heart и в метаанализ от 10 други проучвания (SHEP, Syst-Eur и др.) на разпространението на ISH в 11 държави (6, 7).

Многобройни проучвания при пациенти над 50-годишна възраст показват, че повишеното систолно кръвно налягане е по-мощен предиктор на нежеланите сърдечно-съдови последствия, отколкото повишението на диастолното кръвно налягане, като лечението на изолирана систолна хипертония при възрастните хора намалява риска от сърдечно-съдови заболявания (6). В тази възрастова група пулсовото АН е допълнителен предсказващ фактор (3). По данни на СЗО средната стойност на систолното артериално налягане (САН) при населението на България през последните години е с тенденция към повишение и при двата пола.



Легенда:

■ изолирана систолна хипертония (SBP ≥ 140 mm Hg и DBP <90 mm Hg);

▧ смесен тип (систолна и даистолна) хипертония (SBP ≥ 140 mm Hg и DBP ≥ 90 mm Hg);

□ изолирана диастолна хипертония (SBP < 140 mm Hg и DBP ≥ 90 mm Hg).

Над колоните е дадено разпределението на нелекуваните хипертоници (в %) в съответните възрастови групи

Фиг. 2. Разпределение на честотата на нелекувани хипертоници по възраст и подтип хипертония по Stanley S. Franklin, Milagros J. Jacobs et al.; 2001 (6)

Разпространението на повишено кръвно налягане е по-високо в страните с ниски доходи в сравнение с държавите със среден и висок доход (WHO; PURE). Тревога буди и констатираното за населението на България. Проучването

EUROASPIRE III (проведено през периода 2006–2007 г.) показва лош контрол на хипертонията при пациенти с доказана коронарна болест на сърцето и при болни с висок коронарен риск. Анализът на хипертензивния контрол при пациенти с висок коронарен риск показва средно измерено систолно налягане в групата от България 160 mm Hg (157.4 mm Hg – при мъжете, и 161.8 mm Hg – при жените), при средна стойност за систолното налягане 145 mm Hg в цялата група на EUROASPIRE III. Докато средната стойност на диастолното налягане възлиза на 87.7 mm Hg в цялата група на EUROASPIRE III, средното измерено диастолно налягане в групата от България е 96 mm Hg (94.6 mm Hg – при мъжете, и 96.4 mm Hg – при жените). В сравнение с Германия и Румъния групата високорискови пациенти от България е с най-високи стойности на артериалното налягане. Стойности за диабетици САН/ДАН ≥ 140/90 mm Hg или ≥ 130/80 mm Hg са установени при 88.1% от високорисковите болни на България, в сравнение със 70.8% за EUROASPIRE III (77.2% за Германия) (8).

Таблица 1. Разпространение на АХ сред населението над 18 г. в България (артериалното налягане нараства с всяка следваща декада) – данни от СЗО – Достъпно на: http://apps.who.int/gho/data/node.main.A875?lang=en [15.08.16] (9)

	2010 г.	2014 г.
Мъжки пол	34,2 (25,8-43,0)	33,4 (22,5-45,0)
Женски пол	24,8 (17,8-33,0)	23,7 (14,7-34,6)
Общо за двата пола	29,4 (23,8-34,8)	28,4 (21,6-35,7)

Статистически значима разлика ($P < 0.05$) между България и другите анализирани държави в EUROASPIRE III се наблюдава по отношение на честотата на неконтролираната хипертония. С най-висок процент на приемащите антихипертензивна терапия е групата от България – 86.7% от диагностицираните пациенти. Делът на болните на терапия е значително по-висок от този на получаващите антихипертензивно лечение в Германия, Румъния и от средните резултати за EUROASPIRE III ($P < 0.05$). Контрол на кръвното налягане под прицелните стойности (САН < 140 mm Hg и/или ДАН < 90 mm Hg за недиабетици и САН < 130 mm Hg и/или ДАН < 80 mm Hg за пациенти с диабет) сред приемащите антихипертензивна терапия е постигнат при 12.1% от проучваните пациенти, срещу средно при 26.3% за EUROASPIRE III, 21.7% за Германия и 27.4% за Румъния. България заема водещо място и в групата на лицата с новооткрита (неоткрита) хипертония с 88% (8).

Притеснителен е и фактът за разпространението на хипертонията при лица под 18 години. През 2008 г. е проведено изследване за носителство на рискови за здравето фактори сред ученици на 14-18 г. и за нивото на техните знания, умения и навици за здравословен начин на живот във Велико Търново, Добрич, Ловеч, Габрово и Русе. Над половината от анкетираните деца са консумирали веднъж на ден и по-често тестени, а повече от 2/3 от тях – сладки храни. Ниска физическа активност през свободното време е констатирана при всяко второ момиче и всяко четвърто момче. Всеки трети от проучените ученици е редовен пушач, а всеки тринадесети ежедневно употребява алкохол. От анкетираните 10.1% са с високо нормално и повишено артериално налягане, а с наднормено тегло и затлъстяване – 18.7% от тях. При 2/3 от децата е установено носителство на един или два фактора на риска, допринасящи за възникването на хронични неинфекциозни болести (10).

Резултатите от PURE сочат, че едва 46.5% от хипертониците са били наясно с диагнозата си, като голяма част от тях (87,5%) получават фармакологично лечение, но контрол на кръвното налягане е постигнат едва при 32,5 % (1).

Съвместно с АХ се обсъждат множество допълнителни рискови фактори, водещи до сърдечно-съдови заболявания – мъжки пол, възраст, тютюнопушене, затлъстяване, дислипидемия, нарушен въглехидратен толеранс, захарен диабет, намалена физическа активност, фамилна анамнеза за ранно сърдечно-съдово заболяване и др. (3). Особена роля в патогенезата и еволюцията на АХ имат повишената активност на симпатиковата (11) и ренин-ангиотензин-алдостероновата системи.

По данни от REACH Registry АХ е най-честият рисков фактор при пациентите с коронарна болест – 80%, следвана от дислипидемията и тютюнопушенето. За съжаление, въпреки големия избор от хипотензивни медикаменти все още контролът на АН дори при болни с коронарна болест е под 50% по данни от EUROASPIRE Study group (12).

Анализ на контрола на дислипидемиите при пациенти с коронарна болест на сърцето поставя България на първо място (сравнена с Германия, Румъния и Гърция) с най-висока стойност на общ холестерол – 5.01 mmol/L (при средна стойност за EUROASPIRE III – 4.69 mmol/L), и LDL холестерол – 3.20 mmol/L (при среден LDL холестерол за EUROASPIRE III – 2.77 mmol/L); средният HDL холестерол в групата на коронарно болните от България е 1.12 mmol/L (при среден HDL холестерол за EUROASPIRE III – 1.16 mmol/L); средната стойност на триглицеридите при коронарно болните от България е 1.86 mmol/L (средни стойности на триглицеридите за EUROASPIRE III – 1.66 mmol/L). Измерената стойност на кръвната захар при пациентите с доказана коронарна болест в групата от България е 6.47 mmol/L, в Германия – 6.40 mmol/L, в Гърция – 6.39 mmol/L, в Румъния – 6.40 mmol/L. Част от пациен-

тите от България (27.6%), неопределящи се като диабетици, са с кръвна захар на гладно ≥ 7 mmol/L. Силно понижено е у нас приложението на статини при болни с коронарна болест на сърцето и при високорискови пациенти. Налице е пропаст между клиничните препоръки и тяхното практическо приложение. Върху лошия контрол на рисковите параметри повлиява и слабото познаване на таргетните стойности (8).

Таблица 2. Контрол на рисковите фактори при болните с висок коронарен риск – съпоставка между пациенти от България и средни стойности за EUROASPIRE III

	България	Средно за EUROASPIRE III
Общ холестерол	5,69 (mmol/L); 85,5%	5,41(mmol/L); P = 0.0002; 78,9%
LDL(по формула на Friedewald)	3,54 (mmol/L); 88,1%	3,31(mmol/L); P = 0,0008;80,5%
Дял на диабета	45.7%	38,7%

Изложената статистика е обезпокоителна предвид сериозността и глобалността на проблема. Като освен фактор, влошаващ качеството на живот, повишеното кръвно налягане активира цяла каскада патологични процеси в сърцето, съдовете, бъбреците, мозъка, които водят до органна увреда с повишена заболяемост и смъртност. Ето защо ранното и правилно лечение на артериалната хипертония е необходимо и важно в първичната и вторичната профилактика на сърдечно-съдовите заболявания. Установено от прогностичен модел, обхващащ 25-годишен период, е, че за периода 2004-2030 г. ИБС и МСБ ще запазят водещото си място сред първите 20 причини за смърт в световен мащаб (WHO). Важна роля в превенцията се отрежда на модификация на начина на живот и контрола на рисковите фактори.

2. Генетика на артериалната хипертония

От гледна точка на генетиката, артериалната хипертония е комплексно мултифакторно заболяване, за чието генетично предразположение имат значение много генни варианти в различни гени, както и фактори на околната среда. Наследствеността на есенциалната хипертония е добре документирана от редица фамилни проучвания и изследвания сред близнаци. Смята се, че 30-60% от случаите на АХ са унаследени (13). Wang и кол. (2008) представят убедителни данни за 2.4 пъти повисок риск от развитие на хипертония при потомци на двама родители с АХ. Тези данни представят по неоспорим начин генетичната база на АХ, но именно поради нейната комплексност, тя е все още не напълно изяснена и е обект на интензивни проучвания и днес (14).

Голям е напредъкът при изясняването на генетичната основа при моногенната хипертония. Известни са девет нарушения на единични гени, като седем от тях са характеризирани на функционално ниво. Въпреки множеството физиологични системи, включени в регулацията на артериалното налягане, интересно е, че абнормният генен продукт при всички тези нарушения засяга една и съща система – солевата хомеостаза в бъбреците (15).

Таблица 3. Моногенни форми на хипертония по Б. Георгиев и С. Захариева 2013 (15)

Синдром	Начин на унаследяване	Хромозома	Генен продукт	Синдром
Псевдохипоалдостеронизъм тип 2	Автозомно-доминантен	12p, 17q и 1q	WNK1, WNK4 кинази	Хипертония, ↑ K⁺, метаболитна ацидоза
Алдостеронизъм, лечим с глюкокортикоиди	Автозомно-доминантен	8q	Химерен протеин: алдостерон-синтаза и 11 β-хидроксилаза	Хипертония и други променливи признаци и симптоми
Клинично изявен минералкортикоиден излишък	Автозомно-рецесивен	16q	↓ 11 β-хидроксистероид-дехидрогеназа	Хипертония, ↓ K⁺, метаболитна алкалоза, ↓ ренин, ↓↓ алдостерон
Вродена надбъбречна хиперплазия	Автозомно-рецесивен	8q	↓ 11β-хидроксилаза	Хипертония и други променливи признаци и симптоми
		10q	↓ 11β-хидроксилаза	Хипертония, липса на полово съзряване, ↓ K⁺
Хипертония, утежняваща се от бременността	Автозомно-доминантен	4q	Абнормен минералкортикоиден рецептор	Ранна хипертония, усложнена от бременността
Синдром на Liddle	Автозомно-доминантен	16q	Абнормно епително натриево канале – понижен рецепторен клирънс	Хипертония, ↓ K⁺, метаболитна алкалоза, ↓ ренин, ↓ алдостерон
Мутации на PPARγ	Автозомно-доминантен	3p	Дисфункционален ядрен рецептор PPARγ	Хипертония, инсулинова резистентност, диабет тип 2
Хипертония и брахидактилия	Автозомно-доминантен	12p	Неизвестен	Хипертония, брахидактилия

моногенни форми на хипертония

Доц. Борислав Георгиев , проф. Сабина Захариева 2013

Известно е, че множество компоненти на регулаторната система на артериалното налягане проявяват генетична вариабилност, като всеки от тях е потенциален фактор за есенциалната хипертония. Теоретично мутация в ген или гени, кодиращи компоненти на системата за регулация на артериалното налягане, може да доведе до развитие на заболяването.

Генетиката на есенциалната хипертония се изследва интензивно посредством асоциативни проучвания и геномно сканиране на потенциални кандидат гени. Сред основните кандидат гени, имащи отношение към генетичното предразположение за есенциалната АХ, са сочени гени, чиито продукти участват във водно-солевия баланс, адренергичната рецепторна система, бъбречната каликреин-кининова система, за аденин и други системи, като липопротеиновата метаболитна система и растежни фактори (16). Ренин-ангиотензин-алдостероновата система (РААС) е основен механизъм за контрол на кръвно налягане и гени, кодиращи компоненти на тази система, са потенциални кандидат-гени за изследване на генетичната основа на хипертония. Голяма част от проучванията са фокусирани върху гените, кодиращи ренин (REN), ангиотензиноген (AGT), ангиотензин конвертиращия ензим (ACE), ангиотензин тип 1 рецептор (AGTR1) алдостерон синтетаза (CYP11B2) (табл. 4) (17).

Таблица 4. Гени, имащи отношение към генезата на есенциалната хипертония; Sandro Gonçalves de Lima et al. 2007 (17)



В тези гени са описани редица генни полиморфизми, като едни от най-често срещаните са еднонуклеотидни полиморфизми (SNP). Те могат да са резултат от вмъкване - инсерция на нуклеотид; делеция - загуба на нуклеотид, или субституция -замяна на нуклеотид

Някои от полиморфизмите асоциирани с есенциална хипертония са представени на табл. 5.

Таблица 5

Rs номер	Ген	Нуклеотидна промяна	Място в гена	Геномна локализация
rs3789678	AGT	C > T	интрон	g.5855 G > A (rs3789678)
rs2493132	AGT	C > T	интрон	g.11780A > G
rs699	AGT	T > C	екзон M235T	g.9543T > C
rs4305	ACE	A > G	интрон	g.8796A > G
rs4340	ACE	288 bp инсерция/делеция (I/D)	интрон	
rs275645	AGTR1	A > G	интрон	g.148746667G > A
rs5186	AGTR1	A > C	3'UTR	g.49331A >C

През последните години провеждането на големи геномни асоциативни проучвания (GWAS) създава възможности за откриване на най-често срещаните генетични варианти, асоциирани с АХ, които ще послужат като основа за разработване на клиничноприложими, диагностични и прогностични тестове за това заболяване. До момента са открити голям брой единични нуклеотидни замени в различни гени или

регулаторни области в генома, значително асоцииращи се с АХ. Част от тези полиморфни варианти са разположени в следните локуси и гени: 20q13.32, 11q22.1, 10p12.33, BAT3, HFE, PLCE1, 5q33.3, MOV10, CACNB2, 16q23.3, UMOD, FES, SLC39A8, 4q2 (24).Тези полиморфизми са обект на интензивни проучвания във връзка с честотата им в различните популации, отношението им към генната експресия и търсенето на асоциация с генетичната предразположеност към сърдечносъдови заболявания.

Р. Петкова, В. Ганев и съавт. акцентират върху необходимостта от съставяне на представителен панел от маркери за тестване на предразположението към най-често срещаните многофакторни заболявания и за изследване на фенотипно-генотипните връзки. Това би позволило създаването на обширни бази данни, които да увеличат капацитета за оценка на риска от социално значими заболявания (18).

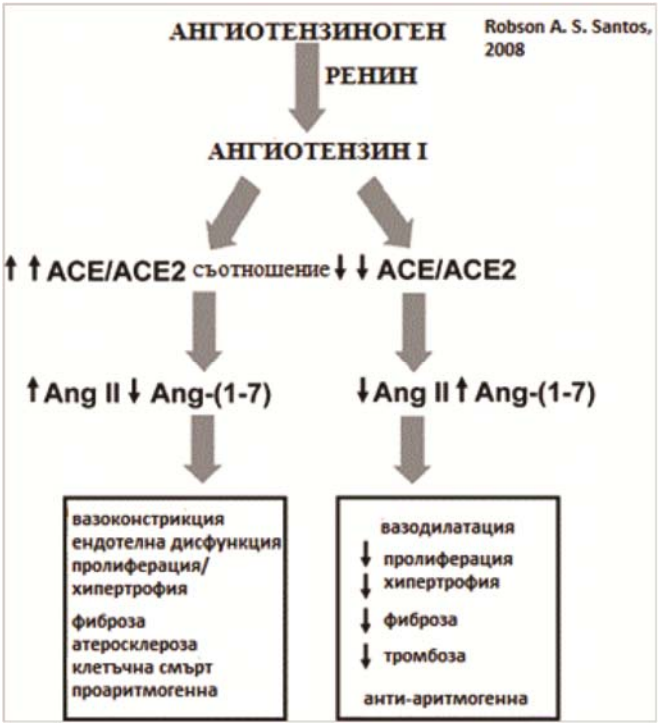
Генът за ангиотензин I-конвертиращия ензим (ACE)

Въпреки че ACE се счита за ензим при бозайници, близки по секвенции хомолози с много сходна активност са намерени в широк спектър животински видове. При Homo sapiens кодиращият ACE ген е разположен върху дългото рамо на хромозома 17 (17q23). Той е с дължина 21 KB и се състои от 26 екзона и 25 интрона. В архива на *Националния център за биотехнологична информация* (NCBI) са вписани над 160 ACE генни полиморфизма, повечето от които са единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs). Само 34 от тези полиморфизми са разположени в кодиращи региони; 18 от тях са “missense” мутации (19).

Генът кодира 2 изоформи на ACE: *соматични форма* (sACE), с молекулна маса от 170 kDa, която се изразява в соматични тъкани, и *тестикуларна форма* (тестис ACE [tACE], наречена също зародишна ACE [gACE]), с по-малка молекулна маса от 100 kDa, експресирана в зародишните клетки в тестиса. Тези две форми са резултат от инициация на 2 различни промотора. Детайлно функцията на tACE е неизвестна, но се счита, че има роля в мъжката репродукция (19).

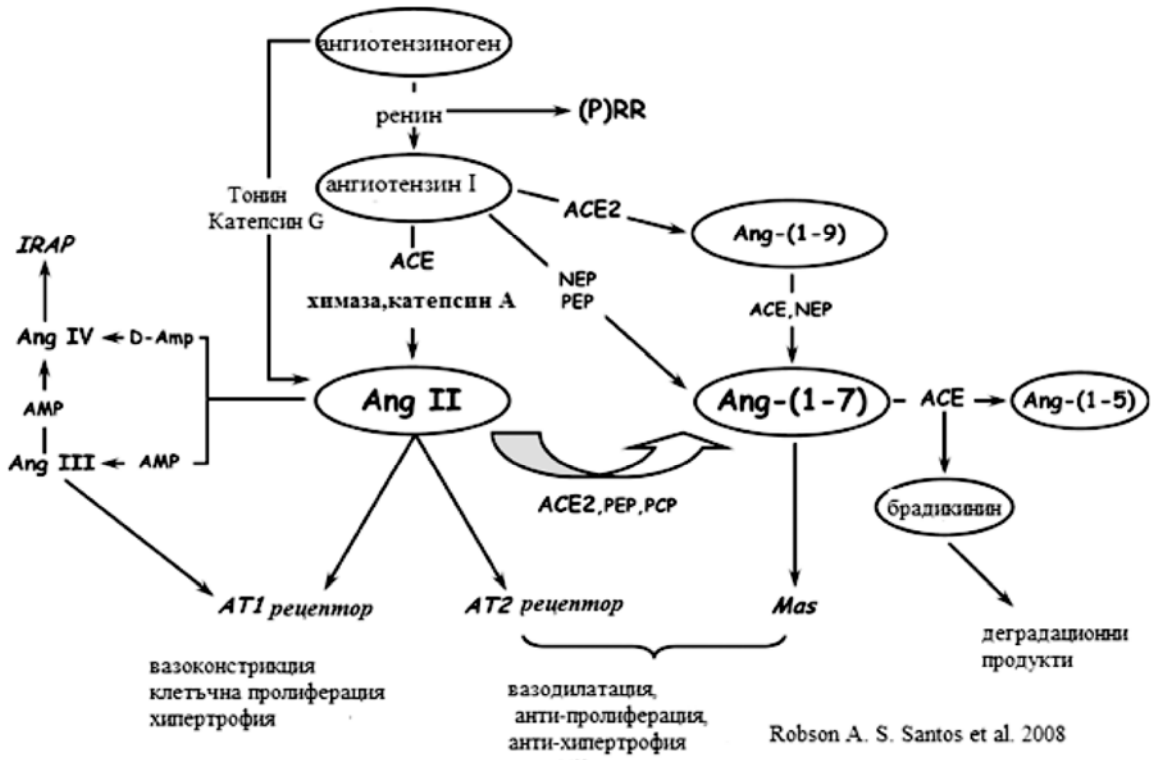
Хомолог на ACE – ACE2, е открит при хора. Анализ на геномна последователност на ACE2 разкри, че генът съдържа 18 екзона (maps to Xp22.22), някои от които имат значително сходство с размерите на първите 17 екзона на човешкия ACE (20). Откриването на този ензим ни информира за съществуването на ангиотензин пептиди, различни от Ang II, имащи биологична активност и физиологично значение. В опити с експериментални животни е установено, че мутациите в гена, отговорен за синтеза на ACE2, са асоциирани със сигнификантно потискане на сърдечния контрактилитет и с дисрегулация на хипоксия-индуцируемите гени в сърдечния мускул, което подсказва, че ACE2 има важна роля в регулирането на сърдечната функция (21).

ACE2 има два субстрата – ангиотензин I и ангиотензин II. In vitro проучвания показват, че каталитичната ефективност на ACE2 за Ang II е 400 пъти по-висока, отколкото за Ang I, т.е. основната роля на ACE2 е превръщането на ангиотензин II в ангиотензин 1-7 (чрез делеция на фенилаланин при С-край). Потенциалната роля на ангиотензин 1-7 е като кардиопротективен пептид, с вазодилататорна, анти-растежна и антипролиферативна активност. Освен ACE2 в неговото образуване участват и други ензими. Той се получава от Ang I под влияние на неутралната ендопептидаза (NEP), от Ang 1-9 под влияние на ACE и NEP, както и от Ang II под влияние на пропилкарбоксипептидаза. Ang 1-7 осъществява ефектите си чрез специфичен мембранен G-протеин-свързан рецептор, наречен Mas (MasR), кодиран от протоонкогена Mas (22). Ang 1-7 потенцира ефектите на брадикинина, увеличава продукцията на NO, предизвиква вазодилатация и потиска активирането на ERK1/2 от страна на Ang II. Проявява антипролиферативен, антиангиогенен и антитромботичен ефект и се явява кардиопротектор при исхемична болест на сърцето и при сърдечна недостатъчност (СН) (23). Счита се, че Ang 1-7 противодейства на ефектите на Ang II като това зависи от съотношението между активността на ACE→Ang II и ACE2→Ang 1-7 (фиг. 3 и 4).



Фиг. 3. Вазоконстрикторните/пролиферативни и вазодилататорните/антипролиферативни действия на РААС, опосредствани от Ang II и Ang (1-7) зависят от съотношението ACE/ACE2; по Robson A. S. Santos et al. 2008 (22).

ACE2 има много по-ограничено разпространение в сравнение с ACE. При хората ACE2 транскрипти са идентифицирани в сърцето, бъбреците и тестисите (19).



Съкращения: **AMP** – аминопептидаза; **AT1** – ангиотензин II рецептор тип 1; **AT2** – ангиотензин II рецептор тип 2; **Mas** – ангиотензин (1-7) рецептор Mas; **D-Amp** – дипептидил-аминопептидаза; **PCP** – пропил-карбоксипептидаза; **PEP** – пропил-ендопептидаза; **NEP** – неутрална ендопептидаза; **(P)RR** – проренин/ренин рецептор

Фиг. 4. Ренин-ангиотензиновата система по Robson A. S. Santos et al., 2008 (22)

С промяна на плазменото ниво на ACE и активността на ензима при хора е свързана инсерция/делеция в 287-BP последователност на ДНК в интрон 16 на локуса за ACE. Доказано е, че активността на ACE при хомозиготни по делеционната мутация лица е около два пъти по-висока от ензимната активност на хомозиготите по отношение на инсерционния алел. При хората, които са хетерозиготни – инсерционен/делеционен генотип, се установява умерена активност на ACE. Счита се, че повишената активност на ACE може да доведе до нарастване на нивото на ангиотензин II. Липсват все още доказателства, че тези полиморфизми имат важна роля в генезата на есенциалната хипертония при хора. По-голямата част от проучванията съобщават за сигнификантна асоциация на тези полиморфизми със сърдечно-съдовите инциденти, но не и с хипертонията (16) (табл. 6).

В проучване Jeunemaitre и сътр. не намират доказателства в подкрепа на връзката между ACE локуса и есенциална хипертония (25).

Schmidt и сътр. не успяват да установят значима връзка между I/D полиморфизма и кръвното налягане при пациенти с високо или ниско кръвно налягане и в тяхното потомство – *Dutch Hypertension and Offspring Study* 1993 (26).

Таблица 6. Проучвания, изследващи асоциацията между полиморфизма I/D и хипертонията; по Sandro Gonçalves de Lima et al. 2007 (17).



някои проучвания,изследващи асоциацията между полиморфизма I/D и хипертонията

автори	население (N)	генотип n (%) нормотензивни			хипертензивни			асоциация с хипертонията
		DD	DI	II	DD	DI	II	
Mondry et al, 2005[38]	Germany (1,355)	193 (26.8)	356 (49.5)	170 (23.6)	171 (26.9)	315 (49.5)	150 (23.6)	не е намерена асоциация
Agachan et al, 2003[29]	Turkey (194)	36 (42.4)	32 (37.6)	17 (20.0)	49 (45.0)	59 (54.1)	1 (0.9)	асоциация с генотип II (X^2 20.66; p= p=0.000).
Castellano et al, 2003[46]	Italy (2,390)	247 (41.0)	272 (46.0)	77 (13.0)	747 (42.0)	812 (45.0)	235 (13.0)	не е намерена асоциация
O'Donnell et al, 1998[37]	USA (3,094)	484 (28.4)	882 (51.8)	336 (19.7)	445 (32.0)	682 (49.0)	265 (19.0)	генотип DD-с увеличен риск за хипертония при мъже , но не и при жени (OR: 1.59; CI 95%: 1.13-2.23).
Freitas et al, 2007[59]	Brazil (205)	12 (10.5)	52 (45.2)	51 (44.3)	13 (14.3)	46 (50.5)	31 (34.1)	не е намерена асоциация(OR 0.70; CI 95%: 0.28-1.75)
Freitas et al, 2007[60]	Brazil (160)	4 (5.1)	13 (16.7)	61 (78.2)	8 (9.8)	27 (32.9)	47 (57.3)	асоциация с генотип DD (p=0.019)

p - Comparison between cases and controls.

Sandro Gonçalves de Lima et al. 2007

Таблица 7. Брой публикувани положителни (+) и отрицателни (-) проучвания при хора (потвърждаващи или отричащи връзка между I/D полиморфизъм и кръвното налягане). Позоваванията са цитирани за период от 1997 г. Agarwal et al. 2005 (27)

Гени, предполагаеми участници в генезата на АХ	
Ген или протеин (система PAAC)	Асоциация (+/-)
Ангиотензин-конвертиращ ензим (ACE)	12/14
Ангиотензиноген (AGT)	13/9
Алдостерон синтетазен ген	6/7
AT1 рецептор (AT1R)	6/6
a-адуцин (ADD1)	5/3
b-адуцин (ADD2)	0/1
атриален натриуретичен пептид	2/5
човешки натриуретичен пептид рецептор (A)	1/1
човешки натриуретичен пептид рецептор (B)	1/2
ренин (REN)	2/2
11-b хидроксистероид дехидрогеназа тип 2	2/2

A. Agarwal и сътр. (2005) в "Генетиката на човешката хипертония" вписват изцяло нов набор от 26 асоциативни проучвания, от които 12 в подкрепа на наличието на връзка и 14 с отрицателни резултати (27). Авторите обобщават онлайн информация от „Националната библиотека по медицина", използвайки търсачките PubMed и Ovid. Обхванатият период е от 1996 до ноември 2004 г., като търсените ключови думи са "хипертония, гени, генетика и полиморфизъм". Разглежданите ста-

тии са на английски език, категория „човешка генетика“. Избрани се проучвания, обхващащи минимум 100 пациенти с есенциална хипертония, сравнени с нормотензивни контроли.

Многобройни проучвания изследват връзката между ACE I/D полиморфизма и атеросклерозата чрез измерване дебелината интима–медия на каротидната артерия (IMT). Отчетена е положителна асоцииация между алел D и общата IMT в метаанализ от 23 публикувани статии до октомври 2002 г. Връзката е по-силна сред високорискови групи от населението (т.е. пациенти с основни заболявания като мозъчносъдови, диабет или хипертония) (28).

Проучване, проведено сред 860 пациенти и 852 контроли в Португалия установявя, че генетичните варианти ADD1 G460W, GNB3 C825T, ACE I/D, ACE A2350G са свързани с артериална хипертония (29).

През 2019 г. Rubia Umburanas и съавт. разглеждат отношението между полиморфизма на инсерция/делеция (I/D) в ACE гена и различни типове пациенти с хипертония – хипертоници с нормално телесно тегло – 30 пациенти, хипертоници със затлъстяване - 24, хипертоници с диабет тип 2 – 29 души. Контролната група е от 29 нормотензивни доброволци. Авторите не установяват връзка между честотата на D алела и систолното кръвно налягане, като изказват предположението, че водещи в генезата на хипертонията са факторите на околната среда (30).

Метаанализ, обединяващ резултатите от статии, публикувани през май 2018 г. в PubMed, Scopus и EMBASE, представя връзка между ACE I/D полиморфизма и есенциална хипертония в Африка. Пациентите с алел D са с 1,49 пъти по-голяма вероятност за развитие на есенциална хипертония в сравнение с носителите на алел I. Пациенти, които имат хомозиготен кодоминантен генотип DD, са с 2.17 пъти по-висок риск от есенциална хипертония в сравнение с генотип II (31).

Генетичните изследвания на артериалното налягане хвърлят нова светлина върху молекулните механизми и неговия контрол. Чрез проучванията си нашият екип си постави за цел да продължи изследването на връзката между полиморфизма I/D и хипертонията и да оцени влиянието на този полиморфизъм върху терапевтичния отговор към лечението с ACE инхибитори при пациенти от българската популация. Фармакогенетиката потвърди потенциала на генетичното профилиране на пациента с цел прогнозиране на отговора към медикаментозна терапия.

3. Роля на ренин–ангиотензин–алдостероновата система (РААС)

3.1. Кратки исторически данни за РААС

РААС има забележителна история, датираща от над 100 години, която започва с откриването на ренин в сурови бъбречни екстракти през 1898 г. През 1934 г. Goldblat доказва, че бъбречен хуморален фактор провокира повишаване на системното артериално налягане. През 1960 г. Larach в САЩ и Genest в Канада самостоятелно доказват, че ангиотензин II (А II) е специфичен и мощен стимулатор на алдостероновата секреция и установяват, че секрецията на алдостерона се контролира предоминантно от ренин–ангиотензиновата система. Ангиотензин III е открит през 70-те години на XX век (32).

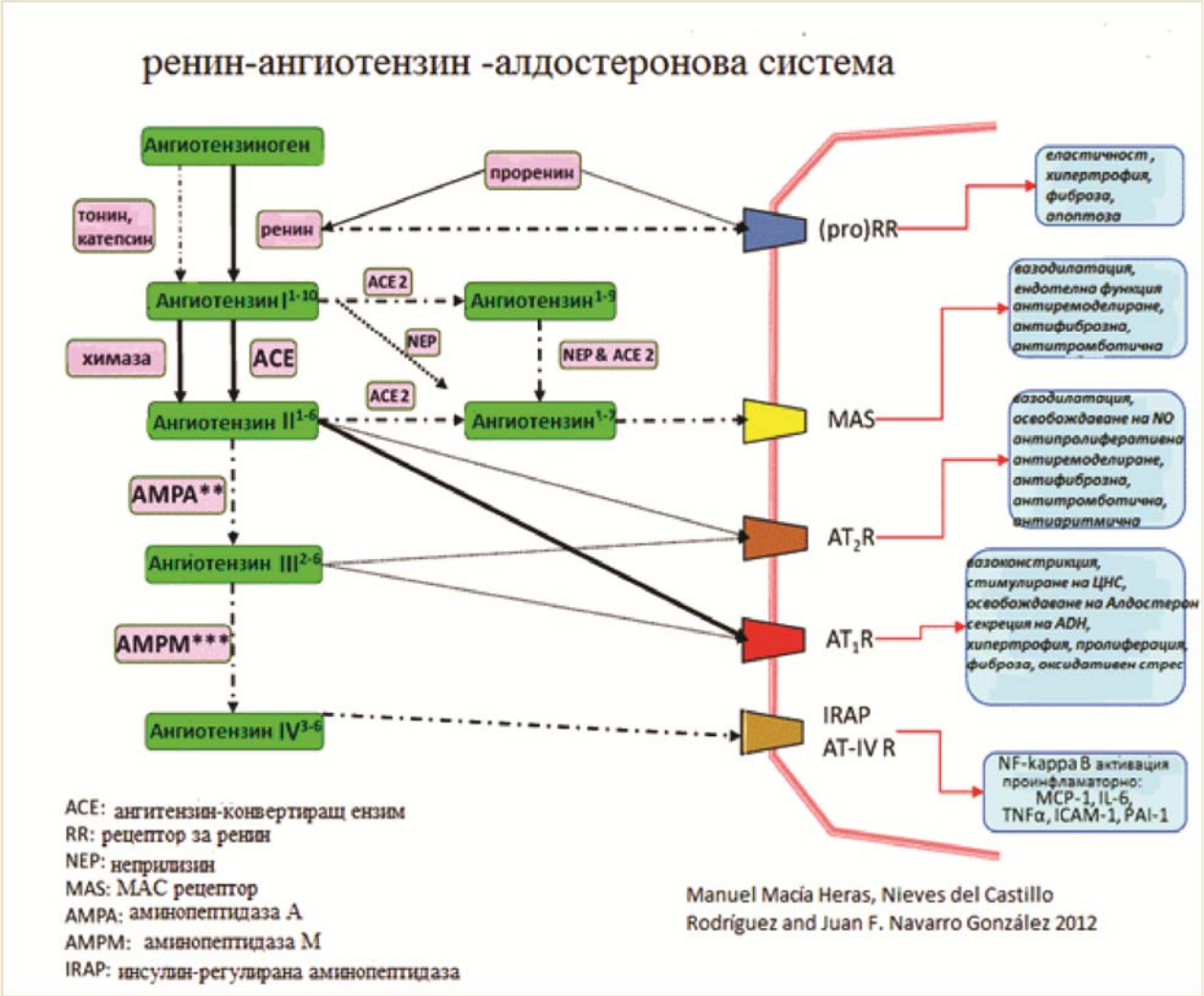
3.2. Компоненти на РААС

Днешните схващания за основните компоненти на тази сложна регулаторна система са обобщени на фиг. 5. Основните физиологични действия на ангиотензин II, включително вазоконстрикторните ефекти, стимулирането на секрецията на алдостерон от надбъбречната жлеза, задръжката на сол и вода и стимулирането на растежа, са медиирани от АТ1 рецептора. АТ1 рецепторите са повсеместно разпространени в целия организъм, включително кръвоносните съдове, сърцето, бъбреците, надбъбречната жлеза, черен дроб, мозъка и белия дроб. АТ2 рецепторите посредничат за голямо разнообразие от дейности, в това число вазодилатация, инхибиране на клетъчния растеж, клетъчна диференциация и апоптоза. Въпреки свободното експресиране по време на феталното развитие АТ2 рецепторната експресия се намалява след раждането, като по този начин позволява на АТ1 рецепторите да преобладават. Няколко патологични състояния, като например исхемична болест на сърцето, дилатативна кардиомиопатия и предсърдно мъждене, са свързани с повишена АТ2 рецепторна експресия (33).

Ренин

Първичната структура на рениновия прекурсор се състои от 406 аминокиселини и има пре- и просегмент, изградени съответно от 20 и 46 аминокиселини. Активната форма на ренина се състои от 340 аминокиселини и има маса от 37 kDa (Imai T, Miyazaki H. 1983). В класическия път на РААС ренин се секретира от юкстагломерулния апарат на бъбреците (полуживот 80 min) и действа върху циркулиращия

прекурсор ангиотензиноген за генериране ангиотензин. Ренинът хидролизира Leu10-Val11 връзка на ангиотензиногена за генериране на декапептид AI (34).



Фиг. 5. Компоненти на РААС, по Manuel Macía Heras et al. 2012 (34)

Секрецията му се повишава в отговор на намаляване АН, вкл. хиповолемия, детектирано от барорецептори, намаляване нивата на натриев хлорид в ултрафилтрата на нефроните (отчетено от macula densa на юкстагломерулния апарат), стимулация от симпатиковия дял на ВНС (35).

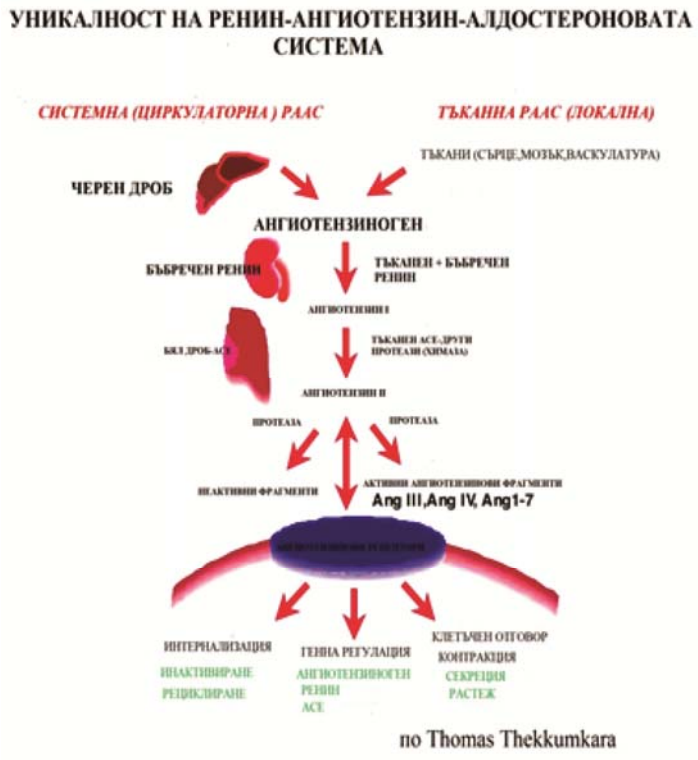
Ангиотензиноген

Ангиотензиногенът е α-2-глобулин, произвеждан постоянно главно в черния дроб и освобождаван в кръвообращението.Той е член на семейство серпини, въпреки че не е известно да инхибира други ензими, за разлика от повечето серпини. Плазмените нива на ангиотензина се увеличават от плазмени кортикостероиди, естрогени, хормони на щитовидната жлеза и нивата на ангиотензин II (36). Хепаталната синтеза на ангиотензиноген е увеличена при системни инфекции и възпаления, което подсказва все още неизяснена връзка между тези състояния и RAS.

3.3. Локална (тъканна и органна) ренин-ангиотензиновата система

Концепцията за "местна, локална" ренин-ангиотензинова система може да означава "различни неща за различните хора" (37). Нейната основна цел е да се разграничат "локалната" РААС, действаща в тъкани, и класическата "циркулираща" РААС, но е трудно да се направи ясно разграничение между двете системи, поради широкото им застъпване. В циркулиращата РААС се включва бъбречно синтезираният ренин, действащ на ангиотензиногена (получен от черния дроб), за генериране на ангиотензин А I, който се превръща в А II от ангиотензин-конвертиращия ензим (АСЕ). Въпреки това Campbell счита тъканите за основно място на производство на ангиотензин, като плазменият ренин действа върху получения плазмен ангиотензиноген за генериране на ангиотензин I, който се превръща в Ang II от ендотелния АСЕ (37).

Изследователите отнасят много физиологични и патофизиологични функции на местните РААС включително възпаление, фиброза, пролиферация, диференциация или дори апоптоза. Локални РААС физиологично са намерени в почти всички части на тялото, включително: надбъбречната жлеза, панкреаса, сърцето, кръвоносните съдове, бъбреците, нервната система, репродуктивната система и много тъкани – например мастната тъкан (38).



Фиг. 6. Циркулаторна и тъканна РААС по Thomas Thekkumkara (39)

4. Инхибиторите на РААС при хипертония

4.1. Кратки исторически данни

Внедряването в клиничната работа на АСЕ инхибиторите стартира през 1965 г., когато бразилският учен Ferreira открива способността на отровата от кротала Bothrops Jararaca да „стабилизира“ брадикинин (40). Години по-късно (1971 г.) в лаборатория на фирма “Squibb” е синтезиран първият АСЕ инхибитор – тепротид, отделен непосредствено от отровата на змия Bothrops Jararaca. Макар и с усточив хипотензивен ефект, токсичното действие на този инхибитор възпрепятсва приложението му в клиничната практика. През 1975 г. в същата лаборатория е създаден първият перорален АСЕ инхибитор SQ14.225 – “Каптоприл”, като по-късно са синтезирани и други два – “Еналаприл” и “Лизиноприл“

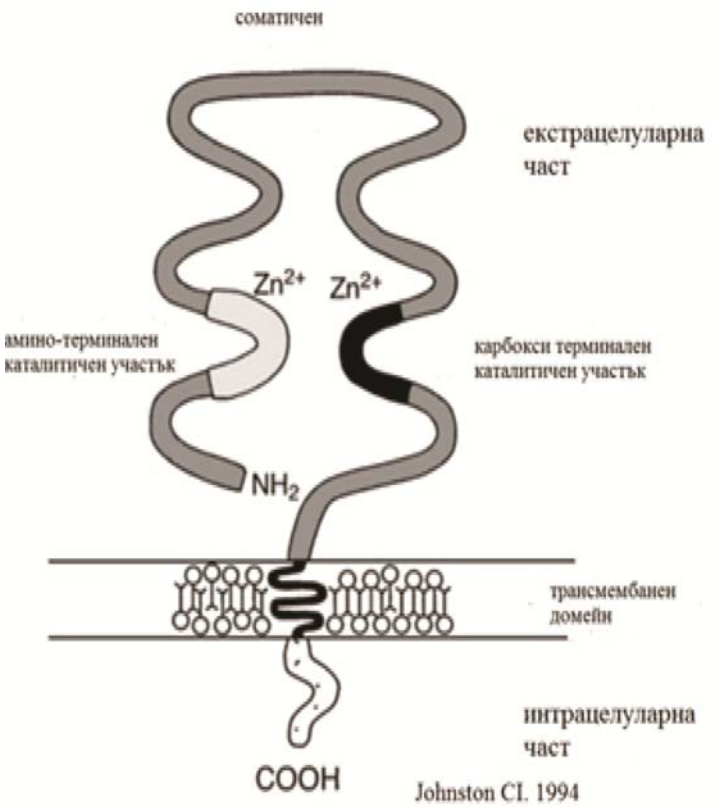
4.2. Действие на АСЕ инхибиторите

АСЕ инхибиторите са медикаменти, които потискат превръщането на ангиотензин I в ангиотензин II, който е един от най-силните биологични артериални и в по-малка степен венозни вазоконстриктори. Освен намаляване на плазмените и тъканни концентрации на ангиотензин II, медикаментите от този клас редуцират разпадането на брадикинините, които са локални тъканни вазодилататори. Не на последно място АСЕ инхибицията стимулира освобождаването на NO, имащ вазодилататорен и протективен върху ендотела ефект (41). Основното действие на АСЕ инхибиторите се базира на инхибирането на ключовия ензим за ренин-ангиотензин-алдостероновата система (РААС) – ангиотензин конвертиращия ензим.

4.2.1. Ангиотензин-конвертиращ ензим

Ангиотензин-конвертиращият ензим (АСЕ, дипептил карбоксипептитаза I, кининаза II) е металопротеаза, разположена в съдовия ендотел (особено в съдовете на пулмоналното кръвообращение) (42). Тази хидролаза превръща неактивния декапептид ангиотензин I (АТ I) в биологично активния АТ II – най-мощния естествен вазоконстриктор. Въпреки че АСЕ може да се изолира от плазма, той съществува основно в тъкани, разположен е в ендотела на всички кръвоносни съдове, както и в паренхима на сърцето, бъбреците, мозъка и надбъбречните жлези. АСЕ е закрепен към плазмената мембрана на тези клетки и може да бъде точно определен като „тъканен“ АСЕ. Структурно АСЕ е голям гликопротеин, който обхваща клетъчната мембрана. По-голямата част на ензима се състои от две почти идентични части,

всяка от които съдържа активно каталитично място, което се свързва с атом цинк (фиг. 7). Интрацелуларно е разположена терминална карбокси опашка. Двете каталитични места са различни и се състоят от хидрофобни амино- или карбоксилни терминални свързващи участъци. Афинитетът на АСЕ инхибитора зависи от свързването на сулфхидрил-карбоксилна- или фосфосъдържаща група на N-края на АСЕ инхибитора с цинков атом, както и свързването на отрицателно зареден С-край от АСЕ инхибитора изисква положително зареден остатък от АСЕ (43).



Фиг. 7. Тъканен АСЕ по Johnston CI. 1994 (43)

АСЕ е установен както като мембранносвързан ензим в ендотелни клетки и различни видове епителни и нервноепителни клетки, така също и в циркулираща форма в биологични течности, например плазма и околоплодна или семенна течност. Механизмите, водещи до биосинтез на циркулиращата форма на АСЕ, са все още неясни, но всички налични данни показват, че неговата структура е много подобна на клетъчната форма. Измерването на плазмената концентрация на АСЕ е широко използван метод за диагностика и проследяване на заболявания като саркоидоза (при това заболяване често се наблюдава повишаване на ензима). Въпреки че плазмените концентрации на АСЕ са изключително стабилни, измерени многократно при нормален субект големите индивидуални различия е трудно да се тълкуват, като референтният интервал за нормални стойности е голям. Резултатите от проучване, проведено при голяма извадка от здрави семейства, показват вътрефа-

милна прилика между нивата на ACE и предполагат също така, че те са предмет на ефекта на основен ген (44).

Редица изследвания утвърждават базовата роля на ангиотензин II в патологията на сърдечно-съдовата хомеостаза не само що се отнася до системната циркулация, но и на тъканно ниво той участва в ремоделирането на сърцето и съдовата система при патологични състояния (2). Ето защо инхибиторите на ACE се утвърждават като една от най-успешните терапевтични възможности в сърдечно-съдовата патология. Въпреки това около 20-40% от пациентите не се повлияват или не толерират терапевтично този клас медикаменти (2).



Фиг. 8. Разпределение тъканен/плазмен ACE по Victor J. Dzau, Kenneth Bernstein et al. 2002 (43)



Фиг. 9. Разпределение на общата активност по Victor J. Dzau, Kenneth Bernstein et al. 2002 (43)

4.2.2. Алтернативни ангиотензин II-образуващи пътища. Видова и органна специфичност

Проучвания показват, че в различните тъкани съществуват алтернативни ангиотензин II-образуващи пътища, чийто отговорен (конвертиращ) ензим е различен от ACE и най-често е видово и органно специфичен. При човека се наблюдава много високо локално ангиотензин II-формиране в сърдечната тъкан с ключов ензим – химаза (2). Подходящ животински модел за сърдечно-съдови експерименти за изучаване на човешката химаза са сирийски хамстер, плъх Sparague-Dawley, японски бял заек, свине Yorkshire, възрастни кучета (mangrel) и мармозети. Химазите по своята същност са протеази, които се съхраняват в цитоплазмените гранули на мастоцитите. При стимулиране на последните настъпва дегранулация и в околните тъкани, като в цикулацията се отделят продукти като триптаза и химаза (които могат да имат вредно въздействие върху съдовата структура), както и други медиатори – цито- и хемокини, преципитиращи съдовото възпаление. За вникване в механизма на мастоцитното участие в сърдечно-съдовата патология експериментално са разработени мишки без мастоцити (45). Мастоцитите могат да се активират от различни стимули. Най-честият механизъм е кръстосано свързване на IgE рецептори с експресираните от мастоцитите Fc сегменти (46). Налице може да е пряко разпоз-

наване на Ag-PRRS рецептори (47) или чрез toll-подобни (toll-like) рецептори (TLRs). TLRs са клас протеини, играещи ключова роля в естествената имунна система. Те са единични, некаталитични, мембранно свързани рецептори, експресирани обикновено върху макрофаги и дендритни клетки. При активиране, чрез адапторни протеини медиират антиген-индуциран сигнален трансдукционен път. Тези рецептори разпознават молекули, които са свързани със „заплаха“ (т.е. патоген или клетъчен стрес) и са високо специфични.

В настоящия труд е акцентирано върху активирането на мастоцитите посредством ендогенни пептиди, включително невротензин, субстанция Р (47), ендотелин 1 (48) и други продукти на възпалението. Реактивните кислородни видове (ROS) също могат да активират мастоцитите (49).

Изложените твърдения водят до заключението че in vivo, при базови условия ангиотензин II се генерира с участието на ACE, но при възпалителни състояния дегранулацията на мастоцитите усилва местните тъканни ангиотензин II концентрации. Това стимулира клинициста към алтернативен избор на терапия при заболявания или състояния, протичащи с повишена секреция на инфламаторни фактори – употреба на ангиотензин-рецепторни блокери (АРБ). Повечето автори се изразяват против лекарствената замяна и като аргументация изтъкват повишаването на брадикинина и NO синтез, които фактори не се наблюдават при АРБ. Също така се подлагат на съмнение резултатите от проведените експерименти, понеже се базират на опити върху миши кремастерни съдове, които на практика не са предразположени към атеросклероза. Множество са клиничните проучвания ACE инхибитор или АРБ е по-подходящ при различните сърдечно-съдови заболявания. Изяснено е, че комбинирането им крие повече негативи отколкото ползи. Необходимо е търсенето на нови варианти, например допълнително фармакологично стабилизиране на мастоцитите (50).

5. Оксидативен стрес и сърдечно-съдови заболявания

5.1. Оксидативен стрес

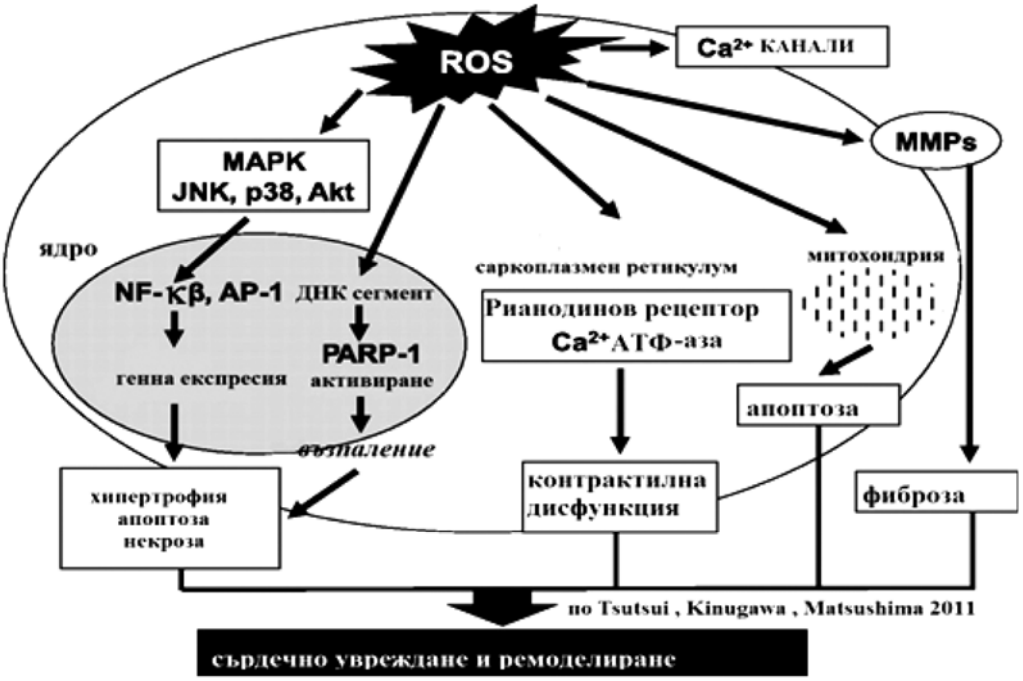
Според Schramm и съавт. оксидативният стрес представлява молекулна дисрегулация на метаболизма на ROS, която играе ключова роля в патогенезата на атеросклерозата, васкуларното възпаление, ендотелната дисфункция и се характеризира с намаление на бионаличността на NO (51). Големите клинични проучвания като HOPE (2000) и HPS (2002) не показват клинична полза от употребата на антиоксиданти като витамин С и витамин Е и поставят под въпрос ролята на оксидативния стрес при сърдечно-съдови заболявания (52). Промяната в разбирането на мо-

лекулния характер на оксидативния стрес се дължи на резултатите от тези проучвания (51). Според Schramm et al. оксидативният стрес вече не се възприема като обикновен дисбаланс между продукцията и елиминирането на ROS, а и като дисфункция на ензимите, участващи в производството им. Ключова роля е отредена на NADPH оксидазата, поставяйки я и в основата на дисфункцията на други оксидази, включително „дисоциация" на ендотелната NOS (eNOS), ксантиноксидаза и митохондриална дисфункция (51). Следователно оксидативният стрес е термин, използван за обяснение на условия, при които съществува нарушен баланс между клетъчните нива на оксиданти и антиоксиданти (53), при което биват нарушени електронният трансфер, клетъчната и ензимната функция. U. Förstermann определя окислителния стрес основно като резултат на дисбаланс между активността на ендогенни прооксидантни ензими (като NADPH оксидаза, ксантиноксидаза или митохондриална дихателна верига) и антиоксидантни ензими [супероксид дисмутаза (SOD), глутатион пероксидаза, хем оксигеназа, тиоредоксин пероксидаза (пероксиредоксин), каталаза, параоксоназа] в полза на първите (54).

5.2. Физиологично значение на ROS. Състояния свързани с дисрегулация на ROS метаболизма

Harrison и сътр., отчитайки цитотоксичната роля на ROS, изтъкват и тяхната ключова роля за нормалното съществуване и функциониране на клетките (53). Супероксидът и H_2O_2 могат да действат като сигнални молекули, да активират генната транскрипция чрез транскрипционни фактори [активатор протеин 1 (Ap-1), ядрения фактор кВ (NF-kB) и др.] (55); участват в регулацията на клетъчния растеж, ендотелната функция, възпалителния отговор, отлагането на екстрацелуларен матрикс (53). Touyz акцентира, че молекулни процеси, свързани с ROS, предизвикват съдови промени, включително чрез активиране на редокс-чувствителни сигнални пътища (каскадни процеси) (56). Според този изследовател, супероскида и H_2O_2 стимулират и митоген-активирани протеинкинази (които от своя страна регулират транскрипцията), тирозин-кинази, инактивират протеин-тирозин-фосфатазата (57, 58).

H_2O_2 може да действа като директен вазодилататор в някои съдови легла, включително церебралната, коронарната и мезентериалните артерии (60), докато увеличените съдови нива на O_2^{-} инактивират вазодилататора NO и респективно водят до дисфункция и вазоконстрикция (61, 62). ROS са способни да понижат клетъчната енергия с последващо нарушаване на клетъчните способности за поддържане на калциевите и други йонни градиенти (63).



Съкращения: **МАРК** – митоген-активирани протеин кинази; **JNK** – ядрена киназа; **PARP-1** – поли (ADP-рибоза) полимераза-1; **MMP** – матрични металопротеинази; **AP-1** – активатор протеин-1

Фиг. 10. ROS-медиирано сърдечно увреждане и ремоделиране, по Tsutsui H. et al. 2011 (59)

ROS активират протоонкогени и проинфламаторна генна експресия (56, 57). Тези процеси протичат чрез окислителна модификация на протеини, промяна на важни аминокиселинни остатъци индуциране на протеин-димеризация, взаимодействие с метални комплекси, като Fe-S остатъци. Промени във вътреклетъчното редокс-състояние чрез тиоредоксин и глутатион системите може да окаже влияние върху сигнални пътища (58).

5.3. Синтез на NO-условия и функция

Основният реактивен азотен вид (RNS) е мощен NO вазодилататор, отговарящ за ендотел-зависимата вазорелаксация. Азотният оксид притежава също противовъзпалителни и антимитогенни свойства и поради своята уникалност е обявен за молекула на годината през 1992 г. (64).

NO е най-малката известна сигнална молекула и се получава от три изоформи на ензима NOS. Всички използват L-аргинин и молекулярен кислород като субстрати и като кофактори изискват редуциран никотинамид-аденин-динуклеотид фофат (NADPH), флавин аденин динуклеотид (FAD), флавин мононуклеотид (FMN) и 5,6,7,8-тетраходробиоптерин (BH(4)). Всички NOS свързват калмодулина и съдържат хем.

Невроналната NOS (n NOS, NOS I) се експресира в централните и периферните неврони и в някои други видове клетки. Функцията на ензима включва синаптична пластичност в централната нервна система, централно регулиране на кръвното налягане, гладкомускулна релаксация и вазодилатация чрез периферни нерви (значение в релаксацията на кавернозното тяло и ерекцията на пениса).

Индуцируемата NOS (NOS II) може да бъде експресирана в много клетъчни типове в отговор на липополизахариди, цитокини и други агенти. Индуцируемата NOS генерира големи количества NO, които имат цитостатичен ефект върху таргетни „паразитни клетки". NOS II допринася за патофизиологията на възпалителните заболявания и септичния шок.

Ендотелната NOS (NOS III, eNOS) се експресира основно в ендотелните клетки. Тя способства за вазодилатацията, контрола на артериалното кръвно налягане и има множество антиатеросклеротични ефекти. NOS III е димер, състоящ се от два идентични мономера, които могат да бъдат функционално (и структурно), разделени на две основни области: С-терминален редуктазен домейн и N-терминален оксигеназен домейн. Много сърдечно-съдови рискови фактори водят до оксидативен стрес, „дисоцииране" на eNOS и ендотелна дисфункция в съдовете (65). Vasquez-Vivar, Andrew и съавт. считат, че трите NOS изоформи са в състояние да се „разединяват". Съществена характеристика на NOS е, че въпреки способността на редуктазния и оксигеназния домейн да функционират независимо при определени обстоятелства синтетазната активност за NO се извършва от хомодимера. В различните етапи на съединяване на двата домейна могат да се формират различни токсични продукти. В присъствието на хем се образува димер с NADPH оксидазна активност – продуцира се $O_2^{\cdot-}$. Ниските нива на BH_4 водят до образуването на стабилен димер, катализиращ едновременно производство на NO и $O_2^{\cdot-}$. При високи BH_4 нива ензимът действа само като NO синтаза (66).

К. Мотрекар и съавт. проучват връзката на често срещаните полиморфизми в синтеза на ендотелен азотен оксид (eNOS; G894T) като рискови фактори в патогенезата на коронарната артериална болест при български пациенти. Установено е, че полиморфизмите eNOS G894T и ACE I/D са свързани с повишен риск от развитие на остър коронарен синдром, след адаптиране към класическите рискови фактори за атеросклероза в българската кохорта (67).

Трите изоформи на NOS са наименовани въз основа на тъканите, в които са описани за първи път. Sugamura и John, позовавайки се на трудовете на O. W. Griffith и съавт., считат, че в повечето сърдечно-съдови тъкани са експресирани и конститутивно присъстват nNOS и eNOS, но с различна субклетъчна локализация. За

разлика от тях NOS II обикновено липсва и се индуцира от провъзпалителни медиатори (68, 69).

Азотният оксид може да се генерира и от други окислително-редукционни ензими, включително ксантин оксидаза (70).

5.4. Ендотелна дисфункция

Терминът *ендотелна дисфункция* (ЕД) се използва за обозначаване на няколко патологични състояния, включително променени антикоагулантни и противовъзпалителни свойства на ендотела, нарушено модулиране на съдовия растеж и нарушена регулация на съдовото ремодилиране (71). Въпреки това Cai и Harrison отчитат, че в голяма част от литературата този термин бива използван за обозначаване на увреждане на ендотел-зависимата вазодилатация, причинена от загуба на биологична активност на NO в стената на съда. Позовавайки се на резултатите от някои изследвания върху хора тези изследователи твърдят, че традиционните рискови фактори за атеросклероза предразполагат към ЕД. Нарушената ендотел-зависима вазодилатация в коронарното кръвообращение при човека прогнозира неблагоприятни сърдечно-съдови инциденти в дългосрочен план (71).

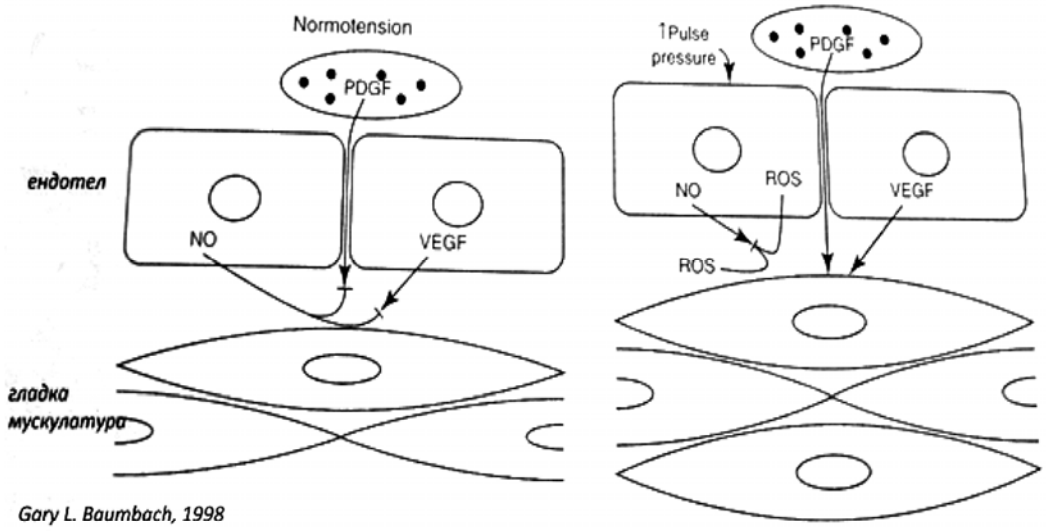
Според Madau и сътр. (72) патогенезата на ЕД е многофакторна, но оксидативният стрес се поставя в основата на клетъчен механизъм с последваща загуба на вазоактивни субстанции, възпаление, нарушение в хомеостазата и редокс-хомеостазата в съдовата система на организма. Авторите разглеждат и ролята на ЕД като патофизиологична връзка между ранните ендотелни клетъчни изменения, свързани със сърдечно-съдови рискови фактори, и развитие на исхемична болест на сърцето (ИБС) и артериална хипертония (АХ), които са от основно значение за клиницист. Устойчивите високи нива на циркулиращи вредни стимули, свързани със сърдечно-съдови рискови фактори, предизвикват последователно появяващи се реакции в ендотелните клетки – ендотелна клетъчна активация и ЕД, характеризиращи се с понижена концентрация азотен оксид – ранен и обратим прекурсор на атеросклерозата (72).

Намалената бионаличност на NO може да се дължи на понижена експресия на eNOS (73), липса на субстрат или кофактори за eNOS (74), промяна в клетъчната сигнализация, което води до нарушено активиране на eNOS (75), ускорено разграждане на NO, опосредствано от ROS (76).

Ранни проучвания (77) разкриват, че ендотелният релаксиращ фактор (EDRF), идентифициран като NO, се инактивира от $O_2^{\cdot-}$ и стабилизира чрез супероксид дисмутаза (SOD). Взаимодействието между $O_2^{\cdot-}$ и NO протича с изключително бързи

темпове – три пъти по-бързо от скоростта на реакцията между $O_2^{\cdot-}$ и SOD (78). При нормални физиологични условия се поддържа динамично равновесие между $O_2^{\cdot-}$ и NO. Този деликатен баланс бива променен при различни болестни състояния. Например при хиперхолестеролемични зайци е установена занижена бионаличност на NO, опосредсвана от $O_2^{\cdot-}$ (79). Подобни наблюдения, свързани с повишена деградация на NO от ROS в животински модели, включват АХ, ЗД, тютюнопушене, сърдечна недостатъчност (80, 81, 82).

Продължават проучванията при хора.



В нормотензивно състояние NO може да предотврати хипертрофия чрез инхибиране на съдови мускулните стимулатори на растежа-като PDGF (тромбоцитен растежен фактор) и VEGF (съдов ендотелен растежен фактор). Хронична хипертония увеличава оксидативния стрес в съдовата стена. ROS (по-специално супероксида) реагира с NO до получаване на пероксинитрит. По този начин се намалява наличния NO. Намалените нива на NO могат да допринесат за хипертрофия поради отстраняване на инхибиращото влияние. В допълнение към индиректната роля (чрез инактивиране на NO), последните данни сочат, за да по-пряка роля на супероксида в развитието на хипертрофия (83).

Фиг. 11. Възможна роля на ROS и NO при развитието на съдова хипертрофия в отговор на повишено артериално пулсово налягане при хронична хипертония

5.5. ROS И АТЕРОСКЛЕРОЗА

Многобройни са пътищата, посредством които повишената продукция на ROS взема участие в развитието на атеросклеротичните изменения. За обяснение на патогенезата на атеросклерозата Parthasarathy предлага теорията за оксидативната модификация. Според нея свободнорадикалните процеси и липидната пероксидация са определящи за иницииране на атерогенезата и формиране атеросклеротични плаки (84).

При нормални обстоятелства нативният LDL циркулира във и извън съдовата стена. Това може да се промени при определени условия. Промените в оксидативната среда на съдовата стена благоприятстват оксидацията на LDL и промотират

възпалителен отговор, отчасти чрез въздействие върху TLRs рецептори (53). Yin и сътр. разглеждат важната патогенетична роля на TLRs в атеросклеротичния процес, акцентирайки, че генетичен дефицит на TLRs (TLR2;TLR4) в атерогенни мишки значително намалява размера на атеросклеротичните лезии (85). Тъй като плазмата инхибира окислението на LDL, изглежда, че в по-голямата си част окислението на полиненаситени мастни киселини в LDL се осъществява вътре в артериалните стени (63). Значителната оксидация на LDL води до образуване на ox-LDL, който вече не се разпознава от LDL рецептора, но се поема от scavenger рецептори. Оксидацията на LDL води до образуване на няколко биологично активни молекули. Например в ox-LDL се съдържат ензими с активност, подобна на фосфолипаза А2. Активното преобразуване на фосфатидилхолин в лизофосфатидилхолин причинява множество неблагоприятни биологични ефекти върху ендотела. Линоленовата киселина и други мастни киселини са оксидирани до съответните хидропероксиди, участващи в радикални верижни реакции, които водят до трансфер на електрони към други молекули и до образуване на допълнителни радикали (53). Щом веднъж се окислят в тъканите, макрофагите и моноцитите могат да фагоцитират модифицираните LDL, вследствие на което се образуват пенести клетки, необходими за формирането на „мастни наслоявания“ (прекурсорно състояние за атеросклерозата) (63).

Според Цветков и Бочев началната оксидация на LDL активира експресията на гени, индуциращи производството на моноцитни активатори – P-селектин, моноцитен колониостимулиращ фактор MCSF, VCAM1, X-LAM адхезионна молекула, моноцитен хемоатрактант протеин MCP-1 (84). Окисленият LDL стимулира експресията на Mn-SOD, която на свой ред повишава концентрацията на H_2O_2 (86).

Като критичен компонент на съдовия растеж и ремоделиране Harrison и Griendling разглеждат разграждането и ресинтеза на екстрацелуларния матрикс. Процесът бива медииран от специализирани ензими, наречени *матриксни металопротеази* (MMPs). Няколко MMPs, включително MMP2 и MMP9, участващи в дегрaдацията на базалната мембрана и еластина, се преобразуват от неактивни зимогени в тяхната активна форма чрез ROS-медиирана оксидация при цистеиновия остатък в инхибиторния домеин. Процесът изглежда причинява матриксна деградация в регионите на съдовете, изложени на повишени нива на оксидативен стрес, каквато е областта на „рамото” на вулнерабилната плака (53).

Лезията на ендотелни клетки е сочена за отключващ фактор на атерогенезата, като сред водещите причини за ендотелно увреждане се посочват реактивните метаболити на кислорода и продуктите на липидна пероксидация (84). От друга страна, увреденият ендотел реагира с повишено радикалообразуване на мястото на съдовата лезия. В подкрепа на последното твърдение Juni и съавт. разглеждат по-

вишеното образуване на ROS по разнообразни молекулни механизми след коронарна интервенция – балонна ангиопластика, имплантиране на стент – BMS или DES (87). По този начин се затваря порочен кръг, задълбочаващ съдовата лезия.

5.6. ROS и съдово ремоделиране

ROS участват в съдовото ремоделиране. Valenti и сътр. дефинират съдовото ремодилиране като промяна на структурата, което води до промяна в дебелината на стената и диаметъра на лумена. Развитието на артериалната хипертония включва два различни вида съдово ремодилиране – еутрофично и хипертрофично. Еутрофичното ремодилиране се характеризира с намален размер на лумена, задебеляване на медиата, увеличено съотношение медиа/лумен, малка промяна (или никаква) в средната площ на напречното сечение на съда (88). Размерът на съдовите гладкомускулни клетки е незначително променен и растежът към лумена е медииран от реорганизация на клетъчен и неклетъчен материал, съществуващ в съдовата стена, придружено от апоптоза в периферията на съда. Това често се наблюдава в малките резистентни артерии при пациенти с есенциална хипертония. От друга страна, хипертрофичното моделиране се характеризира с увеличение на напречната площ на стената и преобладава в големи, еластични артерии при вторична хипертония. Увеличаване клетъчните размери (гладкомускулна хипетрофия) и синтез на екстацелуларни матриксни протеини са необходими за хипертофичното ремодилиране (89).

Hope D. Intengan и Ernesto L. Schiffrin считат, че ангиотензин, ендотелин или други вазоактивни пептиди директно или в голяма степен чрез стимулиране на производството на супероксид и активиране на редокс-чувствителни гени предизвикват вазоконстрикция, гладкомускулен растеж, апоптоза, ниска степен на възпаление и съдова фиброза, които водят до съдово ремодилиране при АХ (88).

5.7. Източници на ROS в съдовите клетки. Ензимни системи

5.7.1. NADPH оксидаза. Роля в патогенезата на хипертонията

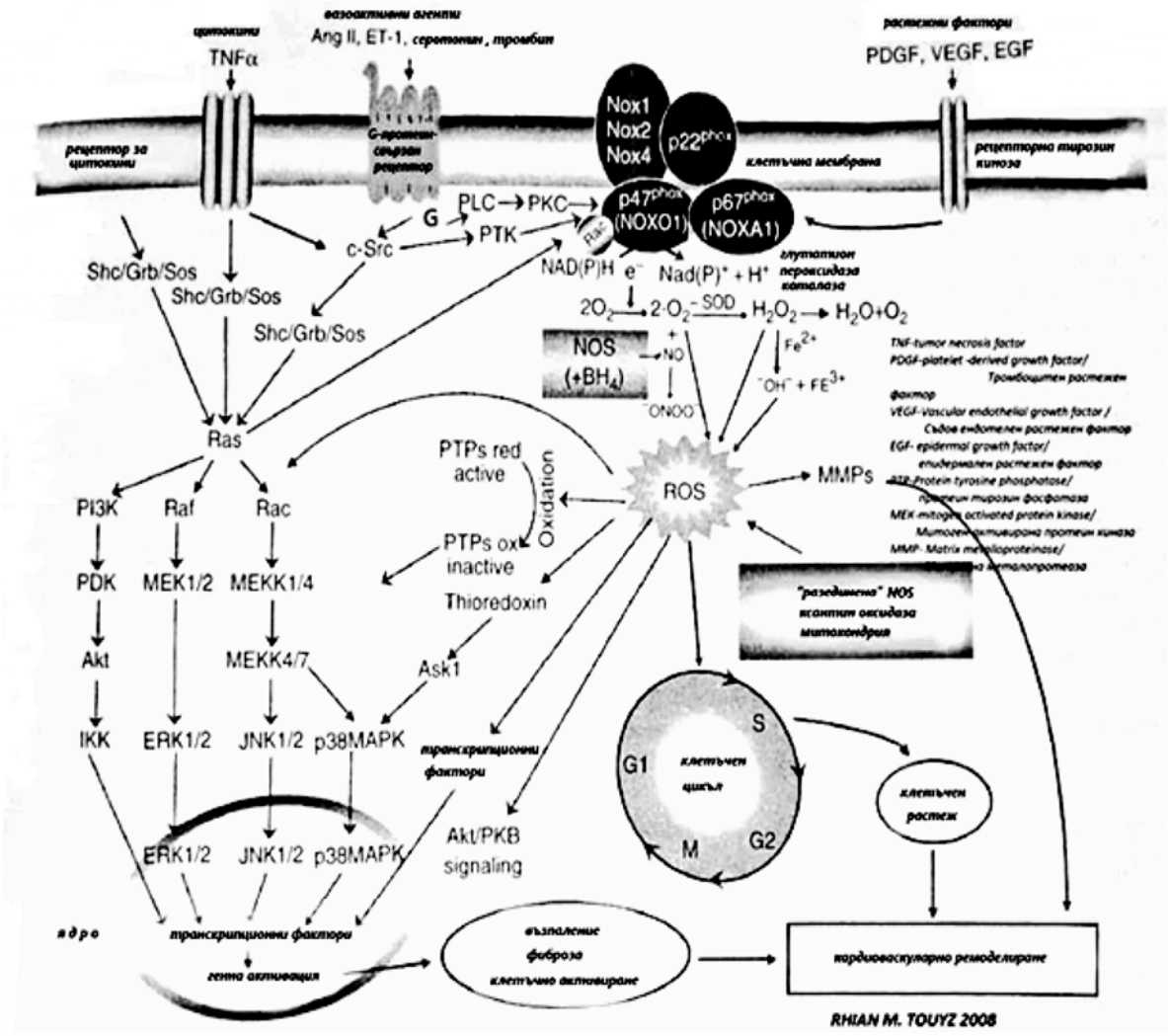
Съдовите ROS се произвеждат в ендотелни, адвентициални и гладкомускулни клетки, предимно чрез ензима NADPH оксидаза, катализиращ процеса:

$2O_2$ + NAD(P)H = > $2O_2^-$ + H^+

Основната каталитична функция на NADPH оксидазното семейство е генерирането на ROS. Това свойство ги отличава от всички други ROS генериращи ензими, които произвеждат радикали като страничен продукт на тяхната анионна активност или в резултат на абнормен (болестен) процес.

При бозайници са описани седем изоформи на NADPH оксидазата. Ензимът има различна структура в зависимост от клетъчния тип (90).

Съдовата NADPH оксидаза съдържа най-малко 4 компонента, мембранно свързани с p22 phox и GP 91phox [или GP 91 (NOX 2) хомолози, NOX 1 и NOX4] и цитозолни p47 ph nox и p67 ph nox (фиг. 12). Ензимът се регулира от хуморални фактори (цитокини-TNFa, IL1, фактор агрегиращ тромбоцитите); растежни фактори (тромбоцитен фактор, епидермален растежен фактор, трансформиращ растежен фактор b); вазоактивни агенти; физически фактори (участък, подложен на пулсиращо напрежение или на напрежение при "ламинарно срязване"); метаболитни фактори (хипергликемии, хиперинсулинемия, свободни мастни киселини); G-протеин-свързани рецепторни агонисти (серотонин, тромбин, брадикинин, ендотелин и ангиотензин 2) (91).



Съкръщения: **TNF** – тумор некротизиращ фактор, **PDGF** – тромбоцитен растежен фактор, **VEGF** – съдов ендотелен растежен фактор, **EGF** – епидермален растежен фактор, **PTP** – протеин тирозин фосфатаза, **MEK** – митоген активирана протеин киназа, **MMP** – матриксна металопротеаза

Фиг. 12. Генериране на ROS в кардиоваскуларните клетки по Touyz, 2008 (92)

При физиологични условия ROS се произвеждат по контролиран начин при ниски концентрации и функционират като сигнални молекули, защитават съдовата функция и процеса на контракция и релаксация на съда. При патологични условия повишената биологична активност на ROS води до ЕД, повишена еластичност, гладкомускулен растеж, моноцитна инвазия, липидна пероксидация, възпаление, повишено отлагане на екстрацелуларни матриксни протеини, респективно потенцират се хипертензивни съдови увреждания (56). Стимулирането на съдовите гладкомускулни клетки с ангиотензин II, тромбин, тромбоцитен растежен фактор, тумор растежен фактор 2, лактосилсерамид увеличава активността на NADPH оксидазата (71).

Съществуват редица нови проучвания, които поставят NADPH оксидазата в основата на ангиотензин 2 индуцираната хипертония (93). NADPH се активира от ангиотензин 2 in vitro. Въпреки това ролята му в индуциране на хипертония in vivo е малко изяснена. Harrison и съавт., използвайки мишки с недостатъчност на p47phox и контролна група див тип мишки, предполагат въз основа на получените резултати основната роля NADPH оксидазата и субединицата p47phox в съдовия оксидативен стрес и ангиотензин 2-индуцираната хипертония in vivo (94).

Идеални кандидати за поддържане на баланс между NO (като съдоразширяващо средство) и ROS са AT рецепторите. Последните данни сочат, че ангиотензин 2, действащ чрез AT1 рецептора стимулира нефагоцитната NADPH оксидаза (95). Touyz и сътр. тестват хипотезата, че действието на ангиотензин 2 върху AT1 рецептора се осъществява посредством асоциация между p47 phox, кортактин и F-актин в цитоскелета на човешки гладкомускулни клетки (VSMCs), като чрез получените резултати показват важността на интактния актин-цитоскелет в NADPH оксидазната регулация и редокс-сигнализацията чрез ангиотензин 2 (96). По този начин стимулирането на AT1 рецептора от увеличени циркулиращи или тъканни нива на ангиотензин 2 ще предизвика възпалителна реакция. От друга страна, блокирането на AT1 рецептора при повишени нива на ангиотензин 2 ще стимулира AT2 рецептора, на което се основават и благоприятните ефекти на ангиотензин-рецепторните блокери (95).

Всички NADPH оксидазни субединици са представени в бъбрека и ROS може да модулира реналната функция. Налична е регулация на p47phox и p67phox в бъбреците на спонтанно хипертензивни плъхове. Хроничната инфузия на ангиотензин 2 увеличава експресията на NOX1 и p22phox и намалява експресията на реналната екстрацелуларна супероксид дисмутаза (97). Засилването на бъбречното O_2^{-} производство е свързано с инактивация на NO, което оказва влияние върху тонуса на аферентните артериоли. Посредством тубулно-гломерулната обратна връзка се

засилва натриевата реабсорбция и този факт има значение за дългосрочното регулиране на кръвното налягане (91).

Освен директното участие на ROS в индуциране на реновазалната хипертония е възможно индуцирането на последната чрез взаимодействие ROS–централна нервна система–бъбреци. В мозъка излишъкът на ROS стимулира NADPH оксидазната активност в циркумвентрикуларните органи (CVOs) и nucleus tractus solitarius, което може да предизвика симпатикува активация и ренална вазоконстрикция. Инхибирането на NADPH оксидазата в циркумвентрикуларните органи предотвратява хипертонията (53).

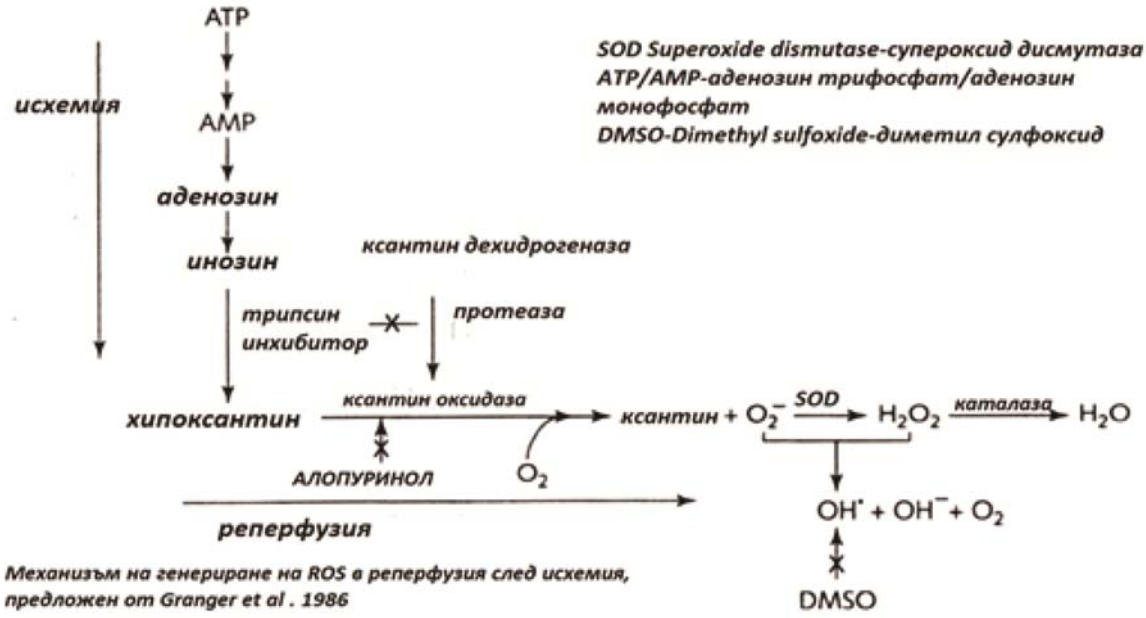
5.7.2. Ксантиноксидаза

Ксантиноксидоредуктазата е част от група ензими, известни като молибдено-железно-серни флавин-хидроксилази (98). Ензимът катализира окислението на хипоксантина в ксантин и разграждането на ксантина до пикочна киселина при катаболизма на пурините (60).

Ензимът съществува в 2 конвертируеми форми, известни като ксантиноксидаза (XO) и ксантиндехидрогеназа, състоящи се от две идентични субединици (98). При бозайници ксантиноксидоредуктазата присъства in vivo като дехидрогеназна форма, но лесно се превръща в XO чрез окисление на сулфхидрилните остатъци или чрез протеолиза (99). Според проведените от Della Corte и съавт. изследвания върху човешки черен дроб ензимът обикновено съществува в дехидрогеназна форма. При определени стресови условия, например хипоксия, доминира оксидазната изоформа (100). Въпреки че ксантин дехидрогеназата има по-голям афинитет към NAD+ в сравнение с молекулярен кислород (предпочитан от XO), и двете форми могат да окисляват NADH, което води до образуване на ROS – O_2^- и H_2O_2.

Базалната експресия на ксантиноксидоредуктазата е ниска при хора [около 20% по-висока при мъже (101)], но хипоксия, IL6, IL1, TNFa, липопротеини, полизахариди, както и лечение с кортикостероиди са показали, че активират транскрипцията и засилват продукцията ѝ (102).

Ксантиноксидазата е значително повишена при исхемия на крайниците (98) и след реперфузия на исхемична тъкан в редица органи (68), при голяма операция, заболяване на коронарните артерии, сърдечна недостатъчност. Granger и кол. Фокусират вниманието си върху ключовата роля на ензима в патогенезата на исхемия-реперфузия увреждането и предлагат хипотетичен механизъм като обяснение (103).



Фиг. 13. Механизъм за генериране на ROS в реперфузия след исхемия, по Granger et al. 1986 (104)

Montezano и Touyz констатират, че ксантиноксидазата е експресирана във васкуларни клетки, циркулира в плазмата и се свързва към ендотелните клетки на екстрацелуларния матрикс (60). Циркулиращата XO се свързва с глюкозаминогликани по повърхността на ендотелните клетки, където се смята, че придобива промяна в кинетиката (по-високи Km и Ki, по-висок капацитет на оксидантна продукция, по-голяма стабилност) (105). Panus и сътр. предполагат, че тази форма на индуцирана, циркулираща и внесена XO е по-важна в патогенезата на ендотелното увреждане от XO, конститутивно произведена от ендотелните клетки (106). Активността на ендотелната свързана XO се увеличава с повече от 200% при пациенти с хронична сърдечна недостатъчност (ХСН) (98).

Въпреки че ксантиноксидазният дериват O2- е проучен главно в контекста на атеросклерозата и сърдечно-съдовите заболявания, има данни, предполагащи участието му в хипертонията. Изследвания на H. Suzuki и сътр. при спонтанно хипертензивни плъхове (SHR) и „DOCA-salt“ (деоксикортикостерон ацетат сол) хипертензивни плъхове показват повишени нива на ендотелната XO и увеличена продукция на ROS, които са свързани с повишен артериоларен тонус (107). DeLano и сътр. акцентират върху възможната медиация на процеса посредством надбъбрека, тъй като адреналектомията редуцира XO експресия (108).

Cai и Harrison изказват хипотезата, че XO може да съществува и в молибден-дефицитна форма. В това състояние ензимът е способен да използва ксантин като субстрат, не се инхибира от оксипуринол, може да използва NADH като донор на електрони и образува O2.-. Това поражда хипотезата, че NADH оксидазата е молибден-дефицитна форма на ксантиноксидазата. Има технически затруднения, кои-

то не позволяват задълбочени изследвания на ензима – липса на достатъчно чувствителен анализ за идентификацията му в малки количества и специфични антитела. Тези проблеми възпрепятстват до голяма степен по-задълбочените изследвания на ролята на XO в ендотелната дисфункция (71).

Според Jacob и Struthers ксантиноксидазната система до голяма степен бива поставяна на заден план по отношение регулацията на ROS, въпреки наличието на ксантиноксидазни инхибитори – алопуринол, оксипуринол, фебукостат (98).

5.7.3. NO синтетаза

Видовете NOS вече бяха упоменати. Предстоящото разглеждане има за цел да обясни причините за „дисоцииране" на eNOS. Констатацията, че eNOS може да генерира супероксид вместо NO в отговор на атерогенни стимули води до идеята за „NOS дисоцииране", където активността на ензима за производство NO намалява, заедно с повишено NOS-зависимо супероскид производство (93). При липсата L-аргинин или GTP cyclohydrolase-1, който е ограничаващ скоростта ензим в производството на тетрахидробиоптерин (BH_4) (60), eNOS може да продуцира O_2^- и H_2O_2- явление отново наречено „NOS дисоцииране" (71). Според M. C. Verhaar и съавт. лечение с 5-метил тетрахидрофолат (5-MTHF – активната форма на фолиевата киселина) увеличава вътреклетъчните нива на BH_4, намалява съдовото производство на супероксид и увеличава бионаличността на NO в съдова стена при човек (109), но дългосрочното прилагане на вит. B_{12} и фолиева киселина не показват значителни благоприятни ефекти върху съдовете (110).

Cai и Harrison смятат, че т.нар. *дисоциация* на eNOS в ендотела може да доведе до оксидативен стрес и ендотелна дисфункция по най-малко три механизъма. Първо – ензимното производство на NO се понижава, което позволява на радикалите, с които може да взаимодейства, да атакуват други клетъчни цели. Второ – ензимът започва да произвежда $O_2^{\cdot-}$, допринасяйки за оксидативния стрес. Накрая – много вероятно е eNOS частично да се *дисоциира*, така че и двете – $O_2^{\cdot-}$ и NO, да се произвеждат едновременно. При това eNOS може да се превърне в генератор на пероксинитрит, което води до значително повишен оксидативен стрес (71).

M. Oelze и съавт. отбелязват, че някои класически антихипертензивни медикаменти, включително бета-блокера Nebivolol, предизвикват ефекти посредством предотвратяване на дисоциирането на NOS (111).

Другите две NOS изоформи iNOS и nNOS също са изследвани в сърдечно-съдовата система, въпреки че приносът на тяхното *дисоцииране* за патологията не е добре изяснен (68). A. Walkowska и съавт. изследват оксидативния стрес и активността на nNOS като педполагаеми фактори за бързото повишение на кръвното налягане след бъбречна денервация в анестезирани плъхове. Авторите предполагат засилени аферентни импулси от интраренални хеморецептори в бъбреците,

свързани с оксидативен стрес, като основа за повишеното кръвно налягане след бъбречна денервация. В отговор от мозъчните центрове се стимулира симпатикова активност, респективно сърдечно-съдова стимулация (112).

5.7.4. Митохондриална дихателна верига

Митохондриите, и по-точно митохондриалните електрон-транспортни вериги, разположени във вътрешната митохондриална мембрана, са основен механизъм за генериране на клетъчна енергия и са основно вътреклетъчно място, в което активно и непрекъснато се формират ROS. В митохондриалните електрон-транспортни вериги се осъществява редукция на молекулярния O_2 в клетките с отделяне на вода. Около 1-2% от кислорода, редуциращ се от митохондриите, се превръща в O_2^- в междинните стъпала на митохондриалната дихателна верига. Поради високия свързващ капацитет на цитохром С-оксидазата супероксидът се формира главно при реакции, катализирани от NADPH дехидрогеназата и от коензим Q. Гаджева, въз основа на трудовете на Turrens и сътр., отрежда главното място за едноелектронната редукция на молекулен кислород до супероксиден радикал на убихинона. Установено е също, че NADH-убихинон редуктазата и убихинол-цитохром С-редуктазата, които съдържат като важна съставна част убисемихинон, генерират супероксид и водороден пероксид (86).

Fotino и сътр. проучват влиянието между Co Q10 (убихинон) като антиоксидант и функционалното състояние при застойна сърдечна недостатъчност. Обобщени анализи на наличните рандомизирани контролирани проучвания показват, че Co Q10 може да подобри EF при пациенти със застойна сърдечна недостатъчност, но авторите подчертават необходимостта от допълнителни проучвания в тази насока, включващи повече и по-разнообразни популации (113).

Митохондриалното производство на ROS се модулира от много фактори, включително ефективността на митохондриалните електрон транспортни вериги (114), антиоксидантното митохондриално съдържимо (115), локална кислородна и NO концентрация (116), цитокини и вазоактивни агонисти (117; 118).

S. Srinivastan и N. G. Avadhani проучват преките и косвените роли на цитохром С-оксидазата в продукцията на ROS. Авторите акцентират върху факта, че структурата и функцията на ензима са засегнати при широк спектър заболявания, включително: рак, невродегенеративни заболявания, миокардна исхемия/реперфузия, костни и скелетни заболявания, ЗД. Въпреки че ролята на цитохром С-оксидазата в производството на ROS все още подлежи на обсъждане, голяма част от данните в проучването сочат, че дисфункцията на цитохром С-оксидазата неизменно се свързва с повишена продукция на митохондриални ROS и клетъчна токсичност (119).

5.8. ROS и ХИПЕРТОНИЯ

Връзката между оксидативния стрес и повишеното кръвно налягане е доказана в много експериментални модели на АХ. Маркерите за оксидативен стрес – TBARS (thiobarbituric acid reactive substances – реактивни субстанции на тиобарбитуровата киселина), F(2)-isoprostanes, тъканните концентрации на O_2^- и H_2O_2, активирането на NAD(P)H оксидазите и ксантин-оксидазата се увеличават, докато нивата на NO и антиоксидантни ензими са намалени при експериментална хипертония (60). В настоящото изложение бе обсъдена чувствителността на ангиотензин II-зависимата хипертония към NAD(P)H генерираните ROS деривати.

Проучванията при хора не са толкова убедителни, колкото при експериментални модели, но има доказателства, че оксидативният стрес е увеличен при пациенти с есенциална хипертония, реноваскуларна хипертония, злокачествена хипертония, сол-чувствителна хипертония, циклоспорин-индуцирана хипертония и прееклампсия (120; 121). Тези данни са базирани на повишени плазменни нива на активни субстанции на тиобарбитуровата киселина и 8-epi-isoprostanes, биомаркери за липидна пероксидация и оксидативен стрес (122; 123)

M. K. Kashyap и съавт. проучват нивата на общия холестерол, малондиалдехида, липидите с много ниска плътност (VLDL), пикочната киселина, плазмения хомоцистеин и липидите с ниска плътност (LDL) при хипертоници (N = 50) и нормотензивни индивиди (N = 50). Всички параметри са значително по-високи при хипертониците в сравнение с нормотензивните контроли. HDL холестеролът, супероксиддисмутазата, редуцираният глутатион, общият глутатион, окисленият глутатион, общите тиоли, протеиновите тиоли, общата антиоксидантна активност, вит. А, вит. С, глутатион-S-трансфераза са значително по-ниски при контролната група (124).

R. Rodrigo и съавт. изследват връзката на кръвното налягане с параметри на оксидативния стрес в кръвни проби при 31 пациенти с хипертония и 35 здрави, нормотензивни доброволци (125). Участниците са мъже на възраст между 35 и 60 години. Критерии за изключване са: затлъстяване, дислипидемия, захарен диабет, тютюнопушене и текущата употреба на лекарства. Всички пациенти са подложени на 24-часово амбулаторно мониториране на артериалното налягане и са им взети проби от кръв и урина. Антиоксидантната ензимна активност, съотношението редуциран/окислен глутатион (GSH/GSSG) и липидната пероксидация (малондиалдехид) са определени в еритроцитите. Параметрите, отчетени в плазмата, са плазмен антиоксидантен статус, липидна пероксидация (8-изопростан), плазмен вит. С и Е, ренин, алдостерон, ендотелин-1 и хомоцистеин. Резултатите показват силна връзка между кръвното налягане и някои оксидативни параметри и сочат за възможна роля на оксидативния стрес в патофизиологията на есенциална хипертония.

Jeong-Hwa Han и сътр. провеждат проучване с цел да се установи връзката между артериалната хипертония и параметрите, свързани с оксидативен стрес при субклинични пациенти с АХ и нормотензивни пациенти, живеещи в Корея. Проучването включва 227 новодиагностицирани, нелекувани хипертоници и 130 нормотензивни пациенти (RR < 120/80 mm Hg). В кръвта на пациентите се анализират степента на увреждане на ДНК на лимфоцитите, активността на еритроцитната супероксид дисмутаза, каталаза и глутатион пероксидаза, нива на плазмения тотален антиксидантен потенциал, глутатион, антиоксидантни витамини, плазмен липиден профил и конюгирани диени. Резултатите от проучването потвърждават асоциацията между АХ и параметрите, свързани с оксидативен стрес, и подчертават значителната роля на оксидативния стрес в патогенезата на хипертонията (126).

Изследванията на цитираните автори подкрепят връзката между хипертонията и повишния оксидативен стрес. Нашият екип разглежда радикалообразуването като възможен механизъм, обуславящ липсата на терапевтичен отговор при определени групи медикаменти (с акцент върху ACE инхибицията). Резултатите биха били полезни в прилагането на нов терапевтичен подход, повлияващ продукцията на ROS. Данните от приложението на сулфхидрилните – SH Zofenopril и Captopril, са обнадеждаващи.

В ОБОБЩЕНИЕ

Артериалната хипертония е широко разпространена в целия свят. Тя влошава качеството на живот на болните и увеличава сърдечно-съдовата заболеваемост и смъртност. Въпросите за профилактиката и лечението на хипертонията са от първостепенна важност за клиничната практика и научния свят.

Сред най-успешните терапевтични възможности за лечение на АХ е приложението на ACE инхибитор, но голяма част от пациентите не успяват да достигнат нормите на артериалното налягане според глобалния сърдечно-съдов риск въпреки добрия къмплайънс от страна на пациента. Причините за терапевтичната толерантност не са докрай изяснени. Сред водещите теории са алтернативни ангиотензин II образуващи пътища (с отредена ключова роля на мастоцитната протеаза – химаза), генетични полиморфизми, обуславящи различен терапевтичен ефект при пациентите, състояния, потенциращи инициирана от свободните радикали ендотелна дисфункция и редица други. Точната причина за липсата на терапевтичен ефект при част от болните остава неясна. Кардио- и ренопротективните качества на ACE инхибиторите ги правят отличен първи избор за фармакологично повлияване на хипертонията при пациенти с асоциирани рискови фактори и насочват усилията ни в търсене на причините и намаляване на терапевтичната резистентност към този клас медикаменти.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. Цел

Целта на настоящия труд е да се проучи влиянието на I/D полиморфизма в ACE гена, оксидативния статус и активността на ACE-независимите пътища върху антихипертензивния ефект на ACE инхибиторите при пациенти с умерена степен АХ.

2. Задачи

2.1. Подбор на група пациенти с АХ (до II степен), отговарящи на определени критерии (вж.“Материали и методи“), на монотерапия с ACE инхибитор, и контролна група нормотензивни доброволци, съответстващи им по пол и възраст.

2.2. Подбор на група пациенти с АХ (до II степен), отговарящи на определени критерии (вж.“Материал и методи“), на лечение с други антихипертензивни медикаменти (АРБ и комбинирана терапия от ACE инхибитор и β-блокер) за сравнение на терапевтичния отговор при приложение на различните лекарствени средства.

2.3. Определяне на оксидативния статус при пациентите с АХ в зависимост от вида на приеманата антихипертензивна терапия.

2.4. Определяне на серумните нива на протеини от РААС системата, включително ACE, ACE2, химаза, ангиотензин 2, при хипертоници.

2.5. Анализиране на взаимовръзките между установените показатели на оксидативен статус, липиден профил и протеини от РААС системата при пациенти с АХ.

2.6. Определяне на генотипното разпределение на I/D полиморфизма в ACE гена при хипертензивни пациенти и оценка на влиянието на изследвания полиморфизъм за терапевтичния отговор към ACE инхибитори.

IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Клиничен материал

В дисертационния труд са включени изследвания върху група от 140 лица с първична артериална хипертония, преминали през превантивен кабинет на УМБАЛ "Проф. д-р Стоян Киркович", амбулаторни пациенти от област Стара Загора с артериална хипертония и 20 здрави контроли – доброволци.

Критериите за подбор на пациенти с АХ са следните:

Включващи критерии:

1. Възраст между 18 и 80 години;
2. Първична АХ I и II ст. с давност поне 6 месеца ;
3. Провеждане на медикаментозно лечение на АХ;
4. Подписано информирано съгласие;

Изключващи критерии:

1. Симптоматична АХ;
2. Остра/хронична сърдечна недостатъчност;
3. Симптоматично периферно артериално заболяване на долните крайници;
4. Захарен диабет тип I и тип II;
5. Обезитет (ИТМ > 30 kg/m^2);
6. Тютюнопушене;
7. Дислипидемия на медикаментозно лечение[1].

Таблица 8. Основни характеристики на пациентите, включени в изследването

	Обща група АХ	**Мъже**	**Жени**	**Мъже/жени**
n	**140**	**82**	**58**	**p-value**
Години	61.36 ± 13.3	58.7 ± 14	65.1 ± 11.1	0.003
SBP (mm Hg)	139.96 ± 15.7	141.6 ± 15.2	138.4 ± 16.2	0.383
DBP (mm Hg)	85.67 ± 10.6	86.8 ± 7.9	84.6 ± 12.6	0.380
СЧ (min)	74.89 ± 8.14	77 ± 9.3	72.9 ± 6.4	0.033
Холестерол общ (mmol/l)	3.0 ± 2.59	3.4 ± 2.4	2.4 ± 2.8	0.034

[1] Поради проучване на връзката между липидния профил на пациентите и серумното ниво на химаза, лицата, с установена по време на изследването дислипидемия, не са изключени от проучването.

Таблица 8. Продължение

	Обща група АХ	Мъже	Жени	Мъже/жени p-value
LDL (mmol/l)	1.66 ± 1.54	1.83 ± 1.42	1.42 ± 1.68	0.141
HDL (mmol/l)	0.486 ± 0.62	0.435 ± 0.56	0.532 ± 0.67	0.415
Триглицериди (mmol/l)	0.867 ± 1.2	1.02 ± 1.34	0.649 ± 0.97	0.079
СУЕ mm/h	10.02 ± 4.96	8.45 ± 4.6	11.5 ± 4.93	0.048
Leu (x 10^9 клетки/L)	7.65 ± 2.17	7.81 ± 2.36	7.5 ± 2	0.630
HB (g/l)	139 ± 14.2	148.2 ± 10.1	129.2 ± 11.1	0.000001
Er (T/l)	4.85 ± 0.6	5.18 ± 0.64	4.5 ± 0.3	0.000072
Hct (l/l)	0.42 ± 0.066	0.46 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.000096
MCV (fl.)	89.6 ± 5.6	90.3 ± 5.4	88.3 ± 6.3	0.492
Plt (G/l)	229.2 ± 87.8	219.8 ± 53.5	239 ± 113.8	0.469
INR	0.936 ± 0.47	1.09 ± 0.39	0.79 ± 0.5	0.082
АЛАТ (U/l)	17.97 ± 8.5	18.41 ± 8.2	17.6 ± 8.9	0.739
АСАТ (U/l)	22.77 ± 7.5	24.4 ± 7.4	21.3 ± 7.5	0.156
Кр. захар (mmol/l)	5.89 ± 0.74	5.85 ± 0.77	5.92 ± 0.72	0.754
Креатинин (mmol/l)	97.91 ± 19.8	102.6 ± 16.6	93.6 ± 21.8	0.123
Na	137.79 ± 20.86	135.4 ± 29.7	140.1 ± 4.09	0.447
K	4.49 ± 0.35	4.51 ± 0.37	4.47 ± 0.33	0.719
EF%	60.83 ± 10.6	61.3 ± 11.8	60.4 ± 9.6	0.792

1.1. Получаване на информирано съгласие

Предвид факта, че работата по настоящия труд е свързана с пациенти и вземането на биологичен материал от тях, се наложи получаването на информирано съгласие преди включването на всеки един от болните. На пациентите са разяснени детайлно целта и задачите на настоящото изследване, необходимостта от терапия на артериалната хипертония и последствията, които носи липсата на лечение за здравния статус. Акцентира се върху доброволността на участието и се гарантира, че личните данни на пациента ще се използват единствено за целите на настоящия труд и няма да бъдат разпространени или предоставени за друга цел без изрично съгласие. На всеки болен се обясни допълнително извършваната инвазивна процедура (венепункция). Гарантира се пълната стерилност на средата при извършване на манипулацията.

На пациентите се гарантира, че личното им достойнство няма да бъде накърнено по никакъв повод от страна на участниците в научния проект и от медицинския персонал и ще им се отговори изчерпателно на всички поставени

към екипа въпроси. Евентуалният отказ от участие в проучването или желанието за прекратяване на участието в него по време на протичане на изследванията не носят никакви негативни последици за здравето на пациента и на лицето се гарантира качествена здравна помощ в бъдеще.

Информираното съгласие се изготви в писмен вид и се подписа от всеки пациент, преди да бъде включен в проучването.

Диагностика и подбор на терапията

Пациентите са диагностицирани и лекувани от наблюдаващия ги общопрактикуващ лекар или кардиолог. Изборът на вида на АСЕ инхибитора, АРБ и комбинираното лечение е направен от лекуващия лекар, като са спазвани препоръките на съответните ръководства на *Европейското кардиологично дружество*.

- Монотерапия с АСЕ инхибитор – Lisinopril 5-10 mg/дневно;
- Комбинирана терапия – Lizinopril 5-10 mg + Bisoprolol 5 mg;
- АРБ монотерапия – Valsartan 160 mg/дневно

Б. Георгиев и съавт. (2012 г.) публикуват разработка, анализираща на предпочитанията на лекарите в България при терапията на хипертония и при избора на терапевтични подходи (127). Резултатите сочат, че българските лекари предпочитат да започнат лечението на хипертонията с АСЕ инхибитор или с диуретик, следват – бета-блокерите и калциевите антагонисти, а предпочитане на ангиотензин-рецепторните блокери (АРБ) за начално лечение е установено при не повече от 5%.

Таблица 9. Предпочитани комбинации за лечение на хипертонията по Б. Георгиев и съавт., 2012 г. (127)

	Предпочитани комбинации за лечение на хипертонията				
	АСЕ-и + ББ	**АСЕ-и + Д**	**АСЕ-и + КА**	**АРБ + Д**	**ББ + Д**
ОПЛ	22,0%	37,4%	19,6%	4,8%	11,8%
Извънболнични специалисти	23,4%	39,8%	14,6%	7,8%	13,1%
Болнични специалисти	20,5%	38,3%	18,7%	7,2%	15,2%

Съкращения: **АСЕ-и** – АСЕ инхибитори, **КА** – калциеви антагонисти, **ББ** – бета-блокери, **Д** – диуретици, **АРБ** – ангиотензин-рецепторни блокери

Направеният от лекарите, участващи в нашето проучване, терапевтичен избор съвпада с констатираните предпочитания на терапевтите в България. Поради по-големия наличен брой пациенти с аналогична терапия (lisinopril + bisoprolol), както и поради влиянието на тази група медикаменти върху РААС (инхибиране на отделянето на ренин от бъбреците) ние предпочетохме да разгледаме комбинацията **АСЕ + ББ** пред **АСЕ + Д**.

Оценка на хипертензивния контрол

Пациентите са с диагностицирано заболяване от минимум 6 месеца, като им е назначена съответната антихипертензивна терапия. Проследяването се осъществява от ОПЛ или от превантивен кардиологичен кабинет. При отчитането на кръвното налягане са спазвани приетите основни правила:

– измерването на АН се извършва няколко минути след като пациентът е седнал спокойно;

– използва се проверен апарат;

– използва се стандартен маншет (12-13 x 35 cm) за възрастни ;

– ръката с маншета се поставя на нивото на сърцето, при седнало или легнало положение на пациента;

– маншетът се напомпва до 20 mm Hg над нивото, при което не се опипва пулсът;

– АН се измерва също и в изправено положение;

– маншетът се отпуска бавно (2 mm Hg/s);

– извършват се най-малко 2 измервания през интервал 1-2 min;

– при първия преглед задължително се извършват измервания на АН на двете ръце;

– в зависимост от образователното и културното ниво на болните се провежда обучение за самостоятелно измерване на АН.

За добър контрол на кръвното налягане се счита отчитане на оптимално, нормално или високо нормално АН при всеки контролен преглед, включително съобщените от пациента стойности от измерванията в дома. За ***неконтролирана*** хипертония считаме установените стойности на АН за систолното налягане над 139 mm Hg и/или за диастолното над 89 mm Hg, регистрирани при поне два различни по време контролни прегледа, както и съобщените повишени стойности на АН при домашното мониториране. Към ***неконтролираната група*** са включени и пациентите с понижение на артериалното налягане от проведеното лечение, но без да са достигнати таргетните стойности. При ***неконтролираните хипертоници*** липса на терапевтичен ефект е отчетена още при започване на терапията, т.е. не е имало период, през което да е постигнат адекватен хипертензивен контрол. Участващите пациенти са отказали промяна в терапевтичната стратегия, поради подценяване на сериозността на проблема, предвид липсата на оплаквания и добро общо състояние. Често липсата на добър хипертензивен контрол е констатирана по време на посещение при лекуващия лекар по друг повод.

1.2. Формиране на групи

По отношение на конвенционалните рискови фактори, подбраните пациенти са непушачи, без известно генетично предразположение, с данни за поне 30 min дневно физическа активност, без наднормено телесно тегло, без или с умерена консумация на алкохол (1 бира/чаша вино), със стремеж към здравословно хранене. (*Приложение 1*). Възрастовото и половото разпределение са представени на табл. 10.

Таблица 10. Основни характеристики на пациентите в зависимост от хипертензивния контрол

	години	СЧ	Холест.	LDL	HDL	триглицериди
Мъже – контр.	54.6 ± 13.4	76.2 ± 10	3.3 ± 2.3	1.8 ± 1.2	0.53 ± 0.57	1.12 ± 1.6
Жени – контр.	64.6 ± 11.5	72.9 ± 6.2	2.4 ± 2.6	1.3 ± 1.5	0.5 ± 0.67	0.58 ± 0.96
p-value	0.0004	0.186	0.094	0.098	0.881	0.071
Мъже - неконтр.	64.3 ± 13	78.3 ± 8.3	3.56 ± 2.6	1.9 ± 1.6	0.33 ± 0.55	0.9 ± 0.98
Жени - неконтр.	66.1 ± 10.5	72.9 ± 7	2.5 ± 3.2	1.7 ± 2	0.59 ± 0.66	0.79 ± 1.0
p-value	0.597	0.082	0.212	0.710	0.160	0.711

1.2.1. Изследване на оксидативен статус

Оксидативен стрес е определен при 82-ма души с артериална хипертония, приемащи редовна антихипертензивна терапия и при 20 здрави доброволци. Пациентите и контролите са подбрани да са: от мъжки пол, съпоставими по възрастови групи, непушачи; *без анамнестични данни за подлагане на*: високоенергетични въздействия (йонизиращи лъчения, UV радиация), системно физическо свръхнатоварване, работа с индустриални химични замърсители (пестициди, хербициди, торове, нитрати, тежки метали), прием на антибиотици, кортикостероиди, химиотерапевтици (през последната година), отопление с печки на дърва, работа или обитаване на регион с много висока промишлена или транспортна активност, повишена концентрация на O_3 – озонатори за въздух през последната година.

Според вида на приеманата терапия пациентите разделени в три групи:

– 41 пациенти на монотерапия с ACE инхибитор (lisinopril 5-10 mg/дн);

– 21 пациенти на комбинирано антихипертензивно лечение (lisinopril 5-10 mg/дн + bisoprolol 5 mg/дн);

– 20 пациенти на терапия с ангиотензин-рецепторен блокер (АРБ) – валсартан 160 mg.

Хипертониците отговарят на зададените в т. 1 критерии. Пациентите не приемат синтетични антиоксиданти като добавка към хранителния си режим. При всеки

от тях е налице нормална физическа активност и стремеж към здравословно хранене.

1.2.2. Изследване серумни нива на химаза и ангиотензин 2

Серумните нива на химаза и ангиотензин 2 са определени в 30 пациенти, отговарящи на зададените в т.1 критерии, и 20 здрави контроли (част от болните, упоменати в т. 1.2.1.). Пациентите са с диагностицирана АХ на монотерапия с АСЕ инхибитор (lisinopril 5 или 10 mg/дн).

1.2.3 Определяне честотата на ACE I/D полиморфизма

Честоти на ACE I/D полиморфизма бяха определени в 140 души с АХ, като към споменатите 82-ма болни (с отчетени нива на оксидативен стрес) са добавени 58 пациенти различни по пол, възраст и етническа принадлежност, без известни придружаващи заболявания на ССС (на органите на кръвообращението) и/или захарен диабет.

1.2.4. Изследване на серумно ниво на ангиотензин конвертиращ ензим

Серумното ниво на АСЕ бе определено чрез ELISA в серума на 105 пациенти с есенциална артериална хипертония, отговарящи на посочените критерии. Пациентите са част от 140-те болни, при които са определени честотите на ACE I/D полиморфизма, като 64 от тях провеждат монотерапия с АСЕ инхибитор, 15 са на терапия с АРБ и 26 – на комбинирано лечение (АСЕ + Б-блокер).

1.2.5. Изследване на серумните нива на ACE 2

Серумните нива на ACE2 са определени в група от 71 пациенти с АХ, от които 14 – на терапия с АРБ, и 57 – на монотерапия с АСЕ инхибитори, както и при 20 нормотензивни контроли.

1.3. Получаване на биологичен материал

За целите на настоящия труд се използва венозна кръв

1.3.1. Определяне оксидативен статус

За определяне на оксидативния статус кръвта се взема в 3,5 ml контейнери с антикоагулант EDTA – за отделяне на плазма и еритроцити (до 30 min след венепункцията).

1.3.2. Определяне на серумната химаза

За определяне на серумната химаза кръвта се взема в епруветки за серум с гел и с клот-активатор (SST). След отделяне на кръвния серум от кръвните клетки, епруветките се центрофугират на 1500 оборота/min за 5 min и серумът се отделя в нова чиста 1.5 ml епруветка. Събраните проби са съхранявани на -70^0 C до момента на извършване на ELISA тестовете.

1.3.3. Биологичен материал за изследване на плазмено ниво на протеини от RAS системата

Венозна кръв (2 ml) от пациентите и от контролната група лица е взета с антикоагулант EDTA. Чрез центрофугиране са разделени също кръвната плазма и формените елементи на кръвта. Събраните проби са съхранявани на -70^0 C до момента на извършване на тестовете ELISA за количествено определяне на протеини от РАС системата.

1.3.4. Биологичен материал за изолиране на генома ДНК

За изолирането на генома ДНК е използвана венозна кръв (между 200 µl и 2 ml в зависимост от подхода) с антикоагулант EDTA или натриев цитрат, тъй като е известно, че някои антикоагуланти не са подходящи за целта, например хепарин, който е инхибитор на ензимното амплифициране при PCR базирани методи.

2. Химикали и реактиви

2.1. Химикали и реактиви за определяне оксидативен стрес

Използваните реактиви: Xanthine Oxidase from bovine milk (XO), Nitro Blue Tetrazolium (NBT), Hypoxanthine (HX) (6-Hydroxypurine), 2-Thiobarbituric acid (TBA), Carboxy.PTIO – potassium salt, Dimethyl sulfoxide (DMSO), N-tert-butyl-alpha-phenyl-nitrone (PBN), 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) – са търговски продукт на фирмата Sigma-Aldrich, USA. За определяне на 8-OHdG се използва ELISA кит OxiSelectTM Oxidative DNA Damage ELISA Kit 8-OHdG Quantitation на Cell Biolabs, INC, USA

2.2. Химикали и реактиви за изолиране на геномна ДНК

Всички използвани реактиви и химикали за приготвяне на буфери и реакционни смеси са с качество “за анализ“, произведени от фирмите Sigma, Merck, Fluka, Applied Biosystems, Thermo Scientific.

Реактиви и буфери за изолиране на ДНК

Еритроцит лизиращ буфер (pH 7.4): 155 mM NH_4Cl; 10 mM $KHCO_3$; 0.1 mM Na_2EDTA. *Нуклеозиращ буфер* (pH 8.0): 75 mM NH_4Cl, 25 mM Na_2EDTA; *протеиназа К*; 10% натриев додецил сулфат (SDS); 6M NaCl; 3M натриев цитрат (pH 5.9); 96 и 70% етанол; стерилен TE буфер (pH 7.4): 10 mM Tris; 0.1 mM EDTA. Коригирането на pH е осъществено с HCl.

Таблица 11. Реакционна смес за полимеразно верижна реакция

Реактив	**Крайна концентрация**
Геномна ДНК	0.1-0.5 µg
10 x PCR буфер	1x
$MgCl_2$	Различна (1.5-3 mM)
Микс от четирите дНТФ	100 µM всеки дНТФ
Праймери	0.4 µM всеки
Taq полимераза	1 U/реакции
Дейонизирана вода	До краен обем 20 µl

Реактиви и буфери за агарозна хоризонтална електрофореза

Използван е TBE буфер за електрофореза, 10x концентриран, със състав: 90 mM Tris; 90 mM борна киселина; 1 mM Na_2 EDTA; етидиев бромид 10 mg/ml за визуализация на двойноверижни ДНК фрагменти; агароза.

Китове за количествено определяне на протеини от RAS системата

– Плазмените нива на ACE са изследвани чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), като са използвани китове, доставени от R & D Systems. Средна минимална детектеруема концентрация (MDD) е 0.019 ng/ml. Използвани са стандарти за построяване на стандартна права в диапазона от 0.78 ng/ml до 100 ng/ml;

– Плазмени нива на ACE 2;

– Серумните нива на химаза са изследвани чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA), като са използвани китове, доставени от Cusabio Biotech Co, Ltd. Средна MDD е 0.039 ng/ml. Използвани са стандарти за построяване на стандартна права в диапазона от 0.156 ng/ml до 10 ng/ml;

– Плазмени нива на ангиотензин II са изследвани чрез ензимносвързан имуносорбентен анализ (ELISA), като са използвани китове, доставени от Sigma-Aldrich. Средна MDD е 2.62 pg/ml. Използвани са стандарти за построяване на стандартна права в диапазона от 0.1 pg/ml до 1000 pg/ml

3. Методи

3.1. Изследвания на оксидативен стрес

Изследванията на оксидативния стрес са извършени в Лаборатория по оксидативен стрес и Лаборатория по ЕПР спектроскопия в Катедра "Химия и биохимия" на Медицинския факултет при Тракийския университет. Спектрофотометричните измервания са извършени със спектрофотометър Thermo Science. EPR изследванията са проведени при стайна температура на EPR спектрометър X-band EMXmicro Bruker, Germany, оборудван със стандартен резонатор. За изследване на пробите като епруветки са използвани кварцови капилярки, които след затваряне се поставят в стандартни EPR кварцови тръбички.

3.1.1. Биохимични методи

3.1.1.1. Обработка на периферна кръв. Венозна кръв в обем 5 ml се взема в деня на извършване на изследването с антикоагулант комплексон III (двунатриева сол на етилендиаминотетраоцетна киселина – EDTA-2Na). Кръвта се центрофугира при 3000 g за 15 min за отделяне на плазмата. Плазмата се използва за определяне на: свободни радикали (аскорбатни радикали, NO радикали и ROS продукти) и продукти на липидно перокисление, както и се замразява при -70º C за изследвания с имуноензимни методи (ELISA).

3.1.1.2. Обработка на еритроцити. Еритроцитите се промиват трикратно с физиологичен разтвор (1:3/v:v) и се лизират при следни условия: към 0.5 ml клетъчна суспенсия се прибавя 2 ml студена дестилирана вода и се разбърква 30 min на ледена баня (128). За отделяне на хемоглобина към 0.2 ml еритроцитен лизат се прибавят 1.8 ml дестилирана вода и 1 ml смес етанол/хлороформ (3:5/v:v). Сместа престоява 5 min, като през това време се разбърква многократно, след което се центрофугира за 20 min при 2500 g и преципитираният хемоглобин се седиментира. За определяне на ензимните активности се използва супернатанта.

3.1.2. Спектрофотометрични методи

3.1.2.1. Депротеинизиране на плазмата. За определяне на продуктите на липидно перокисление в плазма се отделят протеините, т.е. *плазмата се депротеинизира*.

Накратко: към 2.5 ml плазма се прибавят 2.5 ml физиологичен разтвор и 2.5 ml 25% трихлороцетна киселина (ТХО). Сместа се разбърква 5 min и центрофугира 15 min на 2000 g.

3.1.2.2. Определяне на липидно перокисление в плазма. Общото количество на продуктите на прекисно окисление се определя в плазма чрез метода на тиобарбитуровата киселина (TBA), който се основава на спектрофотометрично измерване (λ = 532 nm) на малондиалдехидните реактивни продукти (MDA) по метода на Plaser (129) и модифициран от Gadjeva et al., 2005 (130).

Накратко: 1 ml обезбелтъчена плазма се смесва с 0.25 ml прясно приготвен 1% разтвор на тиобарбитурова киселина (TBA). Сместа се нагрява 1 час при 95º C. След охлаждане се измерва на спектрофометър при дължина на вълната λ= 532 nm. Количеството MDA в изследваната проба се определя по следното уравнение:

$$1\mu mol/l\ MDA = \frac{OD_{532} \times 1.75}{0.156}$$

, където: **OD532** – оптическа плътност при λ = 532 nm и ε =1.55 x 10^5 M^{-1} cm^{-1}; 0.156 – абсорбционен коефициент на 1 mM разтвор на MDA.

3.1.3. ЕПР методи

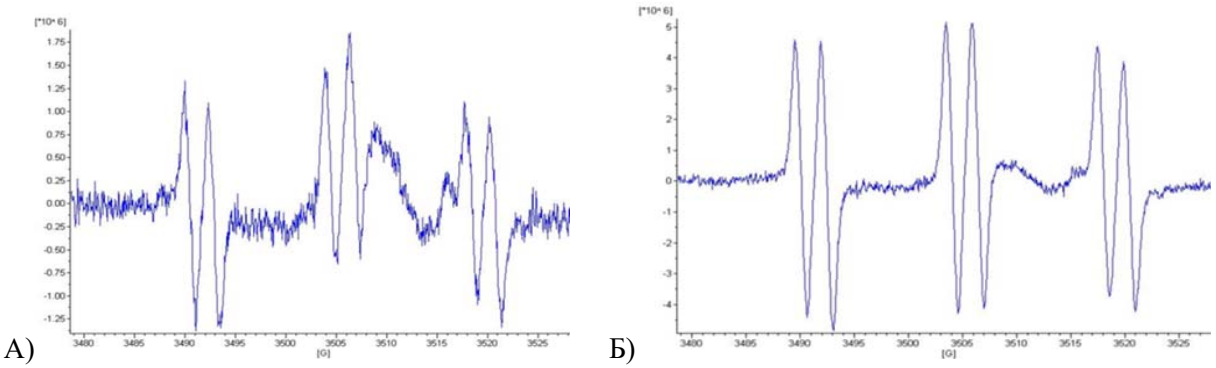
3.1.3.1. Ex vivo EPR метод за изследване на ***нивото на аскорбатни радикали*** (*Asc rad*) *като маркери за оксидативен стрес в плазма*. За изследването на аскорбатни радикали е използван методът на Bailey et al., 2004 (131) с модификации, направени от нас, като към 100 µL плазма се прибавят 900 µL DMSO, ценрофугират се на 4000 rpm за 10 min на 4º C. От всяка проба се заснемат по 3 спектъра при съответните EPR условия: Center field – 3505.00 G, Microwave power – 20.00 mW, Modulation amplitude - 1G, Sweep width – 15 G, Receiver gain – 1 x 10^5, Time constant – 40.96 ms, Sweep time – 60.42 s, 10 scans per sample.

3.1.3.2. Определяне на ***нивото на ROS продукти в плазма*** *чрез ex vivo EPR спин улавяща техника*. За доказване на „real time“ протичаща липидна пероксидация са определяни нивата на ROS продукти в серум чрез ex vivo EPR спин-улавяща техника по метод на Shi et al., 2005 (132), модифициран от Zheleva et al., 2011 (133). 100 µL серум се прибавят към 900 µL 50 mM PBN, разтворен в DMSO, ценрофугират се на 4000 rpm за 10 min на 4º C. От всяка проба се заснемат по 3 спектъра при съответните ЕПР условия: Center field – 3503.73 G, Microwave power – 20.00 mW, Modulation amplitude – 5 G, Sweep width – 50 G, Receiver gain -1 x 10^5, Time constant – 81.92 ms, Sweep time – 125.95 s. Scans per sample -5 scans.

3.1.3.3. Определяне на ***нивото на •NO радикали*** *в плазма чрез ex vivo EPR спин-улавяща техника.* На базата на методи, публикувани от Yoshioka et al., 1996 (134) и Yokoyama et al., 2004 (135), сме разработили и адаптирали EPR метод за определяне нивото на •NO радикали в серум и тъканен хомогенат. За целта се приготвя 50 µM разтвор на Carboxy.PTIO в смес, съдържаща Tris буфер (50 mM, pH 7.5) и DMSO в съотношение 9:1. 100 µL серум или 100 mg тъканен хомогенат се хомоге-

низират в 1000 µL смес от Tris буфер в DMSO (9:1) и се ценрофугират на 4000 rpm за 10 min на 4º С. За заснемане на EPR спектъра на спин-адукта, формиран между спин-уловителя Carboxy.PTIO и генерираните NO радикали, се смесват 100 µL от пробата със 100 µL 50 mM разтвор на Carboxy.PTIO. Всяка плазмена проба е изследвана като 3 отделни проби, като EPR спектрите са записвани при следните условия: Center field – 3505 G, Microwave power – 6.42 mW, Modulation amplitude – 5 G, Sweep width – 7 5 G, Receiver gain – 2.5 x 10^2, Time constant – 40.96 ms, Sweep time – 60.42 s, 1 scan per sample.

3.1.3.4. Обработване на получените EPR спектри и изчисления. Всички EPR спектри са обработвани със специалните програми Simphonia и WINEPR, разработени от фирмата Bruker, производител на EPR системата EMX^{micro}, използвана от нас за провеждане на EPR експериментите. Количествената оценка на показателите на оксидативен стрес в безразмерни единици (Arb. Units) е правена чрез двойно интегриране на площта под EPR спектрите.



А) Б)

Фиг. 14. EPR спектър на PBN адукт, регистриран в кръвен серум на пациенти на терапия с АСЕ инхибитор (А) и нормотензивни контроли (Б)

3.1.4. Имуно-ензимни методи

Ензимносвързан имуносорбентен анализ (ELISA) е основен имуноензимен метод с широк спектър на приложение в диагностиката и в научно-изследователската работа. Основава се на високоспецифична реакция антиген-антитяло, което позволява специфично количествено определяне на антигена в ниски концентрации. Чувствителността на метода е висока (LOD – 1 pg/ml), като съществуват различни модификации на технологията (напр. биотинилиране), допълнително повишаващи чувствителността му. Най-чест е използваният вариант на тест ELISA – „сандвичева“ ELISA, при който се използват две антитела, специфични към антигена, чиято концентрация се анализира. Първото антитяло – „хващащо“ антитяло, е абсорбирано на повърхността на микротитърната плака. При поставяне на анализираната биологична течност (серум, плазма или друга биологична течност/тъканен хомогенат), в която присъства таргентият антиген, се образува комплекс антиген–антитяло. При следваща стъпка на анализа, се прибавя второ конюгирано с ензим антитяло, което

разпознава други епитопи от анализирания антиген. Това антитяло се означава като *конюгатно антитяло*. Ензимите, които се използват при ELISA метода, при взаимодействието си със субстратите си образуват цветни продукти. Интензитетът на оцветяване пряко корелира с концентрацията на изследвания антиген и чрез измерване на оптичната плътност (OD) се изчислява точната концентрация. Във всички ELISA тестове са използвани стандарти (проби с известна концентрация на антиген), които позволяват построяването на стандартна права, за да се определени точната концентрация на изследвания таргет. Във всички ELISA тестове са използвани също и негативни, и позитивни контроли.

В изследванията, свързани с настоящия дисертационен труд, са използвани ELISA китове от реномирани производители, в които са доставени всички необходими реактиви и консумативи, включително стандарти и контроли, както и инструкции за употреба, което осигурява високо качество и възпроизводимост на получените резултати.

3.1.4.1. Количествено определяне на 8-OHdG. Китът за ДНК увреждане се използва за количествено определяне на 8-OHdG. Високите нива на 8-OHdG в пробите водят до ниски нива на свързване с антитялото в плаката (136) и се налага плазмените проби да се разреждат с разтворителя в кита. Разредените 20 пъти проби и приготвените стандарти в концентрационен диапазон от 0 до 100 ng/ml се поставят в предварително обработената с 8-OHdG конюгат плака. След кратко инкубиране се прибавя anti-8-OHdG моноклонално антитяло, последвано от HRP conjugated secondary antibody. Съдържанието на 8-OHdG ng/ml се определя по предварително построената стандартна крива на базата на различните концентрации на 8-OHdG стандарт.

3.1.4.2. Определяне на протеин-карбонилно съдържание (PCC). Използва се OxiSelectTM Protein Carbonyl ELISA Kit. Предварително се определя количеството на протеина в изследваната проба с Total Protein Kit на Human и за получаване на 10 µg/mL протеин серумните проби се разреждат с PBS, pH = 7.4. BSA стандартът (редуциран/окислен) и изследваните проби (10 µg/mL) се адсорбират върху плака с 96 гнезда за 2 часа при 37º C. Протеин-карбонилът, намиращ се в пробите и стандарта, реагира с DNPH до образуване на DNP hydrazone, обработва се с anti-DNP antibody и HRP conjugated secondary antibody.

Протеин карбонилното съдържание в пробите се определя по стандартна крива, която се приготвя от абсорбциите, получени на база окислен/редуциран BSA стандарти и се пресмята протеин карбонилното съдържание в пробите в nmol/mg.

3.1.4.3. Количествено определяне на белтъци от RAS системата в серум/плазма от пациенти. Методът ELISA е използван също и за количествено определяне на белтъци от RAS системата в серум/плазма от пациенти и здрави доброволци, а именно, нива на ACE, химаза и на ангиотензин II. ELISA тестовете са осъществени чрез използване на стандартизирани ELISA китове с производители съответно R & D Systems, Cusabio Biotech Co и Sigma. Анализът е изработен по протоколите, предоставени от фирмата производител. Всички проби са дублирани. Интензитетът на цветната реакция се отчита в единици оптична плътност (OD единици) при дължина на вълната 450 nm с референтен филтър при дължина на вълната 570 nm, отчетена на ELISA ридер (Thermo Scientific Multiskan EX, USA). Концентрацията на прицелните белтъци е определена по стандартна права, за чието построяване са използвани стандарти, предоставени с ELISA китовете.

3.2. Молекулярно биологични методи

3.2.1. Изолиране на ДНК

За изолиране на геномна ДНК е използвана венозна кръв от пациенти и от здрави донори, взета в стерилни епруветки с антикоагулант Na_3EDTA или натриев цитрат. Изолирането на геномна ДНК е осъществено по няколко метода:

♦ *Солево екстрахиране на ДНК от венозна кръв*, описан от Miller и съавт. (1988). Основните стъпки са, както следва:

– към 2 ml венозна кръв се прибавят 6 ml еритроцит-лизиращ буфер и се инкубират за 30 min на лед;

– ядрените клетки се утаяват чрез центрофугиране на 3000 об/min за 10 min при температура 4° С. Получената утайка е ресуспендирана в 10 ml студен еритроцит-лизиращ буфер и клетъчната фракция отново се центрофугира на 3000 об/min за 10 min при температура 4° С. В отделни случаи (при необходимост) лизирането на еритроцитите се повторя до получаване на чиста утайка от левкоцити.

– утайката от клетки се ресуспендира в 5 ml нуклеолизиращ буфер, към който се прибавят 400 µl 10% натриев додецил сулфат и 25 µl протеиназа К (10 mg/ml). Получената смес се инкубира на 37° С за цяла нощ (12 часа), като лизисът на клетките се контролира визуално. При недобър лизис се добавя допълнително количество протеиназа К и реакционната смес се инкубира на 37° С за 18 часа.

– солево екстрахиране на ДНК: към реакционната смес се добавят 2 ml преситен разтвор на NaCl и след интензивно разбъркване белтъците се утаяват чрез центрофугиране на 3000 об./min за 15 min;

– преципитацията на ДНК се постига чрез прибавяне на минимум 2 обема леден абсолютен етанол;

– след промиване на ДНК със 70% етанол ДНК се оставя да съхне на стайна температура и се разтваря в стерилен ТЕ буфер и съхранява на -20° С.

♦ *Изолиране на геномна ДНК с 5% Chelex.* Приложен е също Chelex методът за изолиране на ДНК за 200 µl венозна кръв, като след лизиране на еритроцитите, са добавени 200 µl 5% Chelex и 1µl протеиназа К (20 mg/ml). След инкубиране при 56º С за 60 min при периодично вортексиране, за да се отдели ДНК от смолата, пробите са инкубирани на водна баня и след центрофугиране е отделена супернатантата, съдържаща ДНК, и са съхранявани при -20ºС.

♦ *Определяне количеството на изолираната геномна ДНК*. За определяне количеството и чистотата на изолираната ДНК беше използван спекторфотометричен метод, при измерване на оптичната плътност при дължина на вълната 260 nm и съотношението 280 nm.

3.2.2. Полимеразно-верижна реакция (PCR)

♦ *Класическа PCR*. Методът PCR се използва с цел амплификация на желаните фрагменти, съдържащи полиморфното място на гена за ACE. Използва се апарат GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosistems на територията на Катедра „Молекулярна биология, имунология и медицинска генетика“ към Медицинския факултет при Тракийския университет – Стара Загора.

Принципът на класическата PCR е намножаване/амплифициране на специфичен ДНК фрагмент в in vitro условия. Специфичността на реакцията се осигурява чрез използване на олигонуклеотиди (праймери), които фланкират изследвания ДНК и осигуряват свободен 3‘-OH край, необходим за работата на ДНК-полимеразата. Амплификацията се постига чрез многократно (средно 30) повторение на три основни стъпки: 1) денатурация на двойноверижната ДНК; 2) анилинг – хибридизация на комплементарните участъци от ДНК матрицата с праймерите и 3) удължаване на новосинтезиращата се верига от ДНК-полимеразата.

За генотипизиране на I/D полиморфизма в ACE гена са изполвани две последователни PCR реакции, чийто конкретни температурни условия са представени на табл. 12.

Таблица 12. Условия за амплификация за изследване на I/D полиморфизъм в ACE гена

Генотипизиране по I/D полиморфизъм	Денатурация		Анилинг		Удължаване		Брой цикли
	T° C	Време	T° C	Време	T° C	Време	
I PCR	94°C	1 min	58°C	1 min	72°C	1 min	30
II PCR	94°C	30 s	67°C	30 s	72°C	30 s	30

Първоначално всички проби се инкубират на 95° C за 10 min и след проведените по 30 цикъла от съответните температурни стъпки пробите са инкубирани на 72° C за 7 min и охладени на 4° C до електрофоретичното им разделяне и отчитане на резултата.

Температурата на анилинг зависи от нуклеотидния състав на използваните праймери, като секвенцията на приложените от нас праймери, големината на амплификационните продукти и използваните литературни източници са представени на табл. 13. В случая, при детекция на полиморфизъм, дължащ се на инсерция/делеция, използваните праймери при I PCR ограничават полиморфното място, и при наличие на инсерция се амплифицира по-голям фрагмент, а при липсата му – по-малък. При вторият PCR се използват праймери, които са комплементарни на инсерционния алел-I, и се прилагат за потвърждаване или отхвърляне на DD-генотипа, установен от I PCR.

Таблица 13. Секвенция на използваните праймери и големина на амплификационните фрагменти

Генотипизиране по I/D полиморфизъм	Секвенция на използваните праймери	Големина на амплифицирания фрагмент	Референция
I PCR	5'-CTGGAGACCACTCCCATC CTTTCT -3' 5'-GATGTGGCCATCACATTC GTCAGAT -3'	D-алел: 190bp I алел: 490 bp	Erdogan et al. (2004)
II PCR	5'-TGGGACCACAGCGCCCG CCACTAC -3' 5'-TCGCCAGCCCTCCCATGC CCATAA -3'	I алел: 335bp D-алел: не се амплифицира специфичен фрагмент	Erdogan et al. (2004)

При всяка амплификация се прилага т.нар. *нулева контрола* (реакционна смес от всички компоненти без ДНК матрица) с цел проверка за контаминация на компонентите, както и една положителна контрола (успешно амплифицирана ДНК матрица с известен генотип).

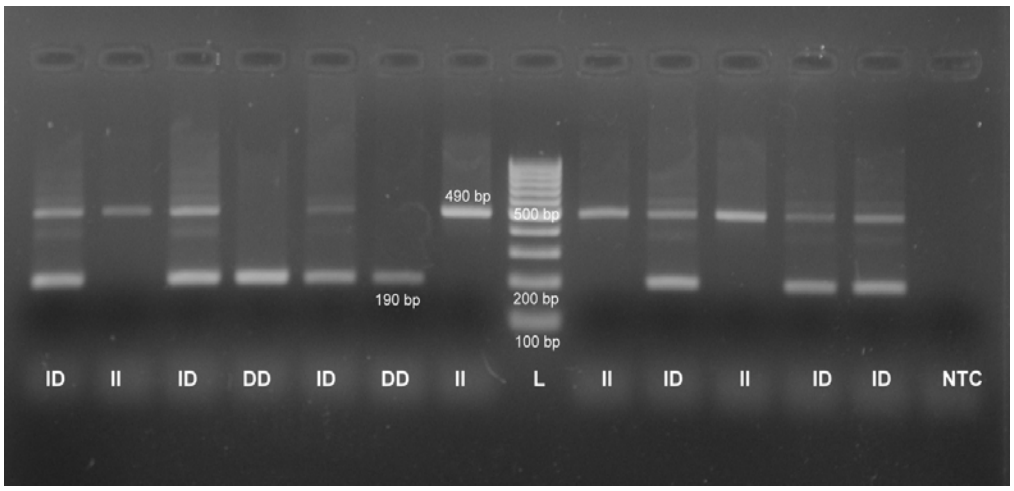
За да се осигури по-голяма точност и вътрешен контрол върху проведените анализи, 10% от случайно избрани ДНК матрици са генотипизирани повторно, като не се установи разлика в генотипизирането за нито една ДНК проба.

Съставът на реакционната смес, както и използваните концентрации за проведените PCR реакции са представени на табл. 14.

Таблица14. Реакционна смес за полимеразно верижна реакция при изследване на I/D полиморфизмът в ACE гена

Реактив	**Крайна концентрация – I PCR**	**Крайна концентрация – II PCR**
Геномна ДНК	20-50 ng/ µl	50-100 ng/µl
10 x PCR буфер	1x	1x
$MgCl_2$	3 mM	1.5 mM
Микс от четирите дНТФ	0.2 mM	0.2 mM
Праймери	0.8 pM всеки	0.8 pM всеки
Taq полимераза	1 U/реакции	1 U/реакции
Дейонизирана вода	До краен обем 20 µl	До краен обем 20 µl

♦ *Определяне на I/D полиморфизъм в ACE гена*. За определяне на I/D полиморфизъм в ACE гена е използван PCR метод, при който се амплифицира фрагмент с дължина 490 bp при наличието на инсерция на Alu-елемент в интрон 16 на ACE гена, означаван като I-алел. При отсъствието на Alu-инсерция амплификационният продукт е по-къс и е с дължина 190 bp, означаван като D-алел (фиг. 15). Тъй като е известно, че D-алела се амплифицира преференциално, за да се избегне погрешно отчитане на хетерозиготния генотип-ID като хомозиготен-DD, е проведен втори PCR на всички проби, отчетени като DD, при който се използват праймери, специфични за алел-I. При наличие на Alu-инсерция се отчита амплификационен продукт с дължина 335 bp, а при D-алел отсъства амплификационен продукт. Процентът на пробите, типизирани като хомозиготи DD-генотип при първия PCR, които са с хетерозиготния генотип-ID, отчетен след втория PCR е нисък – 0.71% (1 от 141 ДНК проби).



Ампликонът на алел-I е с дължина 490 bp, а на алел-D с дължина 190 bp

L (ladder) – маркер за големината на ДНК фрагментите през 100 bp; **NTC** – non-template control

Фиг. 15. Електрофореза в 2% агарозен гел на ампликони след PCR за генотипизиране по I/D полиморфизъм в ACE ген

3.2.3. Електрофореза на ДНК

Разделянето на амплификационните продукти според големината им е постигнато чрез хоризонтална електрофореза в агарозен гел. Електрофоретичното разделяне на PCR продуктите е осъществено в 2% агарозен гел (Sigma Chemical Co), оцветен с етидиев бромид в концентрация 0.5 mg/ml (Sigma Chemical Co). При всяка електрофореза е използван маркер за големината на ДНК фрагментите през 100 bp, в концентрация 2 µg/старт. Използван е апарат за хоризонтална електрофореза, доставен от Strategene с токоизправител Strategene Festher Volt 500, при постоянен волтаж 180 V.

3.3. Кръвната картина, биохимия и йонограма

Кръвната картина, биохимията и йонограмата на всеки пациент са проведени в клинични лаборатории към съответната здравна институция: болница, диагностично-консултативен център, индивидуална практика за първична медицинска помощ, групова практика за първична медицинска помощ, в съответствие с изискванията на Наредба № 1 от 31.01.2014 г. за утвърждаване на медицински стандарт "Клинична лаборатория" (вж. *Приложение 2*).

♦ *Определяне на липиден профил*. Общите стойности на холестерол се определят чрез ензимен колориметричен анализ *Определяне на серумен холестерол* (CHOD-PAP). Ние използвахме следната класификация на риска за общия холестерол: желателно < 200 mg/dl (5,2 mmol/ l); гранично висока – 200-239 mg/dl (5.2-6.2 mmol/l); висока > 240 mg/dl (6.2 mmol/l). Според *National Cholesterol Education Program*, ако човек няма други рискови фактори, нивото на

LDL може да се оцени, както следва: по-малко от 100 mg/dl (2.59 mmol /l) – оптимално; 100-129 mg/dl (2.59- 3.34 mmol/ l) – близко до оптималното; 130-159 mg/dl (3.37-4.12 mmol /l) – гранично високо; 160-189 mg/dl (4.15-4.90 mmol /l) – високо; над 189 mg/dl (4.90 mmol /l) – много високо; за HDL < 40 mg/dl – нисък; ≥ 60 mg/dl – висок (0,9-2,5 mmol/l).

♦ *Серумните нива на триглицеридите* се определят по метода на ензимен колориметричен анализ и (GPO-PAP). Ние използвахме NCEP (American National Cholesterol Education Program) класификация на серумните нива на триглицеридите в съответствие с риска от развитие на коронарни сърдечни заболявания: за нормална е приета стойността < 150 mg/dl (1.7 mmol/l); гранично висока – 150-199 mg/dl (1.7-2.2 mmol/l); висока – 200-499 mg/dl (2.3-5.6 mmol/l); много висока ≥ 500 mg/dl. (5.6 mmol/l)

3.4. Статистически анализи

Изчисление на генотипни и алелни честоти

За изчисляване на генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфизми е използвана статическа програма – SPSS software, version 21 (IBM, Chicago, IL) и резултатите са представени като процент или като десетична дроб.

Генотипната честота на всеки генотип се определя по формулата:

$$\text{Генотипна честота (\%)} = \frac{\text{брой пациенти с дадения генотип}}{\text{общ брой пациенти}} \text{ x } 100$$

Алелната честота на всеки алел се определя по формулата:

$$\text{Алелна честота (\%)} = \frac{2 \text{ x брой пациенти с хомозиготен генотип + брой пациенти с хетерозиготен генотип}}{2 \text{ x общ брой пациенти}} \text{ x } 100$$

Логистичен регресивен анализ

Логистичен регресивен анализ е използван за установяване наличието или липсата на връзка между две вариабилности; за изследване влиянието на даден рисков фактор или носителството му върху възприемчивостта, за развитието или изхода на дадено заболяване. В епидемиологични изследвания от типа „пациент-контрола“ за изчисляване на риска е използвано отношението на разликите – OR (odds ratio) с 95% доверителен интервал (95% CI), съгласно 2 x 2 таблица.

	Пациенти	Контроли
Наличие на рисков фактор	A	B
Отсъствие на рисков фактор	C	D

$$OR = \frac{(A/C)}{(B/D)} = \frac{(A + D)}{(B \times C)}$$

Стойностите на OR над 1 (OR > 1) показва потенциален риск, а стойности OR<1 показва протективен ефект на носителството на даден генотип. Стойностите на OR са изчислени на базата на следните достъпни онлайн калкулатори: http://members.aol.com/johnp71/javastat.html; http://www.unc.edu/~preacher

– *Непараметричен анализ. Хи-квадрат тест* (chi-square test) е използван за сравнение на генотипни и алелни честоти между изследваните групи. Използвана е четирикратна таблица (2 x 2) или многократна таблица, в зависимост от използваните признаци в разпределянето на изследваните случаи. Хи-квадрат тест е използван и при проверка валидността на закона на Харди–Вайнбергер (дали наблюдаваните честоти в изследваните групи се различават достоверно от очакваните честоти).

– *Тест на Фишер за точна прецизна вероятност* (Fisher exact test). Тестът за точна прецизна вероятност е използван при сравнение на алелни и генотипни честоти на по-малки групи, когато очакваната честота е под 5. В случаите когато в 2 x 2 таблиците една клетка са съдържат случаи с брой по-малък от 5, за статистически достоверна е приета коригираната по Yates` p-стойност, означена като ***pc***.

– *t-тест на Student*. За независими проби е използван t-тест на Student, който показва дали наблюдаваните различия са съществени или се дължат на случайни причини. t-тест на Student (параметричен аналог на U-тест на Mann-Whitney) е използван за сравнение на групи от независими величини в случаите, при които данните имат нормално Гаусово разпределение.

– *U-тест на Mann-Whitney*. U-тест на Mann-Whitney е използван за сравнение на групи от независими величини за да се определи значимостта на наблюдаваните различия в изследваните групи. Тестът е прилаган в случаите, когато данните нямат нормално Гаусово разпределение.

При всички използвани анализи за статистически достоверни се приемат различия при ниво на значимост $p < 0.05$.

Статистическата обработка на данните и тяхното представяне в графичен или табличен вид е извършено с помощта на софтуерните продукти SPSS Software, Stastica и Excel

В ОБОБЩЕНИЕ

В дисертационния труд, след получаване на информирано съгласие, са включени изследвания върху група от 140 лица с първична АХ, отговарящи на определени критерии, както и 20 нормотензивни доброволци. Пациентите са подразделени според вида на лечението в три групи: на монотерапия с АСЕ инхибитор (Lisinopril 5-10 mg/дневно), на комбинирана терапия (Lizinopril 5-10 mg + Bisoprolol 5 mg) и лекувани с АРБ като монотерапия (Valsartan 160 mg/d). От кръвна проба на участниците са изследвани някои показатели за оксидативен стрес (ROS продукти, аскорбатни радикали, NO радикал, MDA, PCC и 8-OHdG), протеини от РААС системата (серумните нива на химаза, ангиотензин 2, ангиотензин-конвертиращ ензим и АСЕ2), както и I/D полиморфизъм в АСЕ гена. Използвани са разнообразни методи – ЕПР спектроскопия, спектрофотометрични методи, ELISA, PCR. За обработка и представяне на получените резултати са приложени статистически анализи (използвана е статическа програма – SPSS Software).

V. РЕЗУЛТАТИ

1. Собствено проучване върху показатели на оксидативния стрес и антиоксидантния статус при пациенти с артериална хипертония, разделени според вида на приеманата антихипертензивна терапия, сравнени с нормотензивни контроли

При нормални физиологични условия в човешкия организъм съществува деликатен баланс между продукцията на ROS и елиминирането им от защитните антиоксидантни системи. Високите нива на ROS или неадекватното им отстраняване от клетъчните защитни механизми води до оксидативен стрес, който може да причини клетъчни увреждания на всички основни компоненти – ДНК, протеини, липиди. Оксидативният стрес играе съществена роля и в развитието на редица заболявания и тяхната терапия. Данни, базирани на повишени плазмени нива на активни субстанции на тиобарбитуровата киселина и 8-epi-isoprostanes, биомаркери за липидна пероксидация и оксидативен стрес (122; 123), показват, че оксидативният стрес е увеличен при пациенти с есенциална хипертония, реноваскуларна хипертония, злокачествена хипертония, сол-чувствителна хипертония, циклоспорин-индуцирана хипертония, прееклампсия (120; 121) и сочат за възможна роля на оксидативния стрес в патофизиологията на артериалната хипертония.

В настоящото проучване съпоставихме нивото на оксидативен стрес на пациентите с АХ, разделени в зависимост от вида на приеманата антихипертензивна терапия, и групата нормотензивни контроли с оглед възможностите за повлияване на оксидативната токсичност при провеждане на антихипертензивно лечение.

При всички пациенти са определени 3 важни показателя на оксидативен стрес – крайни продукти на окисление на липиди, протеини и нуклеинови киселини. Проведено е спектрофотометрично отчитане на плазмените нива на липидно перокисление (MDA), определяне чрез имуноензимен метод (ELISA) на нивото на модифицираните протеини в кръвна плазма и количеството на 8-OHdG за ДНК увреждане.

С цел проучване и изясняване на радикаловите механизми на хипертонията и възможностите за терапевтично редуциране на оксидантното въздействие са определени чрез EPR спектроскопия нивото на ROS продукти, аскорбатните и •NO радикали в кръвната плазма, които показват моментния оксидативен стрес т.нар. показатели в реално време („real time“). Получените резултати са сравнени с контроли –

физически здрави, не страдащи от болестта доброволци. Проведеният анализ показа значително по-високи нива при всеки от отчитаните параметри при пациенти с високо кръвно налягане в сравнение със здрави контроли.

1.1. Възрастово разпределение на изследваните пациенти за параметри на оксидативен стрес

Таблица 15. Средната възраст на всички изследвани за параметри на оксидативен стрес

	Пол-мъже	N	Mean	Std. deviation	Std. error mean
Възраст	Пациенти с АХ	82	56,4500	13,05455	1,68533
	Нормотензивни контроли	20	49,1000	6,98331	2,20832

Сравнението между двете групи чрез t-test показва p = 0.088 (Std. deviation – стандартно отклонение, Std. error mean – стандартна средна грешка)

Таблица 16. Средна възраст на изследваните пациенти за параметри на оксидативния стрес по групи в зависимост от вида на терапията

	Терапия	**N**	**Mean**	**Std. deviation**	**Std. error mean**
Възраст	АСЕ инхибитор	41	52,2439	11,50604	1,79694
	АРБ	20	63,7000	11,66238	3,68797
	Комб. (АСЕ + β-блокер)	21	67,5556	12,11519	4,03840

Сравнението между отделните групи чрез t-test показва:

- на терапия с АСЕ инхибитори спрямо ARB **p = 0.007**
- на терапия с АСЕ инхибитори спрямо комбинирана терапия **p = 0.001**
- на терапия с ARB спрямо комбинирана терапия **p = 0.489**

Таблица 17. Средната възраст на изследваните пациенти за параметри на оксидативния стрес по групи в зависимост от контрола на хипертонията

	Контрол на кръвното налягане	**N**	**Mean**	**Std. deviation**	**Std. error mean**
Възраст	Контролирана АХ	50	53,2821	12,55713	2,01075
	Неконтролирана АХ	32	62,3333	12,13397	2,64785

Сравнението между двете групи чрез t-test показва p = 0.009

Сравнението между отделните групи чрез t-test показва, че няма статистическа значима разлика във възрастта на пациентите в зависимост от контрола на хипертонията в групите на лекуваните с ARB (p = 0.289) и тези на комбинирана терапия (p = 0.658). Възрастта на пациентите на монотерапия с АСЕ инхибитори и с добър контрол на АХ е значимо по-ниска в сравнение с лицата на монотерапия с АСЕ инхибитори, но с лош контрол на АХ (p = 0.025).

Таблица 18. Средната възраст на изследваните пациенти за параметри на оксидативния стрес по групи в зависимост от вида на терапията и контрола на хипертонията

	Therapy_kod	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Възраст	АСЕ инхибитор	41	52,2439	11,50604	1,79694
	Контролирана АХ	28	49,5357	10,44024	1,97302
	Неконтролирана АХ	13	58,0769	11,91960	3,30590
	АРБ	20	63,7000	11,66238	3,68797
	Контролирана АХ	11	60,3333	12,27464	5,01110
	Неконтролирана АХ	9	68,7500	10,01249	5,00625
	АСЕ + β-блокер	21	67,5556	12,11519	4,03840
	Контролирана АХ	12	65,8000	14,32480	6,40625
	Неконтролирана АХ	9	69,7500	10,30776	5,15388

В допълнение, възрастта на пациентите с добър контрол на АХ на монотерапия с АСЕ инхибитори е значимо по-ниска от възрастта на третираните с ARB (p = 0.033) и с комбинирана терапия (p = 0.005), които са с добър контрол на заболяването. Възрастта на пациенти с лош контрол на АХ в трите подгрупи в зависимост от вида на терапия е сходна и не са установени значими разлики.

1.2. Проучване на влиянието на лекарствената терапия върху „real time" показатели на оксидативен стрес – ROS продукти, аскорбатни радикали и •NO радикали

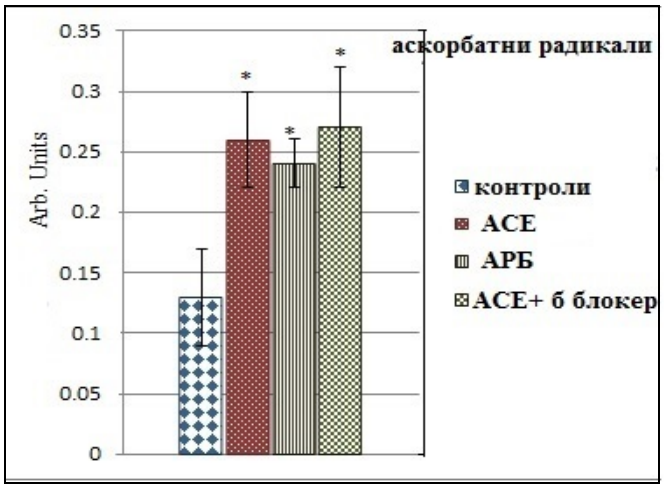
1.2.1. Определяне на аскорбатни радикали

Електрон-парамагнит-резонансната (EPR) спектроскопия е единствената аналитична техника, чрез която могат да се улавят и се доказват директно или индиректно радикалови структури, както в in vitro, така и in vivo системи. Аскорбатният анион (AH^-) е ендогенен водоразтворим антиоксидант, който след едноелектронно окисление произвежда аскорбатни свободни радикали (Asc•), поради което е лесно откриваем чрез EPR метода (137) при стайна температура.

В редица изследвания е документирано (137; 138), че аскорбатният радикал се явява надежден и real-time биомаркер за оксидативното състояние на изследваната биосистема. Чрез измерване интензитета на регистрирания EPR спектъра на Asc• или двойно интегриране на площта под този спектър, може да се получи информация за нивото на протичащите в момента оксидативни процеси в изследваната проба (139). В нашите изследвания нивата на Asc• радикали са изчислявани чрез двой-

но интегриране на площта под регистрирания EPR спектър и са изразени в безразмерни единици (Arb. Units).

На фиг. 16 е илюстрирано, че нивата на Asc• радикали при пациенти с АХ, провеждащи терапия, са повишени в сравнение с контролите.



* p > 0.05 vs. controls

Фиг. 16 Съпоставка между хипертоници, разделени в зависимост от вида на приеманата терапия, и нормотензивни контроли по отношение на нивото на аскорбатни радикали

Група	Средна стойност ± стандартна грешка	Сравнение с контроли (p-стойност)	Междугрупово сравнение (p-стойност)
Контроли	0,13 ± 0,1		
Lisinopril (ACE)	0,26 ± 0,09	p = 0.001 ACE/контроли	ACE/АРБ p = 0.76
Valsartan (ARB)	0,24 ± 0,09	p = 0.0004 АРБ/контроли	ACE/ACE + β-блокер p = 0.72
Комб. терапия Lisinopril + Bisoprolol	0,27 ± 0,08	p = 0.000 ACE + β-блокер/контроли	ACE + β-блокер/АРБ p = 0.43

Определянето на нивото на аскорбатни радикали в плазмата показа значително по-високото им ниво при болните с АХ, в сравнение с контролната група:

– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн – 0,26 arb. Units Asc. radicals спрямо нормотензивни контроли 0,13 Arb. Units Asc. radicals (**p = 0,001**);

– Valsartan 160 mg на ден – 0,24 Arb. Units Asc. radicals спрямо нормотензивни контроли 0,13 Arb. Units Asc. radicals (**p = 0,0004**);

– комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 0,27 Arb. Units Asc. radicals спрямо нормотензивни контроли 0,13 Arb. Units Asc. radicals (**p = 0,000**).

Не се установи статистически значима разлика между пациентите на различен вид лечение:

– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн – 0,26 Arb. Units Asc. radicals спрямо Valsartan 160 mg/дн – 0,24 Arb. Units Asc. radicals (**p = 0,76**);

– монотерапия с lisinopril 5-10 mg/дн – 0,26 arb. Units Asc. radicals спрямо комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 0,27 Arb. Units Asc. radicals (**p = 0,72**);

– комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн. + Bisoprolol 5 mg/дн – 0,27 Arb. Units Asc. radicals спрямо Valsartan 160 mg/дн – 0,24 Arb. Units Asc. radicals (**p = 0,43**).

1.2.2. Определяне на ROS продукти чрез спин-улавящия агент PBN

На отделни етапи от протичането на липидната пероксидация се образуват различни нестабилни радикалови видове, които могат да се измерят, в реално време. За разлика от стабилните Asc• радикали, които се доказват с директна EPR спектроскопия, нестабилните радикали, формирани при пероксидацията могат да се докажат, чрез спин-улавяща EPR техника. За оценка на оксидативния статус в кръвен серум, изолиран от контролите и пациентите, се приложи спин-уловителя PBN. Въпреки че не притежава специфичност, стабилността на образуваните от него спин-адукти е доста висока, поради което понастоящем е широко използван в in vitro и in vivo EPR спектроскопията.

EPR спектърът на образувания спин-адукт на PBN е характерен секстет с две сплитинг константи, едната a_N е резултат от взаимодействието на несдвоения електрон с ядрото на азотния атом, което произвежда триплетен EPR сигнал, а другата a_H се получава в резултат на допълнителното взаимодействието с ядрото на β-водорода от адукта, при което всяка от трите спектрални линии се разцепва на две.

В нашите изследвания нивата на генерираните нестабилни радикали (т.нар. ROS продукти) са изчислявани чрез двойно интегриране на площта под регистрирания EPR спектър и са изразявани в безразмерни единици. Подобно на повишението на нивата на Asc• радикали, е наблюдавано и повишение в нивата и на ROS продуктите (фиг. 17), измерени при пациентите с проведена терапия в сравнение с контроли.

Определяне на нивото на ROS продукти в плазмата показа значително повисокото им ниво при болните с АХ, сравнени с контролната група:

– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн – 2,54 Arb. Units ROS products спрямо нормотензивни контроли 0,73 Arb. Units ROS products (p = 0,000);

– Valsartan 160 mg/дн – 2,41 Arb. Units ROS products спрямо нормотензивни контроли 0,73 Arb. Units ROS products (p = 0,000);

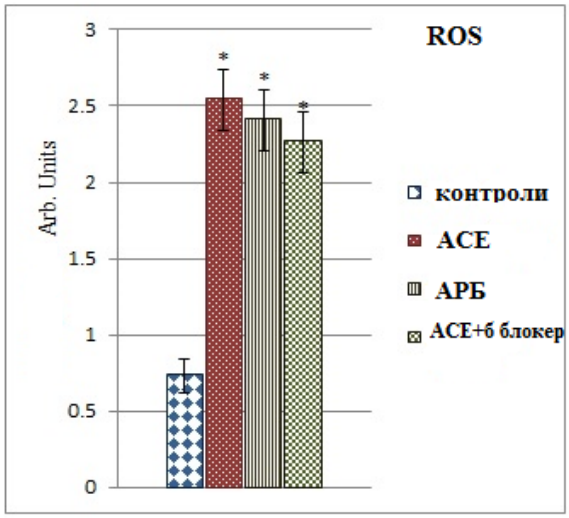
– комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 2,26 Arb. Units ROS products спрямо нормотензивни контроли 0,73 Arb. Units ROS products (p = 0,000).

Не е установена статистически значима разлика между пациентите на различен вид лечение:

– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн – 2,54 Arb. Units ROS products спрямо Valsartan 160 mg/дн – 2,41 Arb. Units ROS products (p = 0,48);

– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн – 2,54 Arb. Units ROS products спрямо комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 мг./дн - 2,26 (p = 0,73);

– комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 2,26 Arb. Units ROS products спрямо Valsartan 160 mg/дн – 2,41 Arb. Units ROS products (p = 0,64).



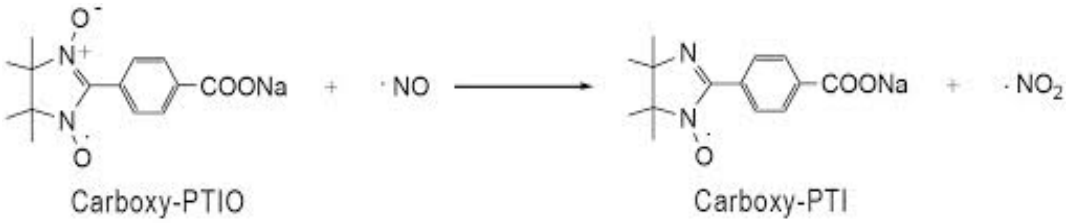
Фиг. 17. Съпоставка между хипертонии, разделени в зависимост от вида на приеманата терапия и нормотензивни контроли по отношение нивото на ROS в плазмата

ROS продукти в arb. Units

Група	Средна стойност ± стандар-	Сравнение с контроли (P-стойност)	Междугрупово сравнение (P-стойност)
Контроли	0.73 ± 0 .05		
Lisinopril (ACE)	2.54 ± 0.1	p = 0.000 ACE/контроли	p=0.48 ACE/АРБ
Valsartan (ARB)	2.41 ± 0.1	p = 0.000 АРБ/контроли	p=0.73 ACE/ACE + β-блокер
Комб. терапия Lisinopril +Bisoprolol	2.26 ± 0.1	p = 0.000 ACE + β-блокер/контроли	p=0.64 АРБ/ACE + β-блокер

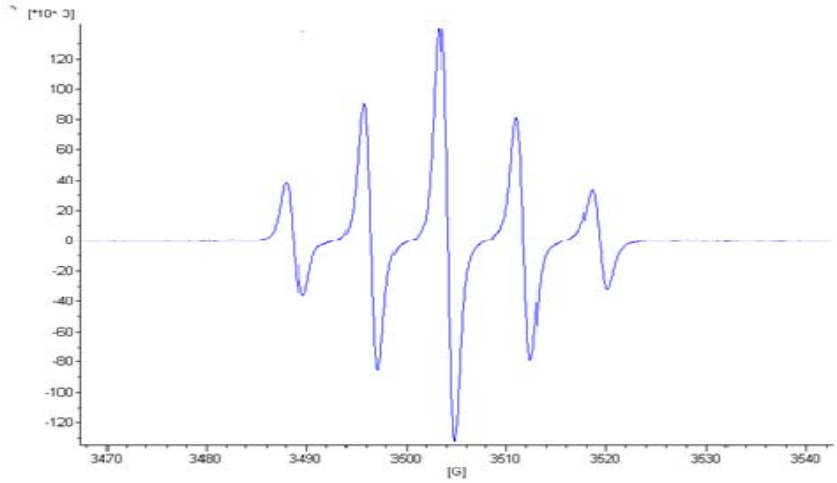
1.2.3. Определяне на •NO радикала чрез спин улавящия агент Carboxy-PTIO

Методът за улавяне на •NO радикала е разработен и адаптиран в *EPR Лаборатория* на Катедра “Химия и биохимия” на Медицинския факултет при Тракийския университет – Стара Загора, въз основа на публикувания от Yoshioka et al. (1996) и Yokoyama et al. (2004) метод. •NO радикалът се уловя от подходящ спин-уловител, в случая нитронил нитроксида Carboxy-PTIO, при което се регистрира спин-адуктът (Carboxy-PTI), представляващ съответния имино нитроксиден радикал (фиг. 18).



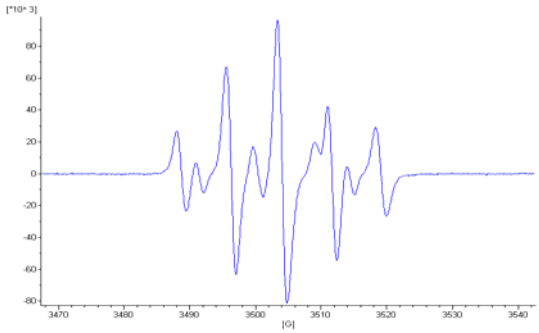
Фиг. 18. Химична реакция между •NO и спин-уловителя Carboxyl-PTIO, използван за качествено и количествено определяне на •NO

EPR спектърът на самия спин-уловител Carboxy-PTIO, се изявява като типичен петлинеен сигнал (фиг. 19).

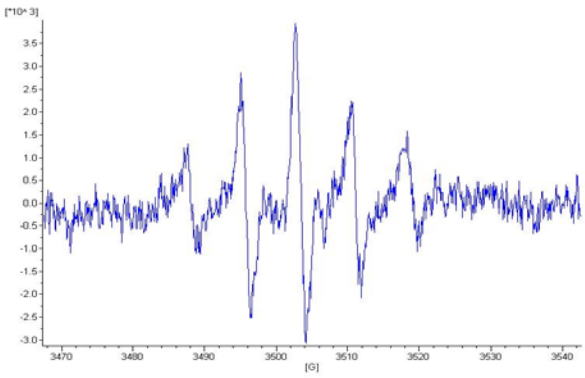


Фиг. 19. EPR спектър на Carboxy-PTIO

Азотоксидният спин-уловител Carboxy-PTIO е водоразтворим и стабилен спин-уловител, който в химични и биологични системи проявяват антагонизъм спрямо действието на •NO радикала и реагира в стехиометрично съотношение с него (Желева, 2012). Ако в изследваната система присъства азотен оксид, в EPR спектъра на образувания спин-адукт се появяват допълнително четири спектрални линии (фиг. 20) и се наблюдава промяна в интензитета на спектъра на спин-уловителя (фиг. 21).



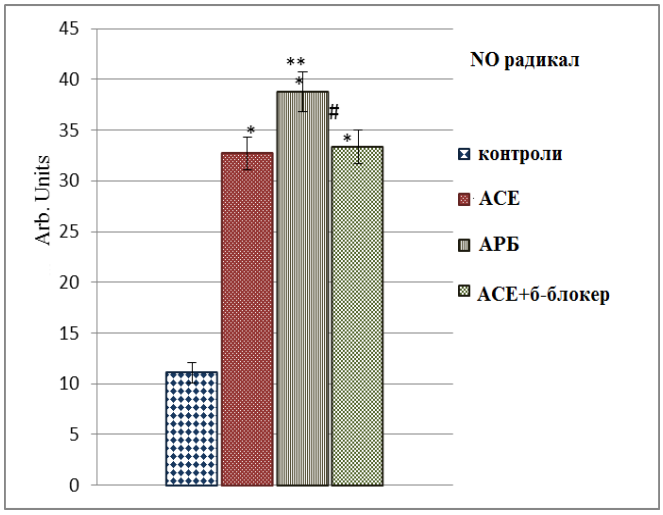
Фиг. 20. EPR спектър на Carboxy-PTI



Фиг. 21. EPR спектър на Carboxy-PTI/•NO спин адукта образуван след прибавяне на серум изолиран от пациент с АХ към спин уловителя Carboxy-PTIO

Някои автори (134, 135) отчитат нивото на генерираните •NO радикали по интензитета на първия пик на формирания спин-адукт. В нашите експерименти за да определим нивата на •NO радикалите в серумите на изследваните контроли и на пациентите, сравняваме стойността на двойноинтегрирания спектър на Carboxy-PTIO със стойностите на двойноинтегрираните EPR спектри, получени след прибавяне на изследваните серуми към спин-уловителя.

Наблюдава се статистически значимо повишение на нивото на регистрираните •NO радикали (фиг. 22) при пациентите в сравнение с контролите.



Фиг. 22. Съпоставка между хипертоници, разделени в зависимост от вида на приеманата терапия, и нормотензивни контроли по отношение на нивото на генерираните •NO радикали в плазмата
NO radicals в Arb. Units

Група	Средна стойност ± стандартна	Сравнение с контроли (P-стойност)	Междугрупово сравнение (P-стойност)
Контроли	11.07 ± 0.3		
Lisinopril (ACE)	32.7 ± 1.5	p = 0.000 ACE/контроли	ACE/АРБ p = 0.03**
Valsartan (АРБ)	38.79 ± 1.1	p = 0.000 АРБ/контроли	ACE/ACE+β-блокер p = 0.65
Комб. терапия Lisinopril + Bi-	33.37 ± 1.4	p = 0.000 ACE + β-блокер/контроли	АРБ/ACE+β-блокер p = 0.01#

Определянето на нивото на генерираните •NO радикали в плазмата показа значително по-високо ниво при болните с АХ, в сравнени с контролната група:

– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн. – 32,7 Arb. Units NO radicals спрямо нормотензивни контроли 11,07 Arb. Units NO radicals (**p = 0,000**);

– Valsartan 160 mg/ден – 38,79 Arb. Units NO radicals спрямо нормотензивни контроли 11,07 Arb. Units NO radicals (**p = 0,000**);

– комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн. + Bisoprolol 5 mg/дн. – 33,37 Arb. Units NO radicals спрямо нормотензивни контроли 11,07 Arb. Units NO radicals (**p = 0,000**);

Съпоставянето между отделните групи хипертоници с различна антихипертензивна терапия демонстрира статистически значимо по-високо радикалообразуване при пациентите на терапия с Valsartan 160 mg/дн.

– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн – 32,7 Arb. Units NO radicals спрямо Valsartan 160 mg/дн – 38,79 Arb. Units NO radicals (**p = 0,03**);

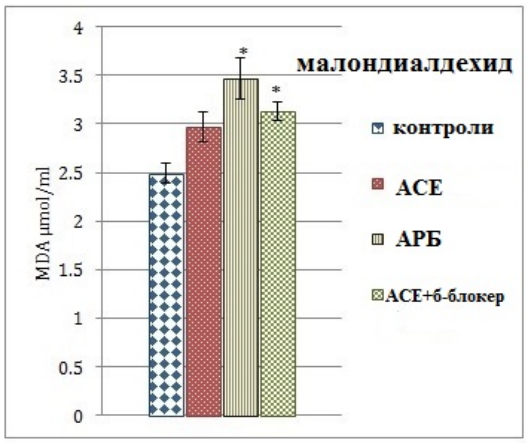
– комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 33,37 Arb. Units NO radicals спрямо Valsartan 160 mg/дн – 38,79 Arb. Units NO radicals (**p = 0,01**).

Не се установи значима разлика в нивото на плазмените •NO радикали между хипертониците на лечение с ACE инхибитор – монотерапия, и групата с добавен β-блокер: монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн – 32,7 Arb. Units NO radicals спрямо комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 33,37 Arb. Units NO radicals (**p = 0,65**).

1.3. Проучване на влиянието на лекарствената терапия върху подбрани показатели на оксидативния стрес – крайни продукти на окисление на липиди, протеини и нуклеинови киселини

1.3.1. Определяне нивото на продуктите на липидно перокисление (MDA)

Тъй като MDA е основен индикатор на процеса на липидна пероксидация се предполага, че увеличената липидна пероксидация е рисков фактор за наличие на оксидативен стрес при хипертоници. Нашите резултати от определянето на продуктите на липидно перокисление при пациентите са представени на фиг. 23.



Фиг. 23. Съпоставка между хипертоници, разделени в зависимост от вида на приеманата терапия, и нормотензивни контроли по отношение количеството на продуктите на прекисно окисление в плазмата
MDA µmol/ml

Група	Средна стойност ± стандартна грешка	Сравнение с контроли (p-стойност)	Междугрупово сравнение (p-стойност)
Контроли	2.49 ± 0.05		
Lisinopril (ACE)	2.97 ± 0.15	p = 0.09 ACE/контроли	ACE/АРБ p = 0.18
Valsartan(АРБ)	3.47 ± 0.21	p = 0.03 АРБ/контроли	ACE/ACE + β-блокер p = 0.61
Комбинирана терапия Lisinopril + Bisoprolol	3.13 ± 0.1	p = 0.00 ACE + β-блокер/контроли	АРБ/ACE + β-блокер p = 0.48

Съпоставката в плазмените MDA нива разкри значително повишено количеството на продуктите на прекисно окисление в плазмата на пациентите в сравнение с контролната група. Най-ниска липидна пероксидация между болните е установена при монотерапия с ACE инхибитор, като отчетената стойност не се различава статистически с нивото при здрави контроли: Lisinopril 5-10 mg/дн – 2,97 μmol/ml спрямо нормотензивни контроли 2,49 μmol/ml; p = 009.

Значима разлика в нивото на прекисно окисление спрямо здравите нормотензивни контроли показват хипертониците на терапия с ARB и групата с добавен β-блокер: Valsartan 160 mg/дн – 3,47 μmol/ml спрямо нормотензивни контроли 2,49 μmol/ml – p = 0,03; комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 3,13 μmol/ml спрямо нормотензивните контроли 2,49 μmol/ml – p = 0,00.

Не се установи статистически значима разлика между пациентите на различен вид лечение:

– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн – 2,97 μmol/ml спрямо Valsartan 160 mg/дн – 3,47 μmol/ml (**p = 0,18**);

– монотерапия с lisinopril 5-10 mg/дн – 2,97 μmol/ml спрямо комбинирано лечение lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 3,13 μmol/ml (**p = 0,61**);

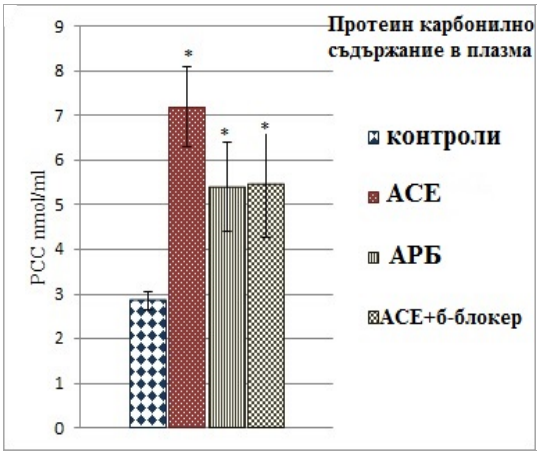
– комбинирано лечение lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 3,13 μmol/ml спрямо Valsartan 160 mg/дн – 3,47 μmol/ml (**p = 0,48**).

1.3.2. Определяне на протеин карбонилно съдържание (PCC)

Протеин-карбонилирането е необратима оксидативна промяна на протеините. Броят на карбонилните групи в протеина корелира с увреждане, причинено от оксидативен стрес (140). Следователно протеин-карбонилирането е важен маркер за окисляване на протеините и измерването им се смята за добър индикатор за степента на окислително увреждане на протеините, свързани с различни болести при човека (141).

От направените от нас изследвания става ясно, че при пациентите с АХ протеин-карбонилното съдържание (PCC) е значително по-високо в сравнение с контролите (фиг. 24).

Определянето на протеин-карбонилното плазмено съдържание се проведе чрез ензимносвързан имуносорбентен анализ, като голямата точност на този метод (nmol/mg) може да обясни наблюдаваната дисперсия на резултатите. Всички групи болни показват значително по-високо плазмено протеин-карбонилно съдържание в сравнение с контролната група здрави индивиди (съответно 7,19 nmol/mg; 5,39 nmol/mg; 5,47 nmol/mg спрямо 2,85 nmol/mg – всяко p > 0,005).



Фиг. 24. Съпоставка между хипертоници, разделени в зависимост от вида на приеманата терапия, и нормотензивни контроли по отношение на протеин-карбонилното съдържание (PCC) в плазмата

Протеин-карбонилно съдържание (PCC) в nmol/mg

Група	Средна стойност ± стандартна грешка	Сравнение с контроли (p-стойност)	Междугрупово сравнение (p-стойност)
Контроли	2,85 ± 0,4		
Lisinopril (ACE)	7,19 ± 0,521	p = 0.000 ACE/контроли	ACE/АРБ p = 0.13
Valsartan (ARB)	5,39 ± 0,65	p = 0.004 АРБ/контроли	ACE/ACE + β-блокер p = 0.12
Комб. терапия Lisinopril + Bisoprolol	5,47 ± 0,51	p = 0.001 ACE + β-блокер/контроли	АРБ/ACE + β-блокер p = 0.9

Не се установи статистически значима разлика между пациентите на различен вид лечение:

– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн – 7,19 nmol/mg спрямо Valsartan 160 mg/дн – 5,39 nmol/mg (**p = 0,13)**;

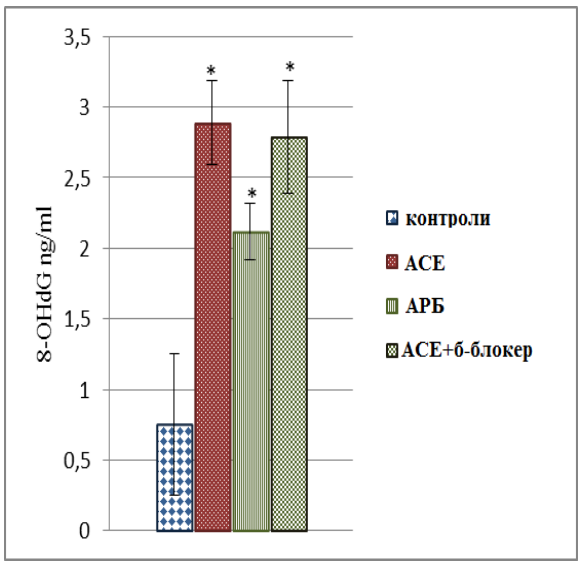
– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн – 7,19 nmol/mg спрямо комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 5,47 nmol/mg (**p = 0,12)**;

– комбинирано лечение Lisinopril 5-10 mg/дн + Bisoprolol 5 mg/дн – 5,47 nmol/mg спрямо Valsartan 160 mg/дн – 5,39 (**p = 0,9**).

1.3.3. Продукти на ДНК увреждане, измерено като количество 8-OHdG

Свободните кислородни радикали (ROS) предизвикват множество лезии в ДНК, причиняващи мутации, делеции и други генетични дефекти. Увреждането на ДНК показва, че и двата компонента - въглехидратният и базите, са податливи на окисление, което води до разграждане на базите и късане на веригата. Вследствие на разграждането на базите се образуват множество продукти, включително 8-hydroxyguanine, хидроксиметил урея, карбамид, тимин гликол, и др. (142).

На фиг. 25 са представени резултатите от ДНК увреждането в проби на пациентите с артериална хипертония и нормотензивни контроли, измерено като количество 8-OHdG ng/mL чрез ELISA метода. Резултатите разкриват значително по-високи плазмени нива при болните с хипертония в сравнение с контролната група.



Фиг. 25. Съпоставка между хипертоници, разделени в зависимост от вида на приемата терапия, и нормотензивни контроли по отношение количественото определяне на 8-OHdG в плазмата

8-OHdG ng/ml

Група	Средна стойност ± стандартна грешка	Сравнение с контроли (p-стойност)	Междугрупово сравнение (p-стойност)
Контроли	0,75 ± 0,04		
Lisinopril(ACE)	2,89 ± 0,1	p = 0.000 ACE/контроли	ACE/АРБ p=0.03
Valsartan(ARB)	2,12 ± 0,4	p = 0.0001 АРБ/контроли	ACE/ACE + β-блокер p = 0.8
Комб. терапия Lisinopril + Bisoprolol	2,79 ± 0,3	p = 0.001 ACE + β-блокер/контроли	АРБ/ACE + β-блокер p = 0.27

Съпоставянето между отделните групи хипертоници на различна антихипертензивна терапия показа статистически значимо по-висока плазмена концентрация на 8-OHdG при пациентите на монотерапия с ACE инхибитор в сравнение с монотерапия с АРБ (2,89 ng/mL спрямо 2,12 ng/mL; p = 0,03).

Не се установи значима разлика между хипертониците на монотерапия с ACE инхибитор и тези на комбинирано лечение (2,89 ng/mL спрямо 2,79 ng/mL; p = 0,8), както и между групата на комбинирана терапия при сравнение с тези на монотерапия с АРБ (2,79 ng/mL спрямо 2,12 ng/mL; p = 0,27).

Обобщение. Установено е повишено радикалообразуване при пациентите с есенциална хипертония и ролята му в патофизиологията на заболяването. Терапевтично предимство при терапията на есенциална хипертония по отношение на „real time" показателите на оксидативен стрес и процеса на липидна пероксидация има приложението на ACE инхибитор пред АРБ. Що се отнася до увреждането на ДНК най-изразен протективен ефект има монотерапията на АХ с АРБ.

2. Изследване на плазмено ниво на протеини от РААС системата и химаза

2.1 Изследване серумни нива на ангиотензин-конвертиращ ензим (ACE)

2.1.1 Демографски данни

Проучванията върху серумните нива на АСЕ обхващат значително по-голяма група – 105 пациенти с артериална хипертония. Демографски данни за включените пациенти с АХ са представени на табл. 19.

Таблица 19. Демографски данни за пациентите с АХ, изследвани за серумните нива на АСЕ

	Общо	**Мъже**	**Жени**
Брой	105	68	37
%	100%	65%	35%
Възраст (год.) – средно аритметично ± s.d.	60.47 ± 13.3	57.66 ± 13.9	65.57 ± 10.4

Представена е значима разлика във възрастта между мъжете и жените (p = 0.003; t-test).

В общата група от хипертензивни пациенти са включени лица на лечение с АСЕ инхибитор (Lisinopril), АРБ (Valsartan) и комбинирана терапия – АСЕ инхибитор (Lisinopril) + бета-блокер (Bisoprolol). Половото и възрастовото разпределение в подгрупите на пациентите с хипертония в зависимост от вида на терапия са представени на табл. 20.

Таблица 20. Демографски данни за пациентите с АХ, изследвани за серумните нива на АСЕ в зависимост от вида на терапията им

	АСЕ инхибитори	**ARB**	**Комбинирана терапия**
Общ брой	64	15	26
Мъже (%)	48 (75%)	10 (67%)	10 (38.5%)
Жени (%)	16 (25%)	5 (33%)	16 (61.5%)
Възраст (год.) Средно аритметично ± s.d.	57.6 ± 13.6	61.3 ± 11.2	67 ± 11.2

По отношение на половото разпределение пациентите на комбинирана терапия преобладаващо са жени, докато при третираните с АСЕ инхибитори и АРБ преобладава мъжкият пол. При сравнение на пациентите на АСЕ инхибитори и на комбинирана терапия се наблюдава значима разлика в половото разпределение (chi-square = 10.773; p = 0.001), както и тенденция за такава при сравнение на пациенти

на АРБ и тези на комбинирана терапия (chi-square = 3.029; p = 0.082). Половото разпределение при подгрупите на терапия с АРБ и с АСЕ инхибитори е сходно (chi-square = 0.432; p = 0.511).

По отношение на възрастта пациентите на АСЕ инхибитори са по-млади в сравнение с другите подгрупи, като статистическа разлика се наблюдава само в сравнение с пациентите на комбинирана терапия (p = 0.002, t-test).

Половото и възрастовото разпределени при хипертониците в зависимост от контрола на болестта е представено на табл. 21.

Таблица 21. Демографски данни за пациентите с АХ, изследвани за серумните нива на АСЕ, (общо 105) в зависимост от контрола на хипертонията

	Контролирана АХ	**Неконтролирана АХ**
Общ брой	65	40
Мъже (%)	42 (64.6%)	26 (65%)
Жени (%)	23 (35.4%)	19 (35%)
Възраст (год.) Средно аритметично ± s.d.	58.5 ± 13.5	63.7 ± 12.5

По отношение на половото разпределение, не се наблюдава разлика между пациентите с контролирана и неконтролирана хипертония (chi-square =0.002; p = 0.968). Що се отнася до възрастта, пациентите с контролирана хипертония са по-млади в сравнение с тези с неконтролирано заболяване, но с гранична достоверност (p = 0.057, t-test).

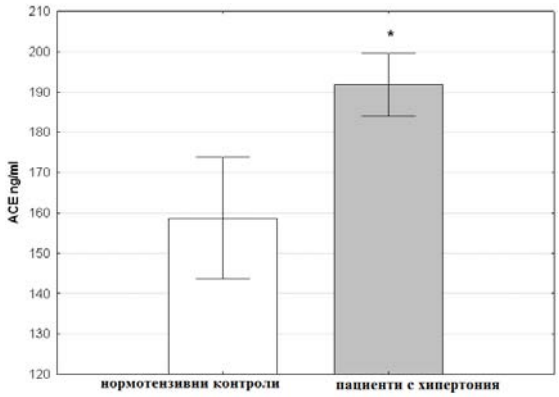
2.1.2 Серумна концентрация на ангиотензин-конвертиращият ензим

Ангиотензин-конвертиращият ензим (АСЕ) е ключов компонент на ренин-ангиотензиновата система, отговорен за превръщането на неактивния ангиотензин I до вазоактивния ангиотензин II. В разглежданата група от 105 пациенти с есенциална артериална хипертония, отговарящи на посочените критерии, чрез ELISA са отчетени и серумните нива на АСЕ. Установи се по-високо серумно ниво (*концентрация*) на АСЕ в общата група с хипертония (191.8 ± 79 ng/ml) в сравнение със здравите контроли (158.8 ± 47.9 ng/ml; p = 0.047) (фиг. 26).

В зависимост от контрола на хипертонията се констатира по-високо серумно ниво на АСЕ при пациентите с добър хипертензивен контрол в сравнение с тези с неконтролирана хипертония (212.4 ± 87 ng/ml срещу 191 ± 77 ng/ml), като разликата не е статистически значима (p = 0.166) (фиг. 27).

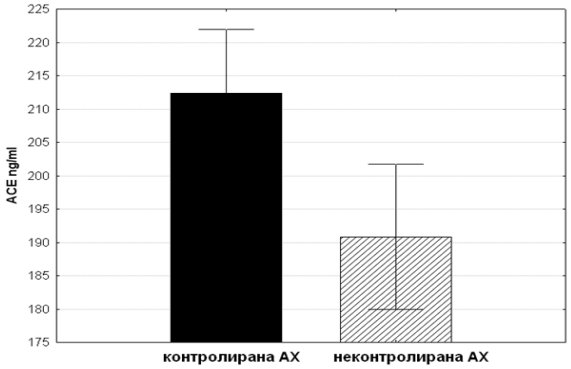
При анализ на серумните нива на АСЕ в зависимост от вида на терапията при хипертензивни пациенти (фиг. 28) установихме най-високи серумни нива на АСЕ при пациенти на монотерапия с АСЕ инхибитори (208.3 ± 83ng / ml), след-

вани от групата на комбинирана терапия (177.9 ± 72ng / ml) и най-ниски при пациентите на терапия с АРБ (145.8 ± 45ng / ml). При пациенти на монотерапия с АСЕ инхибитор ензимните нива бяха значимо по-високи както в сравнение с контролната група (p=0.029) както в сравнение с пациентите на терапия с АРБ (p=0.0064)



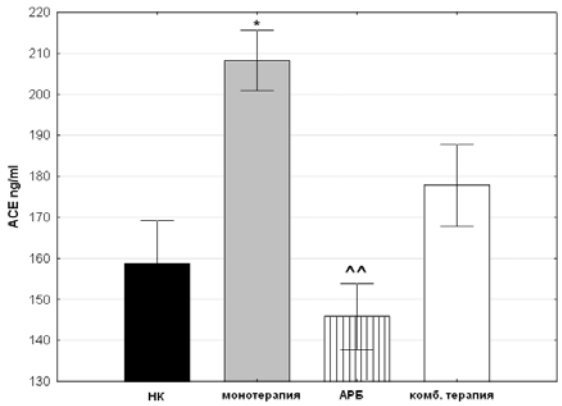
*p < 0.05 в сравнение с контроли

Фиг. 26. Съпоставяне серумното ниво на АСЕ между нормотензивни контроли (НК) и пациента с диагностицирана АХ. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка



(212.4 ± 87 ng/ml срещу 191 ± 77 ng/ml; p = 0.166)

Фиг. 27. Съпоставяне серумното ниво на АСЕ между пациента с диагностицирана АХ в зависимост от контрола на хипертонията. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка.

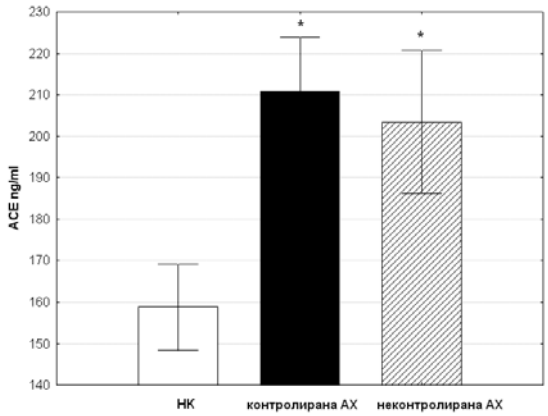


*p < 0.05 в сравнение с контроли; ^^p < 0.01 в сравнение с монотерапия с АСЕ инхибитори

Фиг. 28. Серумни нива на АСЕ между нормотензивни контроли (НК) и пациента с диагностицирана АХ на монотерапия с АСЕ инхибитори (n = 64), АРБ (n = 15) и комбинирана терапия (n = 26). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка

Предвид получените резултати са анализирани серумните нива на АСЕ само в групата пациенти на монотерапия с АСЕ инхибитори (n = 64), разделени в зависимост от контрола на хипертонията (фиг. 29), като не се установиха значими разлики между лицата с добър и с лош контрол на хипертонията (p = 0.74).

Подобно сравнение се извърши и в подгрупите на комбинирана терапия и на АРБ въпреки сравнително малки брой пациенти в тях, но не са установени значими различия.



*p < 0.05 в сравнение с контролите

Фиг. 29. Серумни нива на ACE между нормотензивни контроли (НК) и пациента с диагностицирана АХ на монотерапия с ACE инхибитори (n = 64), разделени подгрупи с контролирана (n = 42) и с неконтролирана АХ (n = 22). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка

С цел да установим кой от двата ензима, източници на вазоактивния ангиотензин 2, има потенциал да се използва като серумен маркер за контрол на хипертонията, възприехме стойности 254.58 ng/ml за серумна концентрация на ACE и 37.86 pg/ml за химаза (средно ± 2 * SD на контролната група) като прагови нива, според които пациентите са разделени на болни с ниски и високи нива на ACE и химаза (табл. 22). При това едва 3-ма (27%) от групата с неконтролирана хипертония са с високи серумни нива на ACE, докато високи нива химаза се откриват при 9 (82%) от тях. При пациентите с добър контрол на АН 11 (58%) са с високи нива на ACE и 8 (42%) – с високи нива на химаза.

Таблица 22. Логистичен регресионен анализ на АХ пациенти в зависимост от хипертензивния контрол и референтни стойности на химаза и ACE.

	Хипертоници с лош контрол на АН	Хипертоници с добър контрол на АН	OR (95%CI)	p-value
Високи нива на ACE(над 254 ng/ml)	3 (27%)	11(58%)	0,273 (0,039-1,714)	0,105
Ниски нива на ACE (под 254 ng/ml)	8 (73%)	8 (42%)		
Високи нива на химаза (над 37,86 pg/ml)	**9 (82%)**	8 (42%)	**6,188 (0,839-56,629)**	**0,034**
Ниски нива на химаза (под 37,86 pg/ml)	2 (18%)	11(58%)		

Използването на високи серумни нива на ACE като диагностичен тест за контрол на АХ при зададените прагови стойности показва ниска чувствителност 27.3% с доверителен интервал 95% CI: 8.1% ÷ 55% и ниска специфичност 42.1%; 95% CI: 31% ÷ 58.2%.

Приложението на високи серумни нива на химаза като диагностичен тест за контрол на хипертонията при зададените прагови стойности показва висока чувствителност 81.8% с доверителен интервал 95% CI: 53.9% ÷ 96.6%, но сравнително ниска специфичност 57.9%; 95% CI: 41.7% ÷ 66.5%. Високите серумни нива на химаза се асоциират с над 6 пъти по-висок риск за лош контрол на хи-

пертонията при терапия с ACE инхибитор – Lisinopril (OR = 6.188; 95% CI: 0.839 ÷ 56.629; p = 0.034)

В обобщение. Серумните нива на ангиотензин-конвертиращия ензим при хипертоници на лечение с ACE инхибитор са по-високи в сравнение с нормотензивните контроли, без разлика между групите с добър и лош контрол на АН. Вероятно химазата участва в патогенезата на неконтролираната хипертония при третираните с ACE инхибитор.

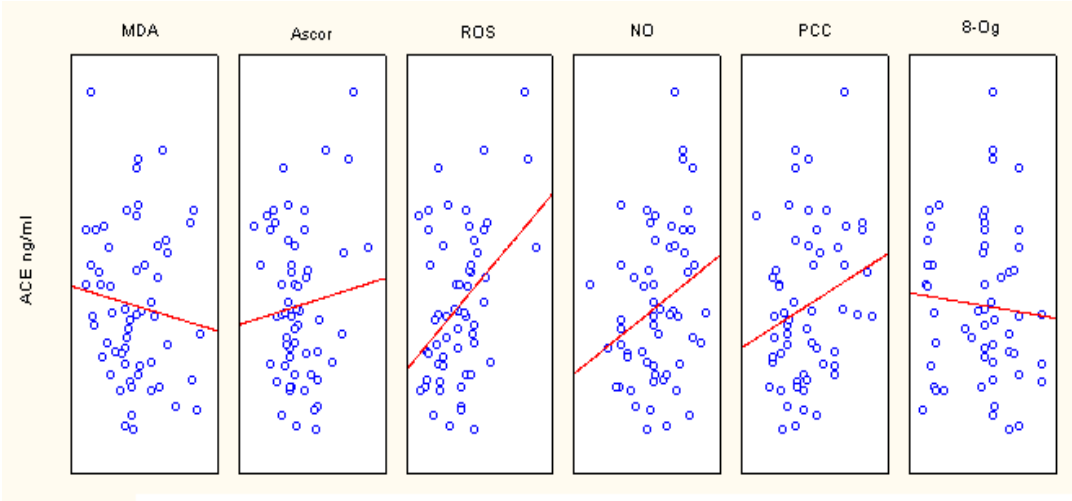
Връзка между серумната концентрация на ACE и оксидативен стрес. При 60 пациенти от изследваните 105 за серумна концентрация на ACE, са определени и показатели на оксидативния стрес. С цел да се установи наличието или липсата на връзка между серумните нива на ACE и изследваните показатели на оксидативния стрес е проведен корелационен анализ, представен на табл. 23.

Таблица 23. Корелационен анализ между серумни нива на ACE и показатели на оксидативен стрес при хипертензивни пациенти

Спирман корелационен анализ			
	N	R-	p-стойност
ACE ng/ml & MDA	60	-0.091515	0.494469
ACE ng/ml & Ascor	60	-0.089764	0.502797
ACE ng/ml & ROS	60	0.303293	0.020649
ACE ng/ml & NO	60	0.302427	0.021033
ACE ng/ml & PCC	60	*0.232746*	*0.078716*
ACE ng/ml & 8-Og	60	-0.135048	0.312137

Наблюдава се слаба позитивна корелация между серумните нива на ACE с ROS и NO

Установена е статистически значима слаба позитивна корелация между нивата на ROS и NO с серумните нива на ACE. Подобна тенденция се констатира също и за PCC, който е важен маркер за окисляване на протеините, основно под действието на ROS и/или NO.



Фиг. 30. Корелационен анализ на връзката между серумната концентрация на ACE и оксидативния стрес

След разделяне на пациентите с АХ в две подгрупи в зависимост от контрола на заболяването е установено, че наблюдаваните зависимости се дължат основно на пациентите с добър контрол на хипертонията (n = 39). Тенденция за позитивна, макар и слаба зависимост между серумния ACE и ROS; NO и PCC се установи само при пациентите с контролирана АХ (съответно R = 0.315 с p = 0.05; R = 0.292 с p = 0.07 и R = 0.29 с p = 0.07), за разлика от пациентите с неконтролирана хипертония.

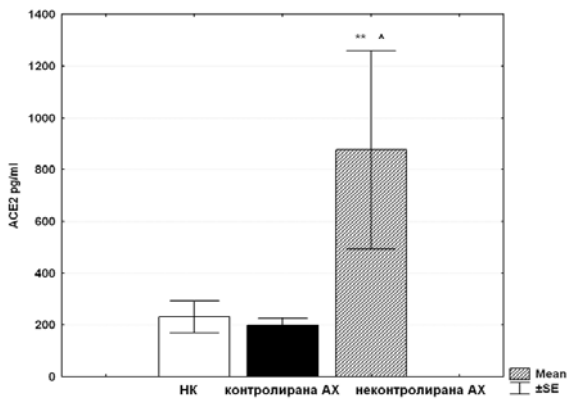
2.2. Серумните нива на ACE2

Серумните нива на ACE2 са определени в група от 71 пациенти с АХ, от които 14 са на терапия с АРБ и 57 пациента – на монотерапия с ACE инхибитори, както и при 20 нормотензивни контроли.

Установено е значимо повишение на серумния ACE2 при пациентите с АХ в сравнение с контролите (456.8 ± 150 спрямо 231.1 ± 61.6 pg/ml; p = 0.013).

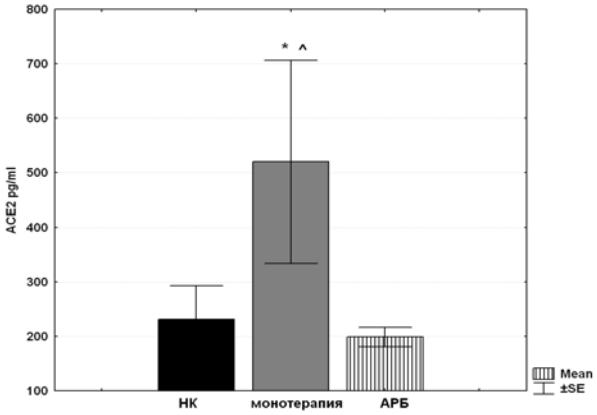
В зависимост от контрола на хипертонията (фиг. 31) се констатира значимо повишение на ACE2 при болните с лош хипертензивен контрол в сравнение с лицата с контролирана хипертония (876.15 ± 383pg/ml спрямо 199.5 ± 25.8 pg/ml; p = 0.027) и с нормотензивните контроли (p = 0.008).

При анализ на серумните нива на ACE2 в зависимост от вида на терапията при хипертензивни пациенти (фиг. 32) се установяват значимо по-високи серумни нива на ACE2 при пациентите на монотерапия с ACE инхибитори (520.2 ± 186.2 pg/ml) както в сравнение с контролната група (231.1 ± 61.6 pg/ml; p = 0.029), така и спрямо пациентите на терапия с АРБ (198.9 ± 18 pg/ml; p = 0.05).



**p < 0.01 в сравнение с контроли;
^p < 0.01 в сравнение с лица с контролирана АХ

Фиг. 31. Серумни нива на ACE2 при нормотензивни контроли (НК) и пациента с контролирана АХ (n = 44) и с неконтролирана АХ (n = 27). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка



*p < 0.05 в сравнение с контроли;
^p < 0.01 в сравнение с АРБ

Фиг. 32. Серумни нива на ACE2 при нормотензивни контроли (НК) и пациенти с диагностицирана АХ на монотерапия с АСЕ инхибитори (n = 57) и АРБ (n = 14). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка

Взимайки под внимание както вида така и ефективността на антихипертензивната терапия, се констатира, че значимото повишение на серумния ACE2 при пациентите с лош контрол на хипертонията се наблюдава само при представителите на монотерапия с АСЕ инхибитори. При лицата на терапия с АРБ с неефективен или с добър контрол на АХ серумните нива на ACE2 са сходни (табл. 24).

Таблица 24. Серумни нива на ACE2 в зависимост от вида и ефективността на антихипертензивната терапия

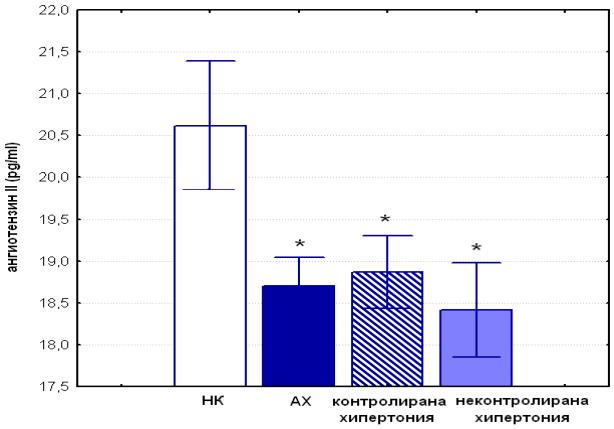
група	Lisinopril (ACEi)		Valsartan(ARB)	
	Контролирана АХ	Неконтролирана АХ	Контролирана АХ	Неконтролирана АХ
Брой (n)	36	21	8	6
Средна стойност ± стандартна грешка (pg/ml)	199.3 ± 31	**1070.4 ± 486**	200.7 ± 24	196.4 ± 29
P-стойност	**0.004585**		0.994179	

В обобщение. Установихме значимо повишени серумни нива на ACE2 при АХ пациенти с лош контрол на АХ при монотерапия с АСЕ инхибитор.

2.3. Изследване серумните нива на ангиотензин 2

На групата от 30 пациенти с диагностицирана АХ лекувани с Lisinopril (използвана в т. 2.1), бе отчетено и серумно ниво на ангиотензин II чрез ELISA метод.

Серумните нива на ангиотензин II са значително по-ниски при пациентите, отколкото при здравите контроли (18.7 ± 1,86 pg/ml срещу 20.6 ± 2,44 pg/ml; p = 0.013). Освен това, няма статистически значима разлика в серумните нива между групата с добър контрол на кръвното налягане спрямо тази с недостигнати таргетни стойности на кръвното налягане (18.87 ± 1.89 pg/ml срещу 18.4 ± 1,86 pg/ml; p = 0.53). Серумните нива на ангиотензин II и при двете подгрупи от пациенти в зависимост от контрола на хипертонията са значително по-ниски от тези, установени при контролната група (съответно p = 0.042 и p = 0.031).



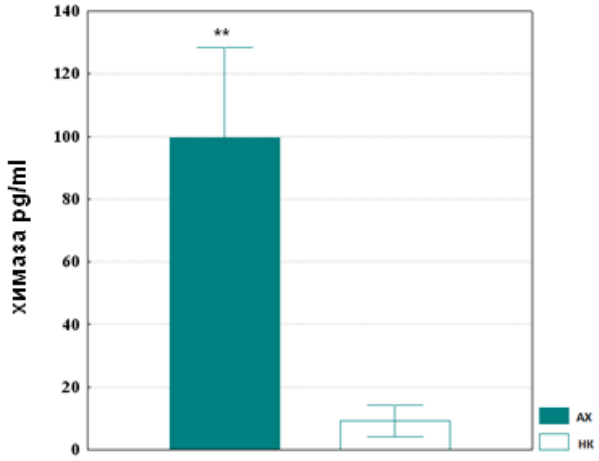
Фиг. 33. Съпоставяне на серумното ниво на ангиотензин II между 10 нормотензивни контроли (НК) и 30 лица с диагностицирана АХ, лекувани с Lisinopril, подразделени на подгрупа с добър и с лош контрол на АХ. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка

*p < 0.05 в сравнение с контроли

При търсенето на зависимост се наблюдава силна положителна връзка между концентрацията в серума на химаза и ангиотензин II при пациентите с неконтролирана хипертония (R = 0.6518; p = 0.03), за разлика от групата с добър контрол на кръвното налягане (R = 0,1113; p = 0.65). Силната положителна корелация между нивата на химаза и ангиотензин II при пациенти с лош хипертензивен контрол предполага ролята на химазата в образуването на Ang II, в случай на резистентност към ACE инхибиторно лечение. Настоящият анализ се основава на изследвания на малка група пациенти (11 са лицата с лош медикаментозен хипертензивен контрол), което е важен лимитиращ фактор и трябва да се има предвид при интерпретирането на резултатите.

2.4. Определяне на серумните нива на химаза

Серумните нива на химаза са определени при 30 пациенти и 20 здрави контроли. Болните са с диагностицирана АХ на монотерапия с ACE инхибитор (lisinopril) и едва 63,3% са с добър контрол на артериалното налягане.



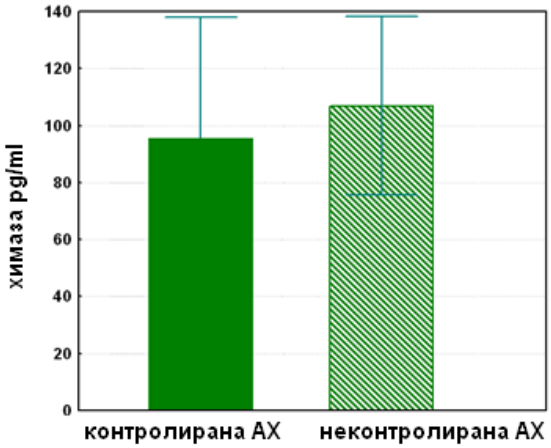
** p < 0.01 в сравнение с контроли

Фиг. 34. Серумни нива на химаза при пациенти с артериална хипертония (АХ) и нормотензивни контроли (НК). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка

Нашето изследване показа значително повишени нива на серумна химаза при пациентите в сравнение със здравите контроли (99.6 ± 159 спрямо 9.34 ± 10 pg/ml; p = 0.0076).

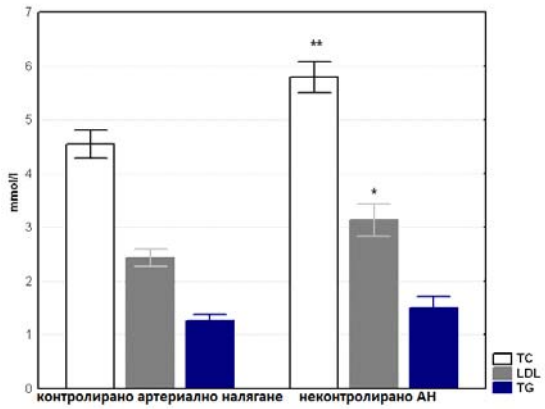
Като прагово ниво, според което пациентите са разделени на болни с ниски и лица с високи нива на химаза, възприехме стойност за химаза 37.86 pg/ml (средно ± 2 * SD на контролната група). При 17 (57%) от пациентите са установени нива над 37.86 pg/ml, съответно при 13 (43%) от пациентите серумните нива са под 37.86 pg/ml.

Разликата в серумните нива на химазата между хипертониците с добър и с лош контрол на АХ е малка и незначима (95 ± 186 спрямо 107 ± 104 pg/ml; p = 0.85) – фиг. 35.



Фиг. 35. Съпоставяне серумните нива на химазата между групи хипертоници на терапия с АСЕ инхибитор, с добър и лош контрол на АХ. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка

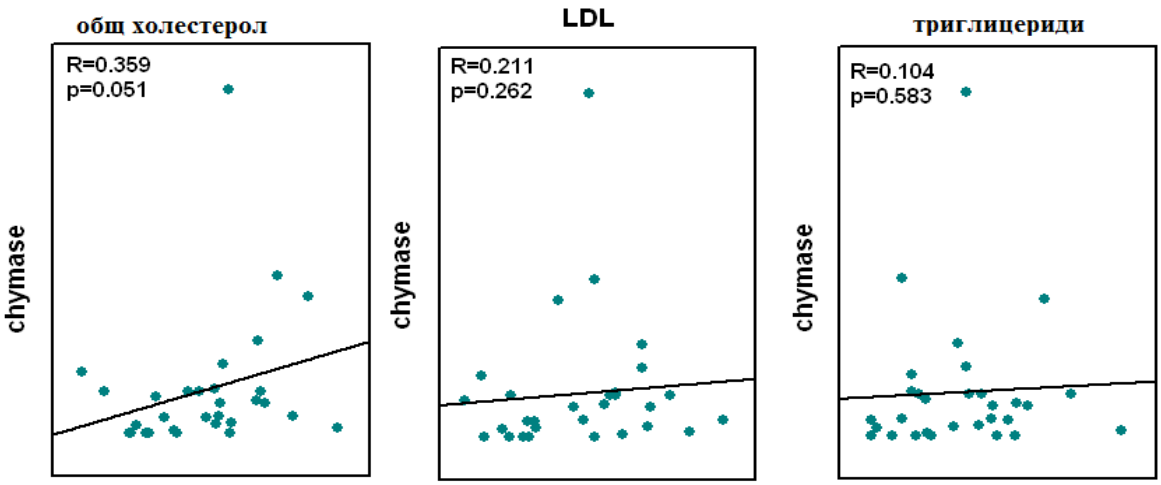
При изследване на липидния профил на разглежданата група се установи повишено ниво на общия и LDL холестерол при пациентите с неконтролирана хипертония в сравнение с тези с контролирано АН (5.8 ± 0.96 спрямо 4.5 ± 1.1 mmol/l; p = 0.004; и съответно 3.14 ± 0.99 спрямо 2.4 ± 0.69 mmol/l; p = 0.03) (фиг. 36).



TC – total cholesterol TG – triglycerides *p < 0.05; **p < 0.01

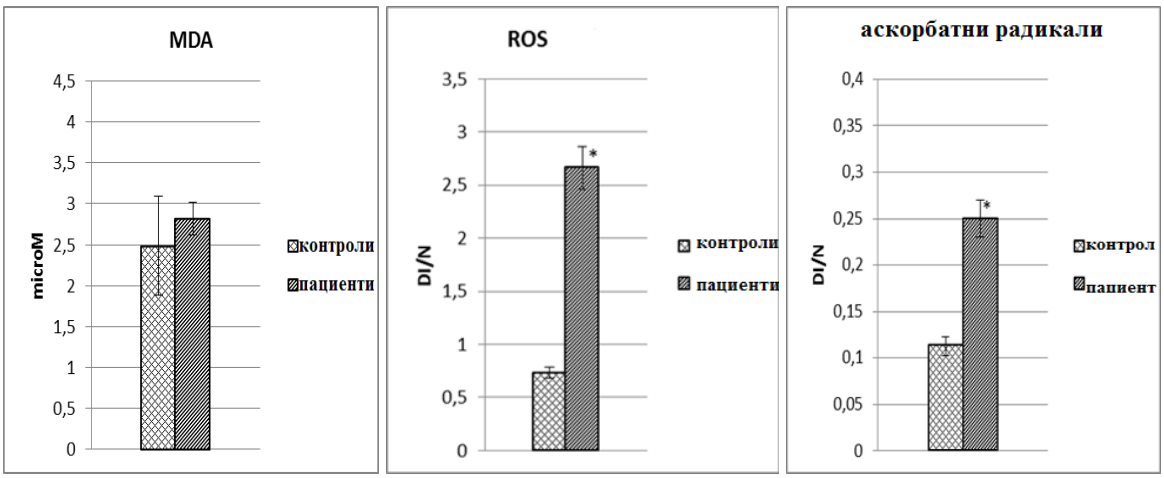
Фиг. 36. Сравниние на липидния профил между групи хипертоници на терапия с ACE инхибитор, с добър и лош контрол на АН

Анализирана е и взаимовръзката между серумните нива на химаза и показателите на липидния профил при хипертензивни пациенти (общия и LDL холестерол, както и нивата на триглицеридите). Получените резултати са представени на фиг. 37. Наблюдава се слаба положителна корелация между серумните нива на химаза и общия холестерол (R = 0,359; p = 0.051) при болните. Не са установени значими зависимости между серумните нива на химаза и на LDL холестерол, както и с нивата на триглицеридите.

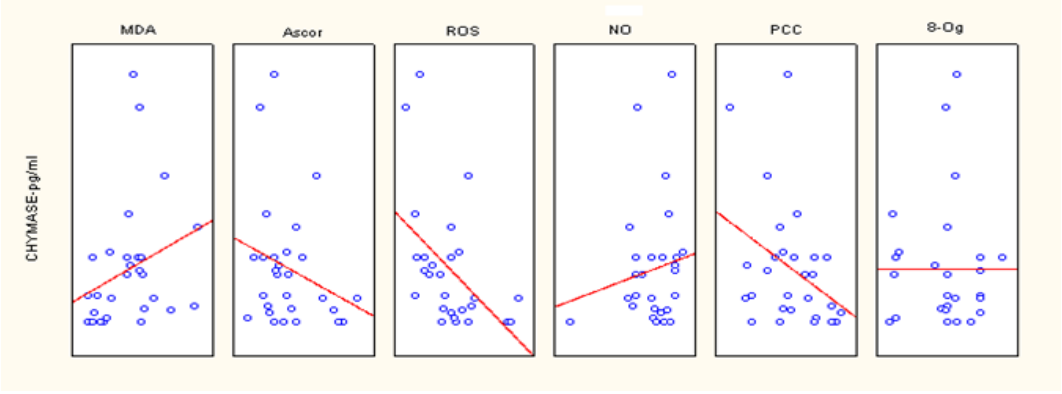


Фиг. 37. Корелационен анализ между нивата на химаза и общ, LDL холестерол и триглицериди при хипертензивните пациенти

Както вече упоменахме в „Материал и методи“, анализираната група от 30 пациенти с АХ е част от изследваната група в точка 1. „Показатели на оксидативния стрес и антиоксидантния статус при пациенти с АХ“. Наблюдава се значително по-високо радикалообразуване при пациентите в сравнение с контролите (фиг. 38А). При съпоставяне серумните нива на химаза и нивото на оксидативен стрес се установи умерена негативна корелация между серумните нива на химаза и ROS.



Фиг. 38А. Съпоставка на оксидативния статус между 30-те хипертоници и 20-те контроли



Фиг. 38Б. Корелационен анализ между серумните нива на химаза и нивото на оксидативен стрес в разглежданата група

Таблица 25. Корелационен анализ между серумни нива на химаза и показатели на оксидативен стрес при хипертензивни пациенти на терапия с ACE инхибитори

Спирман корелационен анализ			
	N	R-коефициент	p-стойност
Химаза - pg/ml & **MDA**	30	0.332970	0.083384
Химаза - pg/ml & **Ascor**	30	-0.280690	0.147945
Химаза - pg/ml & **ROS**	30	-0.574576	0.001385
Химаза - pg/ml & **NO**	30	0.171273	0.383515
Химаза - pg/ml & **PCC**	30	-0.361202	0.058961
Химаза - pg/ml & **8-OHdG**	30	-0.006226	0.974917

При съпоставка на резултатите между пациентите с неконтролирана хипертония и пациентите с контролирано кръвно налягане (табл. 26) стана ясно, че посочената негативна корелация се наблюдава само при хипертониците с добър контрол на артериалното налягане. При тези пациенти се наблюдава и умерена позитивна корелация в нивата на химазата и MDA. Подобна зависи-

мост е слабо изразена при пациентите с лош медикаментозен контрол на кръвното налягане .

Таблица 26. Корелационен анализ между серумни нива на химаза и показатели на оксидативен стрес при хипертониците на терапия с ACE инхибитори в зависимост от контрола на АН

Контролирани стойности на артериалното налягане- Сперман корелационен анализ			
	N	R коефициент	p-стойност
химаза -pg/ml & MDA	19	0.495080	0.043323
химаза -pg/ml & Ascor	19	-0.276150	0.283312
химаза -pg/ml & ROS	19	-0.514983	0.034394
химаза -pg/ml & NO	19	-0.218930	0.398543
химаза -pg/ml & PCC	19	-0.413235	0.099211
химаза -pg/ml & 8-OHdG	19	0.187858	0.470276

Неконтролирани стойности на артериалното налягане- Сперман корелационен анализ			
	N	R-коефициент	p-стойност
химаза -pg/ml & MDA	11	0.351602	0.288993
химаза -pg/ml & Ascor	11	-0.123289	0.717990
химаза -pg/ml & ROS	11	-0.360734	0.275768
химаза -pg/ml & NO	11	0.502288	0.115371
химаза -pg/ml & PCC	11	0.013699	0.968113
химаза -pg/ml & 8-OHdG	11	-0.351725	0.288813

Връзка между серумната концентрация на РАС протеини. Корелационният анализ между серумните нива на ензима ACE с неговия продукт и алтернативния му ензим химаза при хипертониците на терапия с ACE инхибитори, в зависимост от контрола на АН, е представен на табл. 27.

Таблица 27

	АХ пациенти		Контролирана АХ		Неконтролирана АХ	
	Корелационен коефициент	p-стойност	Корелационен коефициент	p-стойност	Корелационен коефициент	p-стойност
ACE – Анг2	-0.0746	0.695	0.0892	0.594	-0.4514	0.035
ACE-химаза	-0.0478	0.802	-0.0332	0.842	-0.0667	0.768

В обобщение. При пациентите с неконтролирана хипертония се установи значима обратна корелация между серумната концентрация на ACE с нивата на ангиотензин II (R = -0.4514; p = 0.035) за разлика от групата хипертоници с добър контрол на АН.

3. Честоти на ACE I/D полиморфизма при пациенти и контроли

3.1. Демографска структура

В проучванията ни за генотипното разпределение и алелната честота на функционалния полиморфизъм в ACE гена, който се дължи на инсерция/деле-

ция (I/D) е включена представителна група от 140 пациенти с АХ, съгласно вече описаните критерии, чийто демографски данни са представени на табл. 28.

Таблица 28. Демографски данни за АХ-пациенти изследвани за полиморфизма в ACE

	Общо	**Мъже**	**Жени**
Брой	140	82	58
%	100%	59%	41%
Възраст (год.) Средно аритметично ± s.d.	61.32 ± 13.3	58.52 ± 14	65.12 ± 11.1

Наблюдава се значима разлика във възрастта между мъжете и жените (p = 0.003; t-test), като възрастта на пациентите от мъжки пол е значимо по-ниска в сравнение с тази на жените.

В тази група са включени пациенти на различен вид терапия – монотерапия с ACE инхибитори (58%) или с ARB (13.5%), или комбинирана терапия (28.5%), за да се оцени влиянието на даден генотип върху терапевтичния отговор. Половото и възрастовото разпределение на пациентите в трите подгрупи в зависимост от вида терапия на АХ са представени на табл. 29.

Таблица 29. Демографски данни за пациенти с АХ, изследвани за полиморфизъм в ACE (общо 140) в зависимост от вида на терапията им

	ACE инхибитори	**ARB**	**Комбинирана терапия**
Общ брой	81	19	40
Мъже (%)	53 (65%)	13 (68%)	16 (40%)
Жени (%)	28 (35%)	6 (32%)	24 (60%)
Възраст (год.) Средно аритметично ± s.d.	58.7 ± 14	62.4 ± 11.2	66.2 ± 11

По отношение на разпределението по пол при пациентите на комбинирана терапия женски пол е преобладаващ, за разлика от подгрупите на монотерапия с ACE инхибитори или с ARB. Наблюдавана е статистически значима разлика както в сравнение с пациенти на ACE инхибитори (chi-square = 7.067; p = 0.008), така и при сравнение с пациенти на ARB (chi-square = 4.163; p = 0.041). Съотношението по пол между групата на пациенти на ARB и ACE инхибитори е сходно (chi-square =0.061; p=0.804), с преобладаване на мъжкия пол.

По отношение на възрастта пациентите на ACE инхибитори са по-млади в сравнение с другите изследвани подгрупи, като статистическа разлика се наблюдава само при сравнение с пациентите на комбинирана терапия (p = 0.004, t-test). Тази зависимост отчасти може да се обясни с необходимостта от прила-

гане на комбинирана терапия при пациенти с по-високи изходни стойности на АН, напреднала възраст и/или захарен диабет. При целенасочено запитване към специалиста назначил комбинирана терапия, мотивът за включване на втори антихипертензивен медикамент е именно АХ II степен.

В зависимост от отговора на пациентите към проведеното лечение, общата група от 140 пациенти се подразделят на лица с добър терапевтичен отговор и съответно добър контрол на хипертонията (61%) и с лош терапевтичен отговор, респективно – с неконтролирана АХ (39%). Съответните демографски данни са представени на табл. 30.

Таблица 30. Демографски данни за пациенти с АХ, изследвани за полиморфизма в ACE (общо 140) в зависимост от контрола на хипертонията

	Контролирана АХ	**Неконтролирана АХ**
Общ брой	86	54
Мъже (%)	47 (55%)	35 (65%)
Жени (%)	39 (45%)	19 (35%)
Възраст (год.) Средно аритметично ± s.d.	59.1 ± 13.5	64.9 ± 12.2

По отношение на половото разпределение не се наблюдава разлика между пациентите с контролирана и неконтролирана АХ (chi-square = 1.412; p = 0.235).

По отношение на възрастта обаче се установи, че при по-младите пациенти се постига по-добър контрол на хипертонията в сравнение с по-възрастните. Констатирана е значима разлика във възрастта между пациентите с контролирана и с неконтролирана АХ (p = 0.013, t-test).

3.2. Генотипно разпределение на ACE полиморфизма при пациенти и контроли

Генотипизиране по ACE полиморфизма е осъществено при общо 140 пациенти чрез PCR-базиран метод, описан в глава „материали и методи“. Наблюдаваното генотипното разпределение на ACE полиморфизма при пациентите (χ^2 = 1.922; df = 2; p = 0.383) и при контролите (χ^2 = 1.5; df = 2; p = 0.472) е в съответствие с очакваното, съгласно закона на Харди-Вайберг. На табл. 31 са представени получените резултати при изследваната група пациенти.

Таблица 31. Генотипно разпределение на ACE полиморфизма при пациенти (АХ) и нормотензивни контроли (НК)

	НК (n = 11)	АХ (n = 140)	Мъже АХ n = 82)	Жени АХ (n = 58)	Контроли-рана АХ (n = 86)	Неконтролира-на АХ (n = 54)
Генотипи						
DD	4 (36.4%)	51 (36.4%)	32 (39%)	19 (33%)	36 (42%)	15 (28%)
ID	4 (36.4%)	60 (42.9%)	34 (41.5%)	26 (45%)	33 (38%)	27 (50%)
II	3 (27.3%)	29 (20.7%)	16 (19.5%)	13 (22%)	17 (20%)	12 (22%)
Алели						
D	12 (54.5%)	162 (58%)	98 (60%)	64 (55%)	105 (61%)	57 (53%)
I	10 (45.5%)	118 (42%)	66 (40%)	52 (45%)	67 (39%)	51 (47%)

Генотипното разпределение на ACE полиморфизма е сходно при изследваните пациенти и здравите лица (χ^2 = 0.308; df = 2; p = 0.857), както и алелните честоти (χ^2 = 0.092; df = 1; p = 0.762). Предвид малката група нормотензивни контроли, последващите анализи са фокусирани върху подгрупите пациенти, разделени в зависимост от пола и контрола на АХ.

Не се установи значима разлика в генотипната или алелната честота на изследвания полиморфизъм сред мъжете и жените с АХ (p > 0.5). Може да се отбележи обаче, че се наблюдава незначимо по-висока честота на D-алела (OR = 1.206; 95% CI: 0.725-2.009; p = 0.444) и хомозиготния DD-генотип (OR = 1.314; 95% CI: 0.612-2.829; p = 0.448) при мъжете с АХ в сравнение с жените.

При пациентите с неконтролирана хипертония е налице тенденция за по-висока честота на генотипи, съдържащи I-алел (II + ID), докато DD-генотипът е с по-висока честота при пациентите с контролирана АХ (OR = 1.872; 95% CI: 0.847-4.170; p = 0.092), макар без да достига статистическа значимост. Респективно честота на алел-I е по-висока при пациенти с неконтролирана АХ в сравнение с тази при контролираната АХ (OR = 1.402; 95% CI: 0.837-2.349; p = 0.173).

Предвид наблюдаваните тенденции за различно генотипно разпределение на I/D ACE полиморфизма сред пациенти с АХ в зависимост от контрол на хипертонията, се извърши подробен анализ сред мъжете и жените, с цел да оценим влиянието на носителството на даден генотип ACE полиморфизъм върху контрола на хипертонията като рисков и/или протективен фактор. Получените резултати са представени на табл. 32.

Носителството на генотип, съдържащ I-алел (II+ID), се асоциира с лош контрол на хипертонията – с близо 2 пъти по-висок риск от неконтролирана АХ както при мъжете, така и при жените, но без да достига до статистическа значимост. Тази тенденция е по-ясно изразена при жените с хетерозиготен генотип-ID (58% спрямо

38.5%), докато при мъжете хомозиготния II-генотип (23% спрямо 17%) и хетерозиготния ID-генотип (46% спрямо 38%) са с по-висока честота при пациентите с неконтролирана АХ.

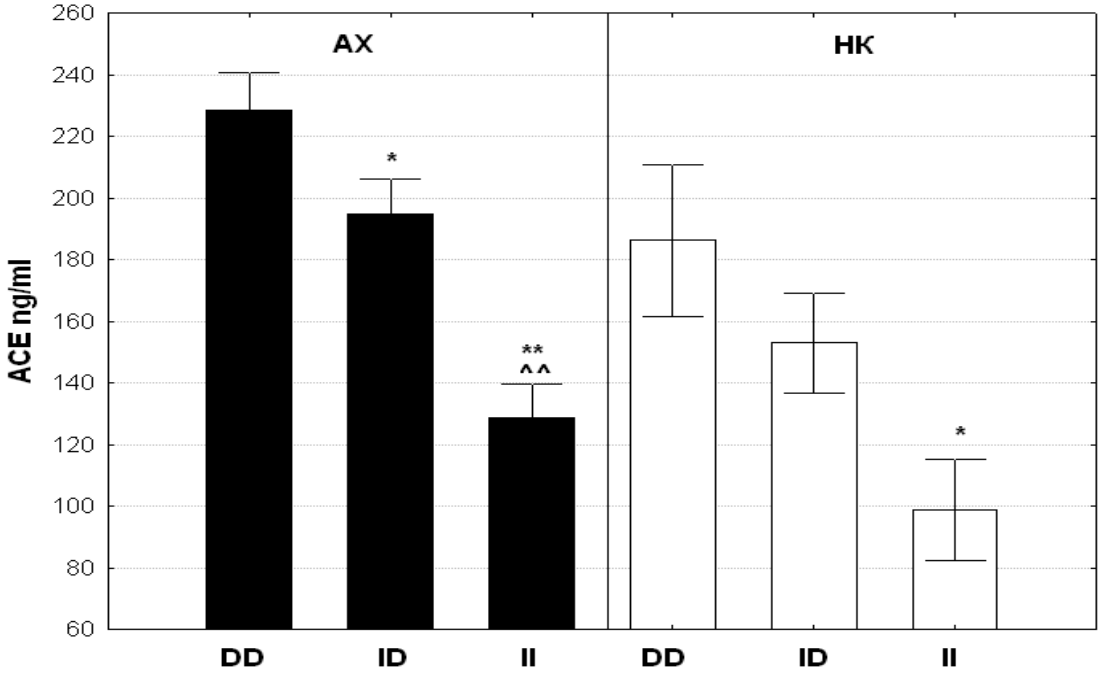
Таблица 32. Генотипни и алелни честоти на ACE полиморфизма при мъже и жени с контролирана и неконтролирана артериална хипертония (АХ)

	Контролирана АХ (n = 47)	Неконтролирана АХ (n = 35)	OR (95% CI); p-value	Контролирана АХ (n = 39)	Неконтролирана АХ (n = 19)	OR (95% CI); p-value
	Мъже			Жени		
Генотипи						
DD	21 (45%)	11 (31%)	ref	15 (38.5%)	4 (21%)	ref
DI	18 (38%)	16 (46%)	1.697 (0.562-5.176) p = 0.295	15 (38.5%)	11 (58%)	2.750 (0.605-13.290) p= 0.135
II	8 (17%)	8 (23%)	1.909 (0.478-7.750); p = 0.297	9 (23%)	4 (21%)	1.667 (0.256-11.087); p=0.533
II+ID vs DD	26 (55%)	24 (69%)	1.762 (0.642-4.891) p = 0.224	24 (61.5%)	15 (79%)	2.344 (0.569-10.315) p=0.185
DD + ID спрямо II	39 (87%)	27 (77%)	0.692 (0.203-2.354) p = 0.510	30 (77%)	15 (79%)	1.125 (0.254-5.242) p = 0.862
Алели						
D	60 (64%)	38 (54%)	Ref	45 (58%)	19 (50%)	Ref
I	34 (36%)	32 (46%)	1.486 (0.753-2.935); p = 0.218	33 (42%)	19 (50%)	1.364 (0.583-3.196); p = 0.434

Генотипните честоти на ACE полиморфизма между мъжете и жените с контролирана (χ^2 = 0.592; df = 2; p = 0.744) и с неконтролирана АХ (χ^2 = 0.681; df = 2; p = 0.65) са сходни.

3.3. Ефект на I/D ACE полиморфизма върху фенотипа при пациентите с АХ и при нормотензивните контроли

Предвид функционалния ефект на ACE полиморфизма върху количеството синтезиран ензим, бяха проведени асоциативни проучвания на серумните нива на ензима в зависимост от генотипа на хипертензивни пациенти и нормотензивни контроли (фигура 39)

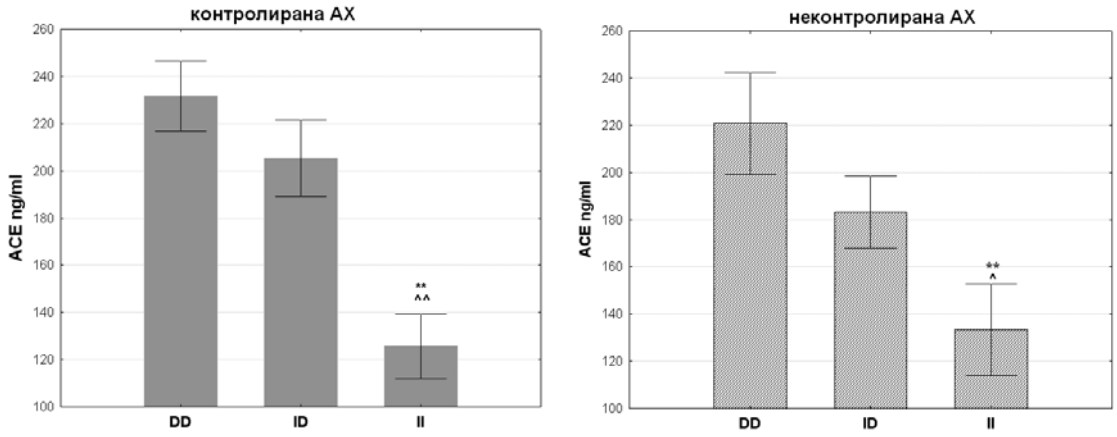


*p < 0.05; **p < 0.01 в сравнение с DD-генотип; ^^p < 0.01 в сравнение с ID-генотип

Фиг. 39. Серумни нива на ACE в зависимост от генотипа по ACE I/D полиморфизма при пациенти с АХ и нормотензивни контроли (НК). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка

При пациенти с АХ генотип-DD се асоциира с най-високи серумни нива на АСЕ ензима, следвани от тези при генотип-ID, а най-ниски са при II-генотип. Установи се по-високо серумно ниво (*концентрация*) на АСЕ при пациенти с АХ, хомозиготи по делецията в АСЕ гена (228.4 ± 76.5 ng /ml) в сравнение с хетерозиготните пациенти (194.8 ± 70.7 ng/ml; p = 0.044) и с пациентите хомозиготи по инсерцията (128.5 ± 55.2 ng/ml; p < 0.0001). При пациенти с АХ с генотип-II серумните нива на ензима са значимо по-ниски и от тези при хетерозиготите (p = 0.0002). При нормотензивните контроли се наблюдава същата зависимост генотип/серумно ниво на АСЕ, но поради малкия им брой е установена статистически значима разлика само при сравнение на най-високо продуциращия генотип-DD с най-ниско продуциращия генотип-II (194.6 ± 38.5 ng/ml спрямо 98.7 ± 23.4 ng/ml; p = 0.035).

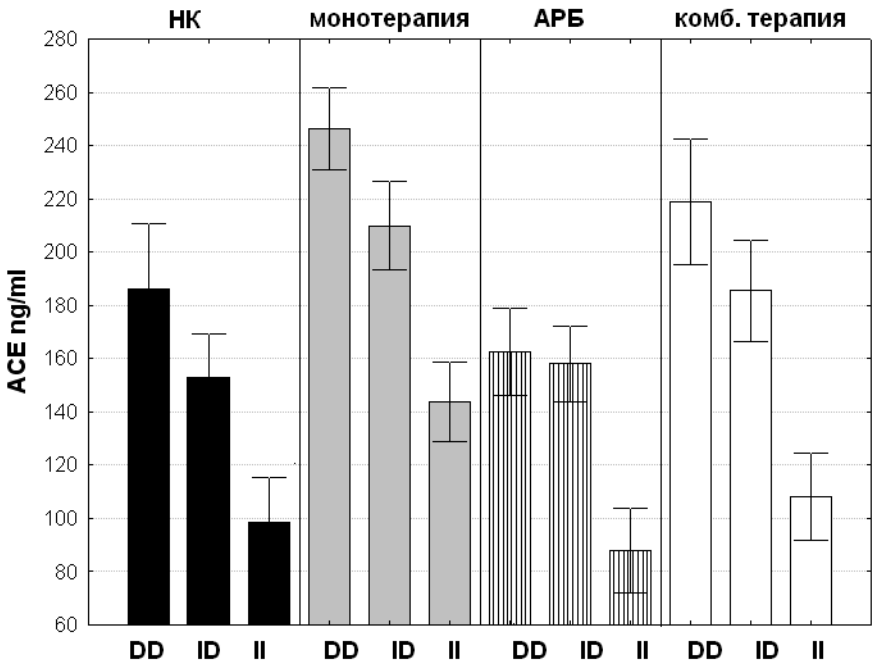
При анализа на хипертониците в зависимост от контрол на АХ и генотипа им отново е наблюдавана същата зависимост – най-високи серумни нива на АСЕ при генотип-DD, а най-ниски – при генотип-II (фиг. 40). Между двете подгрупи пациенти в зависимост от контрола на АХ, серумните нива на АСЕ при пациенти с един и същи генотип по АСЕ полиморфизма са сходни.



* p<0.05; ** p < 0.01 в сравнение с DD-генотип; ^p < 0.05; ^^p < 0.01 в сравнение с ID-генотип

Фиг. 40. Серумни нива на ACE в зависимост от генотипа по ACE I/D полиморфизма при пациенти с контролирана и неконтролирана артериална хипертония (АХ). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка

Ефектът на I/D ACE полиморфизма върху серумните нива на ACE ензима е оценен и при подгрупи пациенти с АХ на различен вид терапия – монотерапия с ACE инхибитори, с ARB и комбинирана терапия. Получените резултати са представени на фиг. 41.



* p<0.05; ** p<0.01 в сравнение с DD-генотип с еднакъв вид терапия; ^p < 0.05; ^^p < 0.01 в сравнение с ID-генотип с еднакъв вид терапия; +p<0.05 в сравнение с DD-генотип с ACE инхибиторна терапия

Фиг. 41. Серумни нива на ACE в зависимост от генотипа по ACE I/D полиморфизма при пациенти с артериална хипертония (АХ) на различен вид терапия и нормотензивни контроли (НК). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка.

В подгрупите пациенти в зависимост от вида терапия DD-генотипът отново се асоциира с най-високи нива, а II-генотипът – с най-ниски серумни нива на ACE ен-

зима. При пациенти на монотерапия с ACE инхибитори значимо по-ниски нива на ензима са отчетени при хомозиготите по инсерцията (143.8 ± 59 ng/ml) както в сравнение с хетерозиготите (209.9 ± 77.6 ng/ml; p = 0.007), така и при сравнение с хомозиготите по делецията (246.5 ± 78.4 ng/ml; p = 0.000057).

При пациенти на комбинирана терапия също значимо по-ниски нива на ензима бяха отчетени при генотип-II (108 ± 40ng/ml) в сравнение с хетерозиготите (185.5 ± 66.3 ng/ml; p = 0.019), така и в сравнение с хомозиготите по делецията (218.9 ± 67.05 ng/ml; p = 0.004).

Не са установени значими различия в серумните нива на ACE между пациенти на монотерапия с ACE инхибитори и пациенти на комбинирана терапия с един и същи генотип.

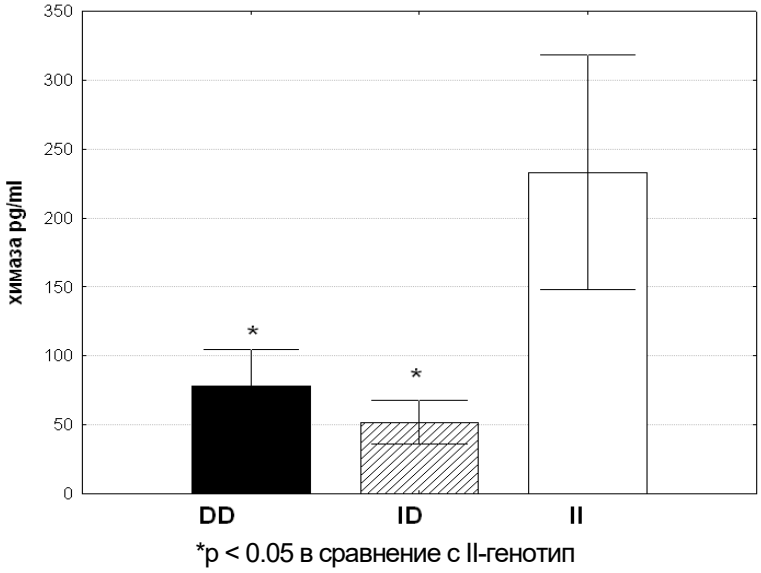
В подгрупата от пациенти на АРБ се наблюдава различен профил на асоциацията между серумни нива на ензима и генотипа по I/D ACE полиморфизма. Серумните нива на ACE са най-ниски при пациенти на ARB и са сходни с контролната група и при трита генотипа, дори и при високо-продуциращият генотип-DD. Генотипите DD и ID при тази подгрупа пациенти се асоциират със сходни серумни нива на ензима (162.7 ± 39.8ng/ml спрямо 158 ± 34.6ng/ml p=0.83), които са значимо по-високи от тези при генотип-II (87.8 ± 27.7ng/ml с p=0.024 и p=0.019 съответно). В допълнение, при генотип-DD серумните нива на ACE при пациенти на монотерапия с ACE инхибитори са значимо по-високи от тези на терапия с ARB (246.5 ± 78.4 спрямо 162.7 ± 39.8 ng/ml; p=0.017). С цел да оценим комплексното отражение на генотипа по I/D ACE полиморфизма, вида на терапията и постигнатия контрола на АХ върху серумните нива на ензима бяха проведени последващите сравнителни анализи, представени на таблица 33, въпреки сравнително малкия брой пациенти в съответните подгрупите, което ограничава статистическата значимост на данните.

Таблица 33. Серумни нива на ACE (ng/ml) в зависимост от генотипа, вида на терапията и контрола на АХ

Генотип	**DD**		**ID**		**II**	
Контрол на АХ / Терапия	**Контролирана АХ**	**Неконтролирана АХ**	**Контролирана АХ**	**Неконтролирана АХ**	**Контролирана АХ**	**Неконтролирана АХ**
Монотерапия (n = 64)	251.1 ± 76.9	234 ± 87.3	211.6 ± 79.8	207.9 ± 79.1	140.2 ± 60.2	151.8 ± 62.2
ARB (n = 15)	155.7 ± 40.2	197.7	178.9	153.9 ± 36.9	87.8 ± 27.7	-
Комб. Терапия (n = 26)	234.4 ± 74.6	203.5 ± 65.5	199 ± 74.1	158.5 ± 43.1	103.2 ± 5.9	110.5 ± 51.4

Установени са сходни серумни нива на ACE ензима при пациенти с контролирана или неконтролирана АХ с еднакъв генотип по ACE полиморфизма и на един вид терапия. При всички подгрупи генотип-II се асоциира с най-ниски нива на ензима, а генотип DD – с най-високи.

Предвид значимия ефект на генотипа по ACE полиморфизма върху количеството серумен ACE, се направи предположение, че това би имало ефект и върху серумната концентрация на ангиотензин 2 като продукт на ACE ензима. В допълнение се предположи, че ACE полиморфизмът може да проявява индиректен функционално-свързан ефект върху серумните нива на химаза като ключов ензим в алтернативен път за синтез на вазоактивния ангиотензин 2. За да проверим тази хипотеза, се проведе асоциативен анализ в група пациенти (n = 30) от мъжки пол на монотерапия с ACE инхибитори, с генотипно разпределение, сходно на това в общата група с АХ. Серумните концентрации на вазоактивния ангиотензин 2 са сходни между трите генотипа. При генотип-DD са установени 18.5 ± 1.5 pg/ml, при генотип-ID – 19.1 ± 1. 7pg/ml, а при генотип-II – 18.4 ± 2.9 pg/ml. По отношение на серумните нива на химаза констатирахме значимо повишение при генотип-II, който се асоциира с най-ниските нива на ACE ензима (фиг. 42).



Фиг. 42. Серумни нива на химаза в зависимост от генотипа по I/D полиморфизма в ACE при пациенти с АХ. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка

Наблюдават се по-високи серумни нива на химаза при пациентите с генотип II (ниско продуциращ ACE генотип) в сравнение с пациентите с DD-генотип (233.1 ± 208.3 pg/ml спрямо 78.3 ± 94.8 pg/ml, p = 0.037), както и при сравнение с ID-генотип (51.9 ± 53.3 pg/ml, p = 0.014).

В допълнение се наблюдава тенденция за по-висока честота на генотип-II при пациенти с високи нива на химаза и ниски нива на ACE в сравнение с DD-генотип и ID-генотип.

Таблица 34. Съпоставка на алелното разпределение при пациенти, според серумната концентрация на химаза

	Висока химаза (над 37.86 pg/ml)	**ниско ACE (под 37.86 pg/ml)**	**OR**	**95% CI**	**p-value**
DD	6 (46%)	7 (54%)	ref		
ID	6 (55%)	5 (45%)	1.4	0.209-9.616	0.682
II	**5 (83%)**	**1 (17%)**	***5.833***	***0.402-175.434***	***0.127***
ID + II спрямо DD	11 (65%)	6 (35%)	2.139	0.387-12.328	0.310
DD + ID спрямо II	12 (50%)	12 (50%)	5.000	0.429-131.559	0.141

Въз основа на получените резултати може да се предполага, че генотипът, определящ ниски нива на ACE, се асоциира с по-високи нива на химаза, вероятно като компенсаторен механизъм.

В допълнение е изследван ефектът на генотипа по ACE полиморфизма върху липидния профил при АХ пациенти от мъжки и женски пол (табл. 35), като не са установени значими разлики.

Таблица 35. Ефект на ACE генотипа върху липидния профил при пациенти с АХ в зависимост от пола им

	DD	**ID**	**II**
Възраст	61.5 ± 12.7	60.6 ± 13.1	62.5 ± 14.9
Холестерол	3.32 ± 2.4	2.64 ± 2.7	3.14 ± 2.8
LDL	1.77 ± 1.35	1.54 ± 1.6	1.73 ± 1.7
TG	0.89 ± 0.98	0.82 ± 1.5	0.91 ± 0.93
HDL	0.59 ± 0.64	0.44 ± 0.61	0.42 ± 0.61
Мъже			
Възраст	59 ± 13.5	60.6 ± 13.1	58.1 ± 16.1
Холестерол	3.72 ± 2.13	3.12 ± 2.6	3.31 ± 2.5
LDL	2.09 ± 1.3	1.64 ± 1.5	1.67 ± 1.5
TG	0.99 ± 0.85	1.02 ± 1.9	1.1 ± 0.91
HDL	0.63 ± 0.6	0.32 ± 0.53	0.31 ± 0.52
Жени			
Възраст	65.7 ± 10.26	63.3 ± 11.6	67.9 ± 11.6
Холестерол	2.6 ± 2.7	2.05 ± 2.7	2.9 ± 3.2
LDL	1.15 ± 1.3	1.4 ± 1.7	1.8 ± 2
TG	0.73 ± 1.2	0.57 ± 0.8	0.69 ± 0.95
HDL	0.55 ± 0.7	0.54 ± 0.67	0.5 ± 0.68

В ОБОБЩЕНИЕ

Установените генотипни и алелни честоти в изследваната група хипертоници са сходни с контролната група, както и с тези, констатирани и при други европейски популации. Не са намерени различия в генотипните и алелните честоти между мъже и жени, както и между пациентите с добър или лош контрол на хипертонията. При лицата с неконтролирана хипертония се наблюдава тенденция за по-висока честота на генотипи, съдържащи I-алел (II + ID), докато DD-генотип е с по-висока честота сред пациентите с контролирана АХ.

При пациентите с АХ генотип-DD се асоциира с най-високи серумни нива на АСЕ ензима, следвани от тези при генотип-ID, а най-ниски са при II-генотип.

Носителството на II-генотип по АСЕ полиморфизма се асоциира с най-високи серумни нива на химаза.

V. ОБСЪЖДАНЕ

1. Артериална хипертония и оксидативен стрес

Взаимодействието на кислородните радикали с клетъчни структури може да доведе до настъпването на редица неблагоприятни промени, включително до клетъчна смърт. Установено е, че определянето на токсичния ефект на всеки един специфичен реактивен кислороден вид е трудно, поради което съществува тенденцията тези повреди да се означават под общото наименование "оксидативен стрес", без да се отбелязва отделния молекулен механизъм (63). Според Куюмджиева и Петрова съществуват достатъчно доказателства за ролята на свободните радикали само за две нарушения: кислородната недостатъчност и CCl_4-индуцираното увреждане на черния дроб. Останалите заболявания са в процес на теоретична и експериментална работа относно ключовата роля на ROS като причина или следствие от заболяването (63). Проучванията при хора не са толкова убедителни, колкото при експериментални модели, но има многобройни доказателства за връзката между оксидативния стрес и повишеното АН (60). Тя е обект на изследвания и в настоящата научна работа, като акцентът е върху оптимизиране на клинико-терапевтичния подход.

1.1 Перспективи на антиоксидантната терапия

Все по-голямо значение в профилактиката и лечението на редица заболявания и състояния се отдава на употребата на антиоксиданти витамини. Желева дефинира антиоксидантите като молекули способни да инхибират окислението на други молекули. Те прекъсват развитието на верижнорадикаловите реакции чрез отстраняване на свободнорадикаловите междинни продукти и инхибиране на други окислителни реакции, при което самите те се окисляват. Антиоксидантите биват два типа – *ензимни* (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион, пероксидаза, глутатион редуктаза и глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа) и *неензимни* (витамин С, полифеноли, витамин Е, каротеноиди) (139).

Към днешна дата цялостните резултати от големи клинични проучвания относно употребата на антиоксидантни витамини при сърдечно-съдови заболявания не оправдаха очакванията въпреки обещаващите констатации от експе-

риментални изследвания, предвид на което употребата им не е препоръчвана за профилактика и лечение на АХ от *Американската кардиологична асоциация* и *Канадското дружество по хипертония* (Grant,R.D., Selemidis,S., 2011 (90); Ceriello, A., 2008 (93); Huang, W. Y., Davidge, S. T., 2013, (143); Debreceni, B., Debreceni, L., 2012, (144); Tinkel, J. et al. 2012, (119); Wahlqvist, M. L. 2013 (145); Touyz, R. M. , 2004 (91)). Подобни са и резултатите при прием на добавки, съдържащи селен, като в допълнение се изтъкват редица неблагоприятни ефекти на последните (146, 147).

Известно е, че балансът между про- и антиоксидантите е строго регулиран и изключително важен за поддържане на жизнеността на клетките и биохимичните им функции. Следователно за протичане на нормалните биологични функции на организма съществуват молекулни механизми, които клетките използват, за да се предотврати дисбалансът между про- и антиоксидантите, в резултат на ендогенни или екзогенни фактори. Свободните радикали може да са резултат и от външни източници, като рентгенови лъчи, озон, цигарен дим, замърсен въздух и промишлени химикали (148). Природосъобразният начин на живот, здравословното хранене и хигиената на труда са част от екзогенните източници, респективно радикалообразуването може да бъде понижено. Все по-голям брой автори подкрепят хипотезата за връзка между оксидативния стрес и нездравословния начин на живот и съответно ключово значение в профилактиката се отдава на корекция в стила и начина на живот (149; 150; 151). D. E. King и сътр. въз основа на мащабно проучване сред възрастни хора достигат до становището, че индивиди без анамнеза за сърдечно-съдови заболявания, при които липсват кардиоваскуларни рискови фактори (вкл. затлъстяване, тютюнопушене, повишен холестерол и др.), са с по-висок риск за сърдечно-съдова заболяемост и смъртност, ако не се придържат към здравословен начин на живот (152).

Основавайки се на резултатите от проучване Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH), Ceriello изтъква предимствата на диетичния подход с употреба на богати на антиоксиданти храни, фибри, нискомаслени млечни продукти в терапевтичната стратегия при пациентите с хипертония (93). Този подход за превенция и контрол на хипертензията се препоръчва и днес от редица асоциации включително от National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) към National Institutes of Health на САЩ.

P. Codoner-Franch и сътр. разглеждат взаимозависимостта между възпалението, оксидативния стрес и затлъстяването в частност затлъстяването в детска възраст. Авторите считат, че генераторите на оксидативен стрес и възпалителната сигнализация са не само свързани, но тяхното увреждане може да доведе до инхибиране на инсулиновия отговор, както и до по-висок риск от сърдечно-съдови заболявания. Редуцирането на нивата на хронично възпаление и оксидативен стрес в детска възраст могат да намалят сърдечно-съдовата заболяемост и смъртност при възрастни (153, 154).

Предвид изложените твърдения можем да направим извода, че въпреки липсата на доказателства, относно ползата от приложението на антиоксиданти, поддържането на балансирани нива на ROS би имало благоприятното въздействие по отношение на сърдечно-съдовата патология. Преодоляването на нездравословните навици и привички, контролът и самоконтролът върху рисковите фактори стимулират позитивно здравно поведение и активната здравна позиция на младото поколение заемат водещо място в първичната и вторичната профилактика на населението.

1.2. Причини за разочароващите резултати от опитите с антиоксиданти

Изтъквани са различни причини за негативните резултатите от големите проучвания с антиоксидантни витамини. Възможно е режимите на дозиране да са неподходящи, а продължителността на лечението недостатъчна. Ако ROS се генерира предимно от вътреклетъчни органели, оралното приложение на антиоксиданти би било неефективно. Що се отнася до пациентите, включени в проучванията, повечето са имали значително сърдечно-съдово заболяване, при което вредните ефекти на оксидативния стрес могат да бъдат необратими (91). При проучването HOPE, например са включени пациенти без сърдечна недостатъчност, но с известна атеросклероза или с диабет плюс поне един допълнителен сърдечно-съдов рисков фактор (155). В Heart Protection Study (HPS) пациентите са на възраст до 80 год., с общ холестерол ≥ 3,5 mmol/L и допълнителен рисков фактор (наличен захарен диабет тип 1 или 2, корона болест ,оклузия на некоронарни артерии или хипертония) (156). Не бива да се пренебрегва фактът, че малките единични изпитвания често включват по-малко от 100 души, оставяйки открит въпроса за възможни отклонения от получените данни при увеличаване на броя на участниците. В допълнение в по-голямата част от тези проучвания не са извършени системни измервания

на общия антиоксидантен капацитет, което прави трудно констатирането дали промените в антиоксидантния капацитет придружават наблюдаваното понижение на кръвното налягане (147).

Друг фактор, нуждаещ се от внимание, е, че антиоксидантите не инхибират производството на ROS. Теоретично агенти, намаляващи образуването на радикали, трябва да бъдат по-ефективни в сравнение с „чистачите" за подобряване оксидативния стрес. Поради тази причина инхибирането на съдовата NADPH, по-специално GP91PHOX (NOX2) хомолози, могат да са новата терапевтична стратегия за профилактика и лечение на сърдечно-съдови заболявания.

Редица автори поддържат тезата за добър клинико-терапевтичен ефект от употребата на антиоксиданти, опитвайки са да обяснят получените негативни резултати. Въз основа на своите проучвания S. Ozkanlar и F. Akcay отбелязват, че продължителната употреба на витамини A, C и E е ефективна за превенция на атеросклерозата при експериментални животни, но все още този факт не е потвърден при клинични изпитвания с хора. Авторите обръщат внимание, че доказателствата са основани на експерименти с млади и възрастни животни с ранен стадий на атеросклероза и от in vitro изследвания, докато в повечето от клиничните проучвания са включени по-възрастни пациенти с късни стадии на заболяването (157). Сравнението с контролната група обикновено е затруднено от факта, че повечето пациенти са приемали аспирин профилактично, статини, фолиева киселина и други, притежаващи също антиоксидантни свойства. Изложените обстоятелства са причина водещи автори да считат, че превантивният ефект на витамините не може да се отхвърли (144). Изтъква се необходимостта за целенасочено провеждане на проучвания за влиянието на антиоксидантните витамини върху АХ, а не изобщо върху сърдечно-съдовата патология (91). При това да се използват данни от по-големи рандомизирани клинични проучвания, насочени към понижаване на кръвното налягане (147).

Посочените факти ясно очертават необходимостта от нови варианти/подходи за редуциране на радикалообразуването и понижаване на сърдечно-съдовия риск при пациенти с АХ.

При провеждане на лечение, лекарствата и техните метаболити могат да действат като про- или антиоксиданти в плазмата. Touyz предполага антиоксидантен ефект на класическите антихипертензивни средства - β-блокери (карведилол), ACE инхибитори, ангиотензин-рецепторни блокери и Ca-антагонисти, причислявайки ги към преките NADPH оксидазни инхибитори (91). Доказателствата за ползата от приложението на всяка от използваните групи по отношение

на намаляване на сърдечно-съдовия риск са безспорни. Що се отнася до оптимизиране стойностите на кръвното налягане при всяка от посочените терапевтични стратегии се наблюдава резистентност на част от пациентите към избраната терапия. За да изясним причините за липсата на терапевтичен ефект, проведохме собствено проучване върху антиоксидантния ефект на класическите антихипертензивни средства с оглед възможностите за повлияване оксидативната токсичност при провеждане на антихипертензивно лечение. За изследване на оксидативния статус в биологични системи приложихме различни подходи, базиращи се на използване на EPR спектроскопска техника: спектроскопия на стабилни парамагнитни биомолекули и ЕПР спин-улавяща техника за доказване на краткоживеещи радикали (139).

Получените резултати демонстрират значително по-високо ниво на оксидативен стрес по всички отчетени параметри при пациентите с диагностицирана артериална хипертония в сравнение с нормотензивните контроли, потвърждавайки констатираното от предшестващи изследвания [Montezano, A. C., Touyz, R. M., 2004 (60); Fortuno, A. et al., 2004 (120); Higashi, Y. et al., 2002 (121); Kashyap M. K., 2005 (124); Rodrigo R . et al. 2007 (125); Jeong-Hwa, 2013 (126)]. Montezano и съавт. считат, че повишеното радикалообразуване е свързано с много заболявания на сърдечно-съдовата система, включително хипертония, атеросклероза, сърдечна недостатъчност, инсулт, диабет и бъбречни заболявания. Fortuno и сътр. изказват предположение, че оксидативният стрес е свързан с патогенезата на хипертонията и нейните усложнения чрез промени в метаболизма на азотния оксид (NO). Авторският колектив въз основа на изследване на 51 хипертоници и 43 нормотензивни контроли, стига до извода, че хипертонията е свързана с намаляване на бионаличността на NO и повишаване на оксидативния стрес. Higashi и съавт. експериментално подкрепят твърдението си, че повишението на оксидативния стрес при пациенти с реноваскуларна хипертония се дължи на активиране на ренин-ангиотензиновата система и бъбречната артериална ангиопластика би подобрила ендотелната дисфункция при тези пациенти чрез намаляване на оксидативния стрес.

Връзката между различни параметри на оксидативен стрес и есенциалната хипертония е предположена и теоретично обоснована и от A. Baradaran и съавт., но изследователите работят в посока на възможностите за антиоксидантно лечение, без експериментално доказателство за изказаната хипотеза (158). Някои авторски колективи развиват идеята за вторично повишено ради-

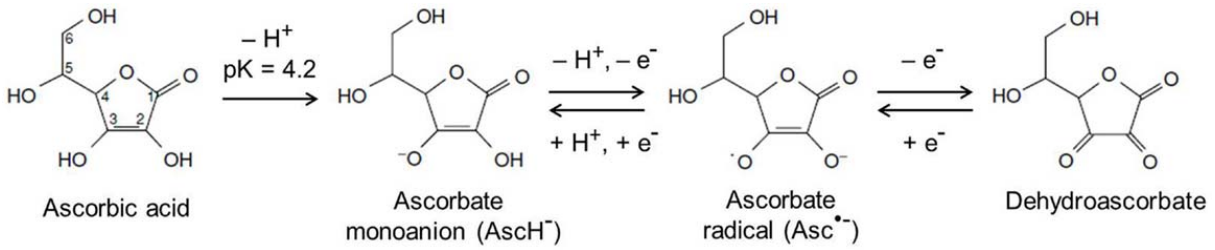
калообразуване в резултат на директно стимулиране на съдова NADPH оксидаза при пациенти с есенциална хипертония (91). Екипът ни допуска възможността за участие на реактивните кислородни видове в етиопатогенезата на хипертоничната болест. Реактивните метаболити на кислорода и продуктите на липидна пероксидация се изтъкват сред водещите причини за ендотелно увреждане (84). От друга страна, увреденият ендотел реагира с повишено радикалообразуване на мястото на съдовата лезия. По този начин предполагаме затваряне на порочен кръг, задълбочаващ съдовата лезия, т.е. повишената ROS продукция вероятно взема участие в развитието на атеросклеротичните изменения, като впоследствие съдовата лезия е предпоставка за повишеното радикалообразуване.

1.3. Влияние на лекарствената терапия върху подбрани „real time" показатели на оксидативен стрес – ROS продукти, аскорбатни радикали и •NO радикали

Нивата на аскорбатните радикали, ROS продукти и •NO радикали дават информация за оксидативния статус на биологичната система в момента на изследването – т.е. този тест се явява „***real-time"*** индикатор.

В живите организми ендогенните биомолекули, действащи като антиоксиданти (напр. аскорбиновата киселина), могат да бъдат модифицирани от патологично генерирани ROS продукти до стабилни органични радикали.

При физиологично pH (pK от 4.2 и 11.6) аскорбатът се намират в моноанионна форма. Той лесно претърпява две последователни, обратими, едноелектронни оксидации, при което се получават съответно аскорбатен радикал и дехидроаскорбат.



Фиг 43. Химична структура на аскорбат и неговите продукти на окисление по Caroline Kuiper and Margreet C. M. Vissers, 2014 (159)

От термодинамична гледна точка аскорбатът се нарежда в края на поредицата от окислителни свободни радикали (139). Това означава, че всички окислителни видове, имащи по-висок редокс потенциал, като •OH; третичен бутил алкоксил радикал; глутатиил радикал (GS•); уратен радикал ($UH^{\bullet -}$); хлорпромазинов радикал ($\bullet CPZ^{+}$); алкилпероксил радикал (ROO•); липидпероксилен радикал (LOO•); токопероксилен радикал (•TO); $O_2^{\bullet -}/HO_2^{\bullet}$ (160, 161), пероксинитритът ($ONOO^{-}$), могат да бъдат редуцирани, при което се генерира аскорбатен радикал (162). Образуваният аскорбатен радикал притежава относително дълъг полуживот, поради което лесно се доказва чрез директна EPR спектроскопия, дори и при стайна температура във воден разтвор.

Нашето изследване установи по-високо ниво на аскорбатни радикали в плазмата при пациентите с АХ в сравнение с групата нормотензивни контроли, но без статистически значима разлика между групите с различен вид терапия, което предполага, че никоя от избраните терапевтични схеми не е в състояние да инхибира генерирането на аскорбатния радикал.

В достъпната ни литература има съобщения за понижение на образуваните аскорбатни радикали ($Asc^{\cdot -}$) при приложение на ACE инхибитори, съдържащи сулфхидрилна група (SH-), т.е. предполага се, че "почистването" на свободните кислородни радикали е сулфхидрил-зависимо (163). В нашето проучване е използван медикамента лизиноприл, който не съдържа SH-група. Респективно, можем да предположим че химичната структура на медикамента не опосредства значим ефект върху генерирането на аскорбатни радикали. Макар да има данни за повлияване на липидната пероксидация от несулфхидрилни ACE инхибитори, последните вероятно не оказват влияние по отношение на редукцията на аскорбатни радикали.

По литературни данни предпочетеният в проучването ни ангиотензин рецепторен блокер – валсартан, притежава известни антиоксидантни и антиапоптозни ефекти, включващи инхибиране на NF-κB-транслокация към ядрото, понижаване на плазмените нива на TNF-α, инхибиране на апоптозата (при TUNEL оцветяване) в исхемичен миокард, намалена активност на каспаза-3 и понижени нива на малондиалдехид (MDA) (164). Проведеното от нас изследване предполага липса на терапевтичен ефект по отношение на генерирането на аскорбатни радикали.

Някои научни разработки констатират намаляване на нивата на оксидативен стрес и облекчаване на сърдечната недостатъчност при лечение с бета-блокери

като метопролол, карведилол и бизопролол. Обсъждат се няколко възможни механизъма: бета-блокиращия ефект редуцира катехоламин-индуцирания оксидативен стрес в миокарда, антиисхемичен ефект (исхемията доказано увеличава 4-hydroxy-2-nonenal в миокарда, потенциращи радикалообразуването) и изразения негативен хронотропен ефект при бета-блокада (тахикардията предизвиква повишено генериране на ROS в митохондриите). Директни антиоксидантни ефекти са наблюдавани при лечение с карведилол (165). Резултатите ни не показаха преимущество по отношение на избраната терапевтична схема, включваща бизопролол, относно плазменото ниво на аскорбатни радикали. Възможно е бизопрололът да няма директен радикал-инхибиращ ефект, а разглежданата индиректна антиоксидантна активност на бета-блокерите да не е достатъчна за значително понижение на радикалообразуването. Извън антиоксидантната им активност бета-блокерите са разглеждани като медикаменти, които „блокират ефектите на стреса върху тялото“. Предвид доказаното понижение на общия сърдечно-съдов риск, антиаритмичен, антистенокарден ефект и антихипертензивен ефект, можем да приемем, че антиоксидантните им ефекти не са от съществено значение за прогнозата на пациента.

Реактивните кислородни видове са най-важният клас радикали, образуващи се в живите системи. ROS е общ термин, който включва двата кислородни радикала (супероксидния и хидроксилния) и някои окислителни агенти, които лесно се превръщат в радикали (HOCl, HOBr, O_3, ONOO, $^1O_2$ и H_2O_2). Всички кислородни токсични видове са ROS, но не всички ROS са кислородни радикали (166; 167). Повечето от тях реагират като силни окислители. Най – мощна окислителна активност притежават хидроксилният радикал и синглетният кислород. Те увреждат всички клетъчни структури: протеини, мембранни липиди, въглехидрати и нуклеинови киселини (168). В живата клетка хидроксилният радикал може да реагира с всички биологични молекули като ДНК, протеини и липиди, като свръхпроизводство на •OH в крайна сметка води до клетъчна смърт (166; 169).

Небалансирана продукция на ROS и/или увредена антиоксидантна защитна система може да доведе до възникване на възпалителни процеси, свръхчувствителност, автоимунна реакция и др. Известно е, че ROS играят фундаментална роля в имунните и възпалителни механизми, участващи в повечето заболявания чрез окислителния катаболизъм на ейкозаните, частично на простагландините и тромбоксана по циклооксогеназния път и на левкотриените чрез липооксигеназния път (162). Kyaw et al. посочват атеросклерозата и исхемичната болест на сърцето като заболявания, свързани с небалансирана продукция на ROS (170). Подобна констатация би могла да се направи и въз основа на получените при нашето проучване резултати, предвид установеното значително по-високото ниво на ROS при болните с АХ.

При всеки от избраните терапевтични подходи се обсъжда известна антиоксидантна активност (171; 172; 173), но при нашето проучването не установихме статистически значима разлика между пациентите на различен вид лечение по отношение на високо реактивните кислородни видове. Продукцията на ROS зависи основно от активността на NADPH оксидазата, като тя може да се увеличи посредством стимулиране на съдовите гладкомускулни клетки с ангиотензин II, тромбин, тромбоцитен растежен фактор, тумор-растежен фактор 2, лактосилсерамид и др. Вероятно е медикаментозното повлияване на РААС (вкл. понижение на нивата на ангиотензин 2) да не е достатъчно за значимо понижение на продукцията на реактивни кислородни видове, предвид големия брой и разнообразието от фактори, въздействащи върху активността на NADPH оксидазата.

ROS са кратко живеещи и участието на всеки един радикал в определена клетъчна дисфункция е трудно определимо. Поради особеностите във фармакокинетиката и фармакодинамиката на всеки от използваните медикаменти и различните описвани механизми за възможно антиоксидантно въздействие, считаме за удачно отчитането на терапевтичното отнасяне спрямо показатели на оксидативния стрес – крайни продукти на окисление на липиди, протеини и нуклеинови киселини.

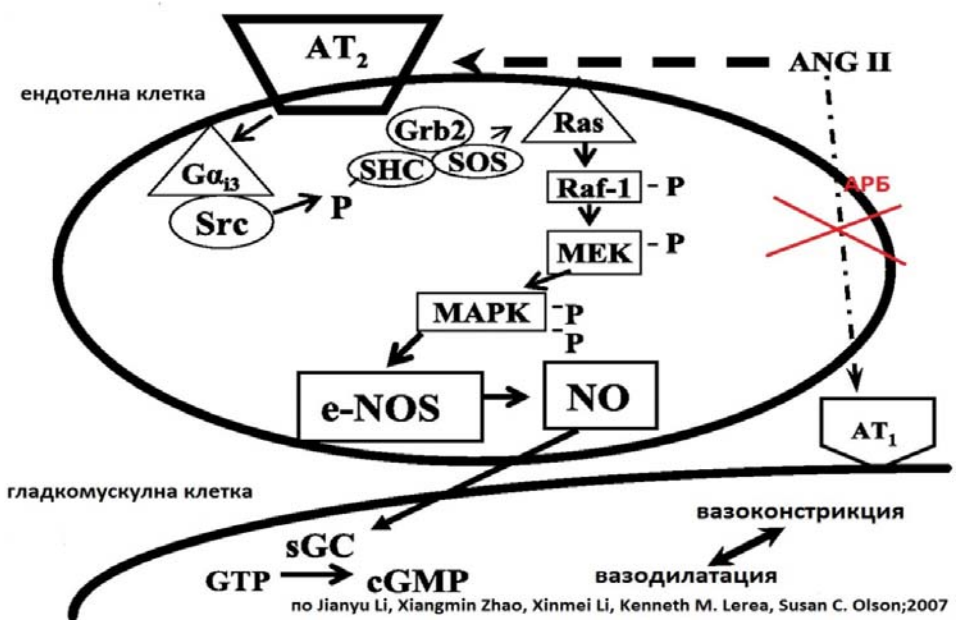
Регулацията на неензимни и ензимни реакции на липидна оксидация от азотен оксид (NO) е ефикасна и повсеместна. Интерес буди въпросът при какви условия доказано протективна молекула като NO се превръща в силно реактивоспособен прооксидант и какви са възможностите за повлияване на този процес?!

Прооксидантното срещу антиоксидантното протективно влияния на NO е в основата на оксидативния статус на тъканите. Когато NO превишава заобикалящите оксиданти, липидната оксидация и моноцитна миграция в съдовата стена са отслабени, образувайки антиатерогенетично покритие. Щом ендогенното тъканно производство на оксидант се увеличи или тъканната защита се изчерпи, NO поражда вторични видове оксиданти, които могат да увеличат мембранното липопротеиново оксидиране и образуването на пенести клетки в съдовете, насърчавайки проатерогенните ефекти. NO е многообразна молекула, способна да реагира чрез множество пътища за модулиране на реакциите на липидна оксидация и тъканно възпаление (174, 175).

Обект на нашето изследване са генерираните •NO радикали в плазмата. Установихме значително по-високото им ниво при болните с АХ, сравнени с контролната група, като статистически най-високо е радикалообразуването при пациенти на лечение с валсартан. Предполагаме, че е възможно наблюдаваната разлика да се дължи на АТ-2-зависимо стимулиране на ендотелна NO синтетаза по механизъм,

аналогичен на представения от Jianyu Li и сътр., 2007 (вж. фиг. 44). Логично е да се предположи, че детектирания от нас NO в плазма е основно продукт на eNOS. През последните години с безспорни доказателства е установено наличието на невронална азотен оксид синтаза (nNOS) в кардиомиоцитите. Активността на nNOS е високочувствителна на оксидативен стрес, но се променя и при редица други състояния – напредване на възрастта, миокарден инфаркт, физическа активност, вкл. фармакологично повлияване (176). Нашият колектив допуска възможността за конститутивната продукция на азотен оксид в миокарда, като nNOS е възможен терапевтичен таргет.

Наблюдаваното многократно повишение на •NO в плазмата, както и регистрираните повишени нива на Asc• радикали и ROS продукти спрямо контролите, говори, че в момента на изследването са протекли/протичат оксидативни процеси.



Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) – растежен фактор рецептор-свързан протеин 2; Son of sevenless (SOS); e-NOS – ендотелна NO синтетаза

Фиг. 44. Хипотетична схема, при която е налице AT2 рецептор-зависимо активиране на MAPK и увеличено експресиране на eNOS, медиирано чрез Gαi3 / Src / Shc / Grb2 / Sos / Ras / Raf път в артериални ендотелни клетки. Ангиотензин II чрез Gαi3, стимулира Src-зависимо фосфорилиране на адапторен протеин Shc, който след това се асоциира с адапторен протеин Grb2 и гуанин-нуклеотид обменен протеин Sos. След това Sos стимулира свързването Ras GTP, което води до по-последователно активиране от Ras до Raf-1 , MEK и накрая MAPK. Стимулирането на eNOS увеличава NO производство – по Jianyu Li et al., 2007 (177)

Констатираното представя известно предимство при използване на АСЕ и ренинови инхибитори пред АРБ по отношение „real time" показателите на оксидативен стрес. Този факт, сам по себе си, не е основание за преимущество на терапията с АСЕ инхибитор пред АРБ, дори и при придружаващи заболявания в чийто етиопа-

тогенеза се обсъжда повишен оксидативен стрес (например ЗД). Изборът на антихипертензивни средства следва да бъде направен индивидуално, съгласно съответните Европейски указания.

Предвид получените резултати, показващи високи нива на изследваните радикали при АХ, както и техния кратък полуживот, се насочихме към изследване на показатели/крайни продукти на окисление на липиди (MDA), протеини (PCC) и нуклеинови киселини (8-OHdG). Асоциирането на оксидативния стрес с клетъчните нарушения и възможностите за медикаментозно повлияване на последните са от решаващо значение при избора на терапевтична стратегия.

1.4. Влияние на лекарствената терапия върху подбрани показатели на оксидативния стрес – крайни продукти на окисление на липиди, протеини и нуклеинови киселини

Посредством реакции на ROS с мастните киселини в липидния слой на клетъчните мембрани се осъществява окислително увреждане на липидите, водещо до клетъчна смърт. Прекисното окисление на биологичните мембрани може да причини промени в тяхната функционалност, мембранен потенциал, повишен пермеабилитет за H+ и други йони, разцепване понякога последвано от освобождаване на органелно и клетъчно съдържимо (например лизозомални хидролитични ензими). Цитотоксични също са и някои от продуктите на липидна пероксидация (зависи от металните йони). Най-голям акцент се поставя на малондиалдехида (наричан понякога малоналдехид), но той е само част от множество карбонилни компоненти формирани при пероксидиране (63). Липидите са най-лесно окисляеми, което ги прави и най-предпочитания обект за изследване на свободно радикалови увреждания чрез липидна пероксидация.

Най-ниска липидна пероксидация установихме при болни на лечение с ACE инхибитор, като отчетената стойност не се различаваше статистически с нивото при здрави контроли. По литературни данни от ACE инхибиторите единствено Zofenopril и Captopril притежават сулфхидрилна (SH) група, което се свързва с възможност за “почистване“ на свободните кислородни радикали. Антиоксидантната активност на Zofenopril е доказана на сърдечно и съдово ниво както in vivo и in vitro (171). M. Chopra използва анализ, който генерира свободни радикали (FR) чрез фотоокисление на дианизидин, чувствителен на рибофлавин, 4 x 10 (-5) M и каптоприл, епикаптоприл (SQ 14534, стереоизомер на каптоприл), зофеноприл и fentiapril. Според автора "почистването" на свободните

кислородни радикали е сулфхидрил-зависимо, но липидната пероксидация се инхибира от сулфхидрил- и несулфхидрил-съдържащи ACE инхибитори (171). Този факт може до известна степен да обясни понижената липидна пероксидация (съпоставима със здрави индивиди) при болните на монотерапия с Lisinopril и представя предимство на този тип лечение .Предполагаме индиректно действие на лизиноприла, опосредствано от понижаване на плазмените концентрации на ангиотензин 2, който е известно, че притежава прооксидативно действие медиирано от AT1R.

При монотерапия с ACE инхибитор се наблюдава най-ниско ниво на •NO радикала от „real time" показателите на оксидативен стрес, което също е фактор за по-ниско плазмено ниво на липидно прекисно окисление. Нашите резултати представят известно терапевтично предимство на монотерапията на АХ с ACE инхибитор по отношение на процеса на липидна пероксидация.

Живите организми съдържат голямо количество разнообразни протеини, които също се явяват и основни мишени за ROS, тъй като под тяхно влияние може да се промени нивото на протеиновата структура. Изчислено е, че протеините могат да улавят по-голямата част (50-75%) от генерираните ROS. Модификацията на първичната протеинова структура е резултат от модификация или дефицит на някои аминокиселини, агрегация и фрагментация на протеините, а модификацията на вторичната и третична структура причинява промени в разтворимостта и заряда (178). Окислителното увреждане на протеини се индуцира или директно от ROS или косвено чрез взаимодействие с вторичните странични продукти на оксидативния стрес и може да се получи чрез различни механизми (***Michael reaction***), например при окисление на някои аминокиселини в страничните вериги, при което се генерират протеин карбонилни продукти (179). В сравнение с други окислителни модификации, карбонилите се образуват сравнително по-трудно и за разлика от образуването на метионин сулфоксид и цистеинови дисулфидни мостове, процесът на карбонилирането е необратим (180).

При нашето изследване всички групи болни показаха значително по-високо плазмено протеин карбонилно съдържание в сравнение с контролната група здрави индивиди, без статистически значимо превъзходство на някоя от приложените терапии. Вероятно нито една от избраните терапевтични схеми не е в състояние значително да инхибира окислителното увреждания на протеините.

Литературни данни от водещи автори сочат, че карведилол и R(+) карведилол намаляват миокардното протеин-карбонилно съдържание и реактивните субстанции на тиобарбитуровата киселина при плъхове с автоимунен миокардит (181). Проучването ни с бизопролол не показа предимство при болните на комбинирано лечение.

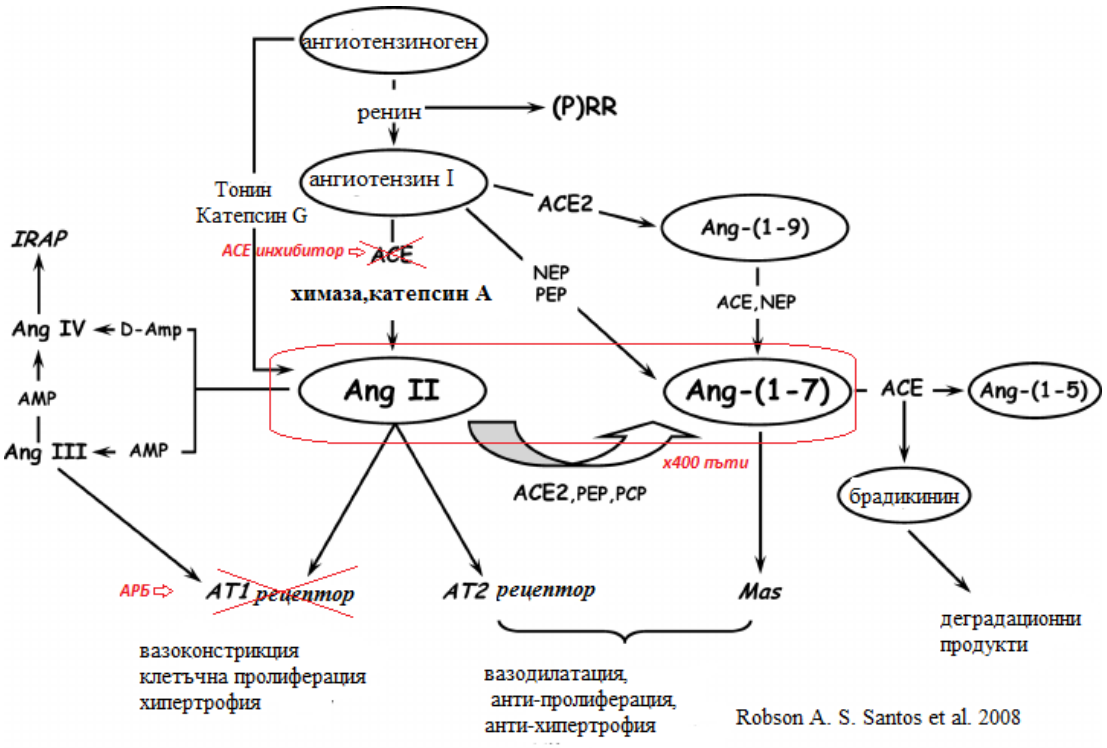
Увреждането на ДНК води до множество лезии в ДНК молекулата, които причиняват мутации, делеции и други генетични дефекти и показва, че и двата компонента – въглехидратният и базите, са податливи на окисление, което води до разграждане на базите и късане на веригата (162). Понастоящем се предполага, че взаимодействието на ROS с ДНК повлиява регулацията на определени гени, което може да доведе до промени, можещи да бъдат както пагубни, така и полезни за клетката. Тези взаимодействия могат да представляват директна модификация на ДНК или да влияят чрез изменения в транскрипционните фактори или ензимите, участващи в регулацията на генната експресия (63).

В настоящия труд окислително увреждане на ДНК е определено като количество 8-OHdG и е значително по-високо в плазмата на хипертоници, провеждащи монотерапия с лизиноприл. Нашият научен колектив предполага следната хипотеза за обяснение на получения резултат. Предвид мястото на действие на АСЕ инхибиторите върху системата ренин-ангиотензин-алдостерон, ангиотензин I може да се метаболизира по два варианта:

1. Посредством АСЕ 2 метаболизиране до ангиотензин 1-9 (функцията му все още не е изяснена). От ангиотензин 1-9 чрез АСЕ 2 или NEP (неутралната ендопептидаза) до ангиотензин 1-7;

2. Директно чрез NEP до ангиотензин 1-7.

За АРБ освен посочените варианти е възможно метаболизиране на ангиотензин II чрез АСЕ 2 до ангиотензин 1-7 (поради по-ниското ниво на блокиране на РААС на ниво АТ-1 рецептор). АСЕ 2 има около 400 пъти по-висока активност за ангиотензин II в сравнение с ангиотензин I, което предполага по-висока концентрация на ангиотензин 1-7 при пациенти на терапия с АРБ. Ангиотензин 1-7 посредством MAS рецептора води до инхибиране на апоптозата. Инхибирането на деструкцията на ангиотензин 1-7 до ангиотензин 1-5 и брадикинин от страна на АСЕ инхибиторите, изглежда, не е достатъчно, за да кореспондира с високите нива на ангиотензин 1-7 при лечение с АРБ.



Съкращения: **AMP** – аминопептидаза; **Mas** – ангиотензин-(1-7) рецептор MAS; **D-Amp** – дипептил-аминопептидаза; **IRAP** – инсулин-регулираща аминопептидаза; **PCP** – пропил карбоксипептидаза; **PEP** – пропил-ендопептидаза; **NEP**-неутрална ендопептидаза; **(P)RR** – ренин/проренин рецептор

Фиг. 45. Ренин-ангиотензиновата системна каскада – Santos,R. et al., 2008 (22)

B. Wu и сътр. (2013) в своя труд отчитат инхибиране на апоптозата (при TUNEL оцветяване) в исхемичен миокард, намалена активност на каспаза-3 и понижени нива на малондиалдехид (MDA) при терапия с валсартан. Авторите предполагат инхибиране на NF-κB-транслокация към ядрото, което също може да даде обяснение за наблюдаваните резултати (182).

Изследванията ни представят значимо превъзходство на лечението с АРБ, спрямо ACE инхибитор със или без добавен бета-блокер по отношение увреждане на ДНК. Антиоксидантните качества на АРБ са предположени и от други автори, без да може да бъде точно обяснен механизмът на радикалопротективното им действие. Csaba András Dézsi при проучвания с мишки установява подобряване на ендотелната функция, намаляване на съдовия и на кавернозния оксидативен стрес при терапия с ирбесартан (183).

Наблюдаваните промени в MDA, повишаване нивата на протеин-карбонилирането и повишаване количеството на 8-OHdG в кръвта на хипертоници предполагат наличие на оксидативен стрес и вероятно нарушен антиоксидантен статус. Установихме известно предимство при лечение с ACE инхибитори

по отношение на процеса на липидна пероксидация и на АРБ по отношение ДНК увреждането.

2. Протеини от РААС системата

Представените демографски данни за групата от 105 хипертензивни пациенти с изследвани серумни нива на АСЕ показаха значима разлика във възрастта между мъжете и жените (p = 0.003; t-test). Подобна разлика във възрастта е наблюдавана и при други проучвания. Например данните от NHANES III са аналогични – „по-старата“ група хипертоници е предимно от женски пол (58%), докато по-младите пациенти са предимно мъже (62.5%) (6). Вероятно този факт е обусловен от по-голямата средна продължителност на живота при жените. Освен това хормоналните промени, които настъпват в телата им в периода на менопаузата, предразполагат към сърдечно-съдови заболявания.

По отношение на възрастта пациентите на АСЕ инхибитори са по-млади в сравнение с другите подгрупи, като статистическа разлика се наблюдава само в сравнение с пациентите на комбинирана терапия (p = 0.004, t-test). Тази зависимост отчасти може да се обясни с необходимостта от прилагане на комбинирана терапия при пациенти с по-високи изходни стойности на АН и с тенденцията за увеличаване на кръвното налягане с възрастта. При целенасочено запитване към специалиста, назначил комбинираната терапия, се установи, че мотивът за включване на втори антихипертензивен медикамент е именно втората степен на хипертония. Проучването ACCOMPLISH доказа, че фиксираната медикаментозна комбинация понижава ефективно артериалното налягане до прицелни стойности (< 140/90) при голяма част от пациентите, дори при наличие на диабет тип 2 и/или напреднала възраст (с предимство на комбинацията АСЕ инхибитор + Amlodipine пред комбиниране с диуретик) (184). В 7-мия доклад на *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of Blood Pressure* (JNC 7) се препоръчва антихипертензивната терапия да започне с комбинирана медикация на базата на 2 медикамента при стойности, надвишаващи съответно с 20 mm Hg нормата за систолното и с 10 mm Hg – нормата за диастолното артериално налягане. Работната група African Americans Working Group предлага по-агресивна антихипертензивна терапия при тези пациенти – стартиране с комбинирана антихипертензивна терапия при повишение с повече от 15 и 10 mmHg съответно за нормата за систолното и диастолното артериално налягане (185). Европейското ръководство за поведение при АХ препоръчва също иницииране на лекарственото лечение с комбинация от две лекарствени средства с изключение на по-възрастни и уязвими пациенти, както и тези с нисък риск и със степен 1 хипертония (при систолно налягане < 150 mm Hg) (3).

Нашият екип си постави за цел да проучи влиянието на серумната концентрация на АСЕ, неговия продукт – ангеотензин II, и други протеини от РААС системата върху хипертензивния контрол на болни с умерена АХ. Установената от нас серумна концентрация на ангиотензин-конвертиращия ензим за разглежданата група от 105 пациенти е по-висока в сравнение с нормотензивните контроли, при това няма статистически значима разлика между групите с добър и лош контрол на кръвното налягане. Предвид вече разгледаната в „Резултати“ понижена концентрация на ангиотензин II (крайния продукт от ензимната реакция) при тези болни можем да направим заключение за добро потискане на ензимната активност от приложения АСЕ инхибитор. Изследваната от нас концентрация засяга серумното ниво на АСЕ и трябва да се има предвид, че в по-голямата си част ензима е тъканен (мембранно-свързан в ендотелните клетки) и не е задължително неговите циркулиращи нива да отразяват активността на локалната му продукция. Освен това предпочетеният от лекуващите лекари АСЕ инхибитор лизиноприл притежава много кратко време на плазмен полуживот и практически липсваща липидоразтворимост (43). Можем да изкажем предположението, че намалената ензимна активност, респективно понижената концентрация на крайния продукт (ангиотензин II), по механизма на отрицателната обратна връзка води до повишена ензима концентрация.

Ренинът и ангиотензиногенът са известни с регулацията си на принципа на обратна връзка (186).Въпреки това ефектът на ангиотензин II върху регулацията на генната експресия на АСЕ и ензимната активност все още не е съвсем проучен. H. Schunkert и съавт. изследват ефектите на екзогенна инфузия на ангиотензин II върху експресията на иРНК (messenger RNA – mRNA) за АСЕ. Обект на експеримента са мъжки плъхове Sprague-Dawley. Установено е, че инфузията на ангиотензин II понижава нивата на иРНК за АСЕ в белите дробове и тестисите (двете основни места за синтеза на ензима). Успоредно с това, макар и по-слабо изразена, се наблюдава понижена активност на белодробния АСЕ, а серумната и тестикуларната ензимна активност са слабо променени (187). Констатираното от авторите отчасти потвърждава предположението ни за регулация по механизма на обратната връзка и следва да е предмет на бъдещи проучвания при човешки популации.

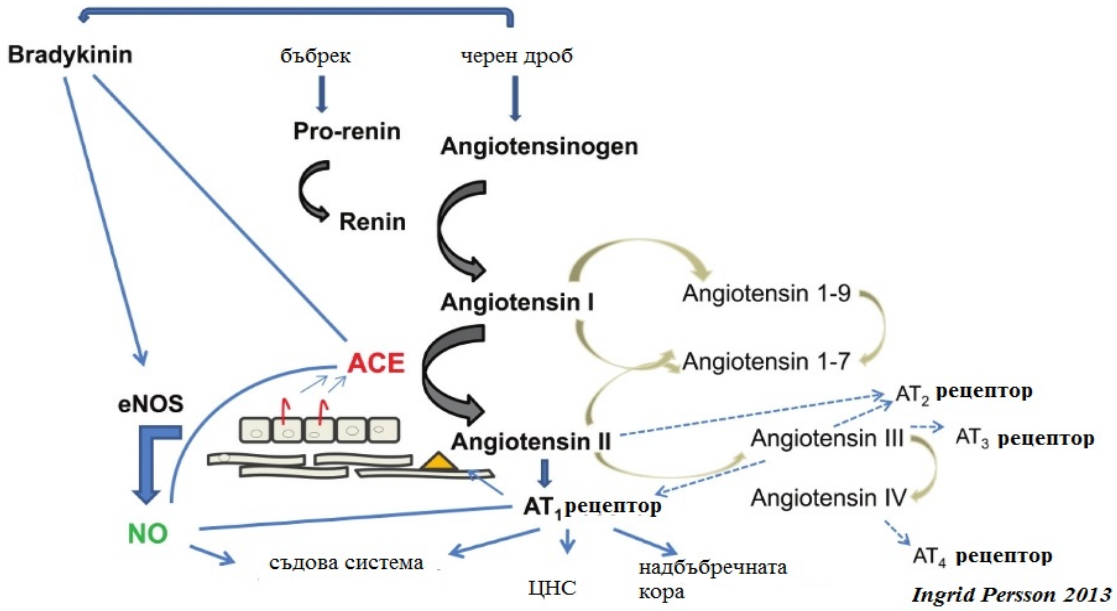
Изказаната от екипа ни хипотеза е потвърдена отчасти чрез съпоставяне с групи болни, лекувани с АРБ (фиг. 28), където високото серумно ниво на ангиотензин II не стимулира свръхпродукция на конвертиращ ензим (т.е. в случая

липсва отрицателната обратна връзка). В присъствието на АРБ, които селективно блокират AT1R, Ang II се свързва с към AT2R и се опосредства вазодилатация по различни молекулни механизми, включващи брадикинин (BK), азотен оксид (NO), и цГМФ (188). При реализиране на ефекторния механизъм, активността и синтеза на ангиотензин-конвертиращия ензим се понижава. В присъствие на ACE инхибитори недостигът на ангиотензин 2 и/или излишъкът на ензимния субстрат ангиотензин 1 индуцират повишен синтез на ACE (189).

Предвид проучваната връзка между оксидативния стрес и повишеното кръвно налягане, се установи слаба позитивна корелация между нивата на ROS и NO със серумните нива на ACE. PAAC оказва голямо влияния върху кръвообращението и някои от взаимодействията ѝ с азотния оксид са познати и описани (19, 191). NO от ендотелните клетки отпуска съдовата гладка мускулатура, намалява тромбоцитната агрегация и неговото понижение се счита като фактор, предразполагащ развитие на сърдечно-съдова патология. Инхибирането на ACE води до повишаване на NO и като резултат – вазодилатация, понижена пролиферация на гладкомускулните клетки. Изследваната от нас група болни е на лечение с лизиноприл, което може да обясни получената слаба позитивна корелация между серумните нива на ACE и азотен оксид. В допълнение множество сърдечно-съдови фактори водят до „разединяване“ на eNOS и ендотелна дисфункция в съдовете, подробно разгледано в „Литературен обзор“ (65). Брадикинините, повишени вследствие на ACE инхибицията, стимулират eNOS, която в състояние на възпаление, нарушение в хомеостазата и редокс-хомеостазата в съдовата система на организма (вследствие на ендотелната дисфункция при АХ), следва да бъде „разединена“. Touyz счита, че „разединената“ NOS стимулира продукцията на ROS по механизъм, който не е свързан със стимулация на съдовата NADPH оксидаза (92). Предполагаме, че този факт е една от вероятните причини за слаба положителна корелация между серумните нива на ACE и ROS.

Що се отнася до ACE2, от откриването на ензима през 2000 г. до днес редица изследователски колективи са фокусирани върху изясняването на физиологичната и патофизиологичната му роля при кардиоваскуларни заболявания. Предишни проучвания върху експериментални животински модели на артериална хипертония, както и при човешката популация, показват значимостта на ACE2 за патогенезата на АХ и сърдечна недостатъчност (192, 193). Установените по-високи нива на серумен ACE2 при изследваните от нас пациенти с АХ

са в съответствие с тези предходни проучвания. В допълнение, нашето проучване показва значимо повишение на серумния ACE2 при пациенти на монотерапия с ACE инхибитор с лош контрол на заболяването, за разлика от пациентите на АРБ.



Фиг. 46 Схематичен преглед на системата ренин-ангиотензин, показваща ендотелни клетки, синтезиращи на ангиотензин-конвертиращия ензим (ACE) и азотен оксид (NO). Брадикинините, повишени в следствие на ACE инхибицията стимулират eNOS (191).

ACE2 е предимно мембранно асоцииран протеин и освобождаването му в циркулацията зависи от активността на матриксна металопротеиназа – ADAM17, известна още като TNFα-конвертиращ ензим (TACE). Взаимодействието ангиотензин 2–AT1R медиира p38-MAPK фосфорилирането на TACE и повишава активността на протеазата. Patel и съавт. Доказват, че блокирането на ангиотензин тип 1 рецептора предотвратява освобождаването на ACE2 от мембранно-свързаната му форма в миокарда, което съответно води до повишение на разтворимата форма на ACE2 и вероятно корелира със „загуба“ на ензима в тъканите и неговия протективен локален ефект (194). Предвид алтернативните пътища за получаване на ангиотензин 2, в това число и с участието на изследвания от нас ензим химаза, както и установената силна положителна корелация между нивата на химаза и ангиотензин II само при пациентите с неконтролирана хипертония, можем да предположим, че при резистентност към ACE инхибиторно лечение, ангиотензин 2 медиира освобождаването на ACE2 в плазмата и води до лош локален контрол на РААС системата. При терапия с АРБ, вероят-

но, от една страна, се предотвратява освобождаването на ACE2 в циркулация, а от друга, се медиира активиране на AT2 рецептора.

Наблюдаваният процент на пациенти с неконтролирана хипертония (37%) в нашата изследвана група е сходен с този съобщен по-рано от други автори (50). Данните демонстрират добра ACE инхибиция при двете наблюдавани подгрупи пациенти (отчетено по понижението нивото на крайния продукт на ензимната реакция – ангиотензин II). Вероятно е лошият хипертензивен контрол при част от болните да не е следствие от неефективност на лекарствената терапия, а да се дължи на влиянието на друг фактор извън ренин-ангиотензиновата система.

За разлика от циркулиращата РААС, при локалната има алтернативни ензими – химаза, тонин и катепсин G, превръщащи ангиотензин I в ангиотензин II. Сред тях основно място заема ензимът химаза, открит в сърцето и бъбреците. Ензимът е съхраняван в макромолекулни комплекси с хепарин в секреторните гранули на мастоцитите (45). След освобождаване от гранулите комплексът става ензимно активен, напр. при съдово увреждане. Химазата е неактивна в нормалната съдова тъкан и може да доведе до продукция на ангиотензин II единствено в атеросклеротично променени или увредени артериални стени. Според някои автори значението на химазата е по-голямо in vitro, в сравнение с in vivo. Въпреки противоречивите мнения, в ерата на преките антагонисти на ангиотензин II, алтернативните пътища на образуването му и възможностите за повлияването им продължават да будят интерес. Доказано е, че инхибиторите на химазата потискат възпалителния процес, формирането на фиброза и колаген и образуването на тъканен ангиотензин II, подобрявайки дисфункцията на лявата камера на сърцето (186). Задача на настоящият труд бе да изследва системното ниво на химаза сред пациенти с АХ на терапия с ACE инхибитор.

Различните органи в различни видове имат уникални профили по отношение на пътищата на образуване на ангиотензин II. При хора химаза-зависимото ангиотензин II образуване преобладава в белия дроб, аортата и сърцето (2). За разлика от сърцето на плъх, основният (80%) компонент на ангиотензин II образуваща активност в левия вентрикул се дължи на човешка химаза (195). Много изследвания предполагат, че химаза-зависимото ангиотензин II образуване, като голям молекулярен механизъм, е отговорно за неефективността на терапията с ACE инхибитори. C. Company и сътр. установяват, че in vivo ангиотензин II се получава предимно от ACE при алкални условия, но при възпалителни

състояния освобождаването на мастоцитна химаза увеличава локалните концентрации на ангиотензин II. Последното дава основание на авторите да предпочитат употребата на AT 1 рецепторни антагонисти пред ACE инхибитори за лечение на ангиотензин II медиирано васкуларно възпаление (190), което също не предоставя разрешение на разглеждания проблем. Проведено е cross-over проучване, сравняващо ефектите на ACE инхибиторите и ARB, приложени самостоятелно. Установено е, че 18% от пациентите имат добър антихипертензивен контрол при лечение с ACE инхибитор, но не и при терапия с ARB, а 15% от пациентите отговарят на лечение с ARB, но не и на ACE инхибитори (196). Следователно при повече от 1/3 от болните антихипертензивният отговор към едната група медикаменти не може да предскаже отговора към другата и обратно. Това води до концентриране на усилията на водещи изследователи в посока на разбиране и преодоляване на терапевтичната резистентност, наблюдавана при ACE инхибиция.

K. Arakawa и H. Urata считат, че химазата не участва във функционалното регулиране на кръвното налягане в краткосрочен план, но се натрупват доказателства, че може да бъде включена в структурно ремоделиране на сърдечносъдовата система. Авторите акцентират върху действието на протеазата не само като генератор на ангиотензин II, но и като активатор на трансформиращ растежен фактор-бета, основен стимулатор на миокардната фиброза (197). H. Kanemitsu и др. в изследване на плъхове установяват, че патологичното формиране на химаза-зависим трансформиращ растежен фактор-бета може да играе важна роля в миокардната фиброза и сърдечна дисфункция след инфаркт на миокарда (198).

Проучвания на Y. Uehara и др. върху хамстери предполагат, че артериалната химаза може да участва в ускорено отлагане на липидите по стените на артериите, изложени на висок плазмен холестерол и инхибирането на ензима може да забави прогресирането на атеросклерозата. Авторите предполагат, че от своя страна високият серумен холестерол може да предизвика повишение на химазата и улеснение в развитието на атеросклеротичния процес (199). Изказаната хипотеза е в основата на поставената от нашия колектив цел – изследване на корелацията на системното ниво на химазата с липопротеиновия профил.

Както бе упоменато, химазата е тъканен ензим с приоритетно по-висока концентрация в някой човешки тъкани (сърце, аорта, бял дроб). Като продукт на

мастоцитна дегранулация, предположихме известно (макар и ниско) серумно съдържания на химаза. При разглеждане на трудовете на други автори (2) човешки тъканни проби (включително сърце, аорта и бял дроб) са получавани от рутинната аутопсия в Катедра по патология в Университетска болница Fukuoka, като са изключени сърдечни проби от пациенти, починали от остър миокарден инфаркт. Поради неудобството на настоящия метод за поставената от нас цел – ефект от лечение с АСЕ инхибитор на пациенти с първи до втори стадий АХ, без значими придружаващи заболявания, решихме да отчетем серумната концентрация на химазата чрез високочувствителен метод – ELISA. В достъпната ни научна литература към момента липсват данни за подобни проучвания. Една от нашите задачи беше да установим дали определяне на серумните нива на химаза имат потенциал да се използват като биомаркер за оценка на ефективността на АСЕ инхибиторната терапия при АХ. Предвид това, се насочихме към серума, като биологичен материал, който е лесно достъпен, рутинно използван в клиничната практика и получаван чрез минимално инвазивен подход.

Нашето изследване показа значително повишени нива на химаза при хипертоници в сравнение със здрави контроли. Увеличението на серумната химаза повече от 10 пъти при болните подкрепя ролята на ензима в патофизиологията на заболяването и отчасти съответства на други изследвания, показващи значителното повишаване на тъканната химаза при различни сърдечно-съдови заболявания (199). Общата група проучвани пациенти бе разделена на две подгрупи в зависимост от отговора към терапията с незначителна разлика в отчетеното ниво на протеазата помежду им. На пръв поглед получените резултати представят химазата като незначим фактор в контрола на кръвното налягане при АСЕ инхибиция с лизиноприл. При проведения логистичен регресионен анализ на пациентите с хипертония в зависимост от хипертензивния контрол и референтни стойности на химаза и АСЕ (табл. 22 „Резултати“) бе установено, че високите серумни нива на химаза се асоциират с над 6 пъти по-висок риск за лош контрол на хипертонията при терапия с Лизиноприл. Тези наши изследвания подкрепят изказаната по-рано хипотеза от някои автори (190) за химаза-зависимо ангиотензин II образуване като молекулярен механизъм, отговорен за неефективност на терапията с АСЕ инхибитори.

Също така установихме позитивна корелация между нивата на химаза и ангиотензин 2 и обратна между серумните нива на АСЕ и ангиотензин 2 при пациенти с неконтролирана хипертония, за разлика от пациентите с добър контрол на АХ. Тези резултати насочват към заключението, че химазата има значение за АСЕ инхибиторната резистентност и лошия терапевтичен ефект на

АСЕ инхибитори, в частност на лизиноприл. Трябва да се отбележи също, че приложението на серумните нива на химаза като маркер за терапевтичния отговор към АСЕ инхибитори се характеризира с твърде ниска специфичност (57.9%), което прави този анализ неподходящ. Този резултат може да се обясни с факта, че мастоцитите са тъканни, локални клетки на имунната система, чиято дегранулация се индуцира от различни стимули и са ангажирани в механизмите на вродения и придобит имунитет, включително възпалителни и алергични реакции. Може да се предположи, че локалните нива на химаза и ензимна активност имат по-голям потенциал да се използват като маркер за терапевтичен отговор към АСЕ инхибитори, но това е свързано със значително по-инвазивен подход към пациентите. Настоящият анализ се основава на изследвания на малка група пациенти (11 са пациентите с лош медикаментозен хипертензивен контрол), което е важен лимитиращ фактор и трябва да се има предвид при интерпретирането на резултатите.

Неконтролираната АХ, високите нива на LDL холестерола и тютюнопушенето са трите важни рискови фактора за сърдечно-съдови заболявания и инсулт . Проучвания върху хамстери предполагат, че артериалната химаза може да участва в ускорено отлагане на липидите по стените на артериите , изложени на висок плазмен холестерол и инхибирането на ензима може да забави прогресирането на атеросклерозата. Uehara et al. предполагат, че от своя страна високият серумен холестерол може да предизвика повишение на химазата и улеснение в развитието на атеросклеротичния процес (199). Изказаната хипотеза е в основата на поставената от нашия колектив задача – изследване на корелацията на системното ниво на химазата и липопротеиновия профил. С изключение на слабо положителната корелация между химазата и общия холестерол при пациентите с АХ, не установихме друга значима корелация между серумните нива на протеазата и изследваните параметри на липидния профил. Получените от нас резултати са в съответствие с предишни проучвания (201). Murakami, K. и съавтори експериментално установяват положителна корелация между химазата в мононуклеарните клетки от периферната и серумния общ холестерол ($p < 0.05$). Изследванията на Uehara и др. (2000 г.) показват, че концентрацията на серумния общ холестерол и концентрацията на LDL холестерола значително корелират с химазната активност в хомогенати от човешка гръдна артерия (200). Нашето изследване показва по-слаба връзка между количествата на химазата и общия холестерол в серума и не изследва химазната ен-

зимна активност. Предполагаме, че е възможно усилване на наблюдаваните корелации при обхващане на по-голяма група пациенти.

3. ACE I/D ПОЛИМОРФИЗЪМ ПРИ ПАЦИЕНТИ И КОНТРОЛИ

Анализи на генетични връзки и изследвания за асоцииране на кандидат-гени сочат, че различни локуси и гени имат отношение в предразположението към артериална хипертония. Въпреки това гените, които са в основата на предразположението към това заболяване не са докрай проучени. Понеже ренин-ангиотензин-алдостероновата система е най-важният механизъм за контрол на кръвното налягане в организма ни, гените, кодиращи компоненти на тази система, са основните кандидат-гени за изследване на генетичната основа на хипертонията (вж. табл. 5).

L. Ji и съавт. провеждат проучване, обхващащо 905 хипертоници и 905 нормотензивни контроли и имащо за цел изследване на връзката между полиморфизмите в гените на РААС и есенциалната хипертония, както и взаимодействията между единичните нуклеотидни полиморфизми и негенетични фактори (общ холестерол, триглицериди и индекс на телесна маса). Резултатите сочат, че серумните нива на общия холестерол и триглицеридите и индексът на телесна маса са значително по-високи в групата с хипертония, отколкото в контролната група. От 41 изследвани между единични нуклеотидни полиморфизми генотипи rs3789678 и rs2493132 в рамките на AGT, rs4305 в рамките на ACE, rs275645 в рамките на AGTR1, rs3802230 и rs10086846 в рамките на CYP11B2 се свързват с хипертония при китайската общност (17).

Gunda Padma и съавт. изследват единични нуклеотидни полиморфизми в AGT гена и връзката им с есенциална хипертония в индийската популация. Изследването върху 202 пациенти с АХ и 222 нормотоници е първото, което съобщава за защитната роля на g.5855G> полиморфизъм в развитието на есенциална хипертония, като отбелязват възможността за етнически вариации (202).

Rigat et al (1990) идентифицират инсерционно-делеционен (I/D) полиморфизъм в ACE гена и представят неговата функционална значимост, като асоциират високата серумна концентрация с носителството на хомозиготния генотип по делецията (DD-генотип). Предвид ензимната активност на ACE като основен продусер на вазоактивния ангиотензин 2 редица проучвания се фокусират върху проучване ролята на I/D полиморфизъм в ACE в различни сърдечно-съдови заболявания при човек (44).

През 1998 г. две независими проучвания съобщават за връзка между локуса на гена за ACE и хипертонията. O'Donnell et al. проследяват повече от 3000 участници от Фрамингамското проучване и установяват асоциация между алела D и диастолното артериално налягане при мъже, но не и при жени. В голямо проучване Fornage et al. по подобен начин показват връзка между региона на хромозома 17 при мъже (който съдържа локуса за гена на ACE) и АХ. Това са първите големи, проспективни проучвания, които изследват ролята на гена за ACE за развитието на хипертонията и резултатите от тях възвърнаха интереса към гена за ACE. Въпреки че е възможно наблюдаваните резултати да се дължат на друг ген, разположен в близост до локуса на гена за ACE, ролята за регулацията на АН е потвърдена и от наблюденията, че генът за ACE сам по себе си има отношение към вариабилитета на артериалното налягане при мъже. Механизмът, по който генът за ACE повлиява артериалното налягане в зависимост от пола, не е изяснен (16).

Генът, кодиращ ACE, е локализиран върху хромозома 17. Той се характеризира с инсерция-делеция (ID) полиморфизъм в интрон 16, определящ наличието на три генотипа (II, DD и ID) и 47% фенотипна вариация в нивото на серумния ACE (Rigat et al., 1990). Водещи автори считат, че алелът D на ID полиморфизма е асоцииран с по-високи нива на ACE и алдостерон, повишено разграждане на брадикинина, увеличен риск за АХ, хипертрофия на лявата камера (ХЛК), атеросклероза и нефропатия (203; 19). Генотипът II предпазва от развитието на диабетна нефропатия, вероятно защото е асоцииран с по-слаба активност на ACE и по-ниска глюкозоиндуцирана гломерулна хиперфилтрация (204). Генотипът II детерминира понижаване на трансформиращия растежен фактор-бета1 (TGF-β1) при терапия с ARB, което подчертава ролята на терапевтичния избор в зависимост от генотипа на пациента (205).

В проведеното от нас изследване на генотипното разпределение на ACE полиморфизма при пациенти с АХ е сходно с това съобщено при други популации от кавказката раса, за които честота на D-алелът е представен в диапазон от 51% до 64%. Установената от нас алелна честота (0.58/0.42 за D/I-алелите, съответно) е еднаква с тази, съобщена при проучвания от Финландия и Уелс (206). Установените генотипни и алелни честоти в изследваната група АХ пациенти бяха сходни на тези установени при здрави лица ($p = 0.857$ и $p = 0.762$, съответно). Този резултат насочва към извода, че I/D полиморфизъм в ACE гена няма значим ефект за генетичното предразположение към АХ за българската популация. Получените от нас резултати съвпадат с резултатите на някои автори, провели аналогични проучвания (207; 208; 209; 26; 190; 210; 211; 212, вж. табл. 6). Предвид поставена цел на настоящия дисертационен труд анализите ни бяха фокусирани върху подгрупите пациенти, раз-

делени в зависимост от пола и контрола на АХ, за да се оцени влиянието на генетичните фактори върху терапевтичния отговор към АСЕ инхибиторно лечение.

В нашето проучване не установихме значима разлика в генотипната или алелната честота на изследвания полиморфизъм сред мъжете и жени с АХ. Наблюдава се незначително по-висока честота на D-алела и DD-генотип при мъже с АХ в сравнение с жените, без да се достига до статистическа значимост. Подобна зависимост е наблюдавана по-рано и от други автори (O'Donnell et al.1998), поради което разглежданата връзка, следва да бъде обект на бъдещи проучвания. D-алелът също така се асоциира с артериална хипертония и затлъстяване при момчета, но не и при момичета на възраст между 7-16 години със смесен етнически произход от бразилска популация (213). Протективната роля на генотипи, носители на I-алел, и повишеният риск при носителство на DD-генотип по отношение на артериалната хипертония също са представени при проучвания на други, значимо отдалечени от българската популации, като мъже от южна Индия (214), както и при някои националности от китайската раса (188).

Изследвания на К. Мокретар показват значителна асоциация на D-алела (в хетерозигоетен или хомозиготен генотип) с появата на ОКС . Авторката изказва предположението, че констатираното се дължи на високите плазмени нива на АСЕ, свързани с носителството на D-алел, което повишава кръвното налягане и съответно рискът от ОКС. Нашият колектив предлога възможността повишеният риск от остър коронарен синдром при носителите на D-алела да е свързана с по-високата честота на мъжкия пол (215).

Резултатите от проведените изследвания сочат, че при пациентите с неконтролирана хипертония се наблюдава тенденция за по-висока честота на генотипи, съдържащи I-алел (II + ID), докато DD-генотип е с по-висока честота сред пациентите с контролирана АХ. Носителството на генотип, съдържащ I-алел (II + ID), се асоциира с лош АСЕ инхибиторен контрол на хипертонията и близо 2 пъти по-висок риск от неконтролирана АХ както при мъжете, така и при жените, но без да достига до статистическа значимост. N. Seki et al. считат, че полиморфизмът II детерминира понижаване на трансформиращия растежен фактор-бета1 (TGF-β1) при терапия с ARB (205). Тези становища насочват към АРБ като терапевтичен избор при индивиди с II генотип. Връзката между генотип II и кръвното налягане е предположена и от други автори (216), без да се дискутира отношението към хипертензивния контрол.

Известно е, че инсерция/делеция в интрон 16 на локуса за АСЕ е свързана с промяна на плазменото ниво на АСЕ и активността на ензима при човек. Лица, хомозиготни по делецията (генотип-DD), имат около 2 пъти по-висока ензимна активност от хомозиготите по отношение на инсерцията (генотип-II) (16). Този факт бе

потвърден и при нашите изследвания. При пациенти с АХ генотип-DD е асоцииран с най-високи серумни нива на АСЕ ензима, следвани от тези при генотип-ID, а най-ниски бяха при II-генотип, в групата на нормотензивните контроли се наблюдава същата зависимост генотип/серумно ниво на АСЕ. Предвид това е логично да се предположи, че високата концентрация на АСЕ, кодирана от DD-генотипа, би довела до по-високи нива на ангиотензин 2 и съответно е потенциален генетичен рисков фактор за артериална хипертония. Така представеното предположение не се потвърди и при нашите проучвания, имайки предвид както генотипното разпределение на изследвания полиморфизъм, така и количеството на формирания ангиотензин 2 при АХ пациенти с различен генотип по I/D полиморфизма в АСЕ гена. Серумните концентрации на вазоактивния ангиотензин 2 бяха сходни между трите генотипа. При полигенни, комплексни заболявания като артериалната хипертония, редица фактори – генетични и негенетични, имат съществено значение за етиологията им. Предвид това не е изненадващ фактът, че значението на I/D АСЕ полиморфизма като рисков фактор за генетичното предразположение към артериалната хипертония при различни етнически, полови и възрастови групи е все още актуален въпрос. Въз основа на нашите данни можем да обобщим, че генотипното разпределение на I/D полиморфизма в АСЕ гена при АХ пациенти от българската популация е сходно на докладваното за други европейски полулации, не се наблюдават значими полови различия и въпреки че генотип-DD е асоцииран с най-високи серумни нива на АСЕ ензима, не може да бъде приет като генетичен рисков фактор за АХ.

Установените различни нива на АСЕ при трите генотипа и сходните концентрации на ензимния продукт ангиотензин II насочват към алтернативни пътища за получаване на вазоактивния пептид. В съответствие с това беше направено асоциативно проучване между носителството на генотипи от I/D АСЕ полиморфизма и нивата на ензима химаза. Предположихме, че АСЕ полиморфизмът може да проявява индиректен функционално свързан ефект върху серумните нива на химаза като ключов ензим в алтернативен път за синтез на вазоактивния ангиотензин II. При проведения асоциативен анализ беше включена представителна група от пациенти от мъжки пол на монотерапия с АСЕ инхибитор, с генотипно разпределение сходно на това в общата група от АХ пациенти. Наблюдавахме по-високи серумни нива на химаза при пациентите с генотип II в сравнение с DD и ID, както и тенденция за по-висока честота на генотип-II при лицата с високи нива на химаза и ниски нива на АСЕ в сравнение с DD-генотип и ID-генотип. В допълнение, при пациентите с неконтролирана хипертония се наблюдава по-висока честота на генотипи, съдържащи I-алел (II+ID), докато DD-генотип бе с по-висока честота сред пациентите с контролирана АХ. Носителството на генотип, съдържащ I-алел (II + ID), се асоциира

с лош АСЕ инхибиторен контрол на хипертонията и близо 2 пъти по-висок риск от неконтролирана АХ както при мъжете, така и при жените, но без да достига до статистическа значимост. Предвид тези данни, както и значимата корелация между серумните нива на химаза и ангиотензин 2, наблюдавана само при пациенти с лош контрол на АН, можем да предположим, че лошият контрол на АХ се дължи основно на ангиотензин-II, продуциран от химаза (АСЕ независим път), като носителството на ниско продуциращия АСЕ генотип допринасят за неефективен контрол при АСЕ инхибиторна терапия. В достъпната научна литература не намерихме предходни асоциативни проучвания между I/D полиморфизма и количествата на серумна или тъканна химаза. Предвид това, както и поради лимитирания брой изследвани пациенти, тези наши данни следва да се приемат като предварителни и да се потвърдят или отхвърлят в по-мащабно проучване. Трябва да се отбележи също, че в гена, кодиращ химаза, също са установени генни полиморфизми, сочени като потенциални за есенциална хипертония (164). Унаследяването на комбинация/хаплотип от генни полиморфизми в АСЕ, химаза и други РАС протеини би могла да изясни установената от нас взаимовръзка.

Значението на I/D полиморфизма за терапевтичния подход при АХ е също интензивно проучвано, но все още неизяснено. В настоящото проучване ние установихме, че серумните нива на АСЕ при пациенти на монотерапия с АСЕ инхибитор или при комбинация с β-блокер са със сходен профил, като при генотип-DD констатирахме най-високи нива, следвани от хетерозиготния ID генотип и най-ниски при генотип-II. В допълнение не установихме значими разлики между пациенти на монотерапия или на комбинирана терапия с един и същи генотип. Тези резултати са в принципно съответствие с данни, докладвани от H. Schelleman и съавт. (217). Те считат, че I/D АСЕ полиморфизмът не е модификатор на систолното и диастолното кръвно налягане при терапия с диуретик, бета-блокер, калциев-антагонист или АСЕ инхибитор. Трябва да отбележим също, че при пациенти на монотерапия или комбинирана терапия средните нива на АСЕ ензима с генотип-DD са по-високи от тези при нормотензивните контроли със същия генотип. За разлика от тях при пациенти на ARB, установихме серумни нива на АСЕ сходни нивата на контролната група и при трита генотипа, дори и при високопродуциращия генотип-DD. Генотипите DD и ID при тази подгрупа пациенти се асоциират със сходни серумни нива на ензима, значимо по-високи от тези при генотип-II.

Можем да предположим, че разликата в серумните ензимни нива се дължи на различното ниво на блокирането на РААС. Вероятно при пациентите на терапия с ARB високите нива на ангиотензин II по механизма на отрицателната обратна връзка намаляват нивото на ензимния субстрат – ангиотензин I. При пациентите, леку-

вани с лизиноприл, подобна тенденция не може да бъде наблюдавана. При болните с добавен β-блокер към терапията имаме допълнително потискане на РААС на ниво ренална-ренинова синтеза. Въз основа на тези резултати, предполагаме подобър антихипертензивен контрол на пациенти с DD-генотип при терапия с АРБ в сравнение с монотерапия с АСЕ инхибитор или комбинирана терапия. Друго потенциално решение на неефективния антихипертензивен контрол при монотерапия с АСЕ инхибитор, би могло да е съобразяването на прилаганата доза или терапевтична схема с генотипа на пациента по I/D ACE полиморфизмът. При пациенти с DD генотип, кодиращ най-високи нива на АСЕ, може да се предложи по-висока доза или по-често приложение на АСЕ инхибиторна терапия. Подобна фармакогенетична насока на терапията с цел ренопротекция при диабетна нефропатия е също предствена, като се предполага, че при пациенти с генотип DD терапията с АСЕ инхибитори може да не ефективна, и това взаимодействие може да се неутрализира чрез третиране с АРБ или ултрависоки дози на АСЕ инхибитори (218). Установените зависимости между генотипа по I/D полиморфизма и терапевтичната ефикасност на антихипертензивните медикаменти могат да се представят чрез следната схема:

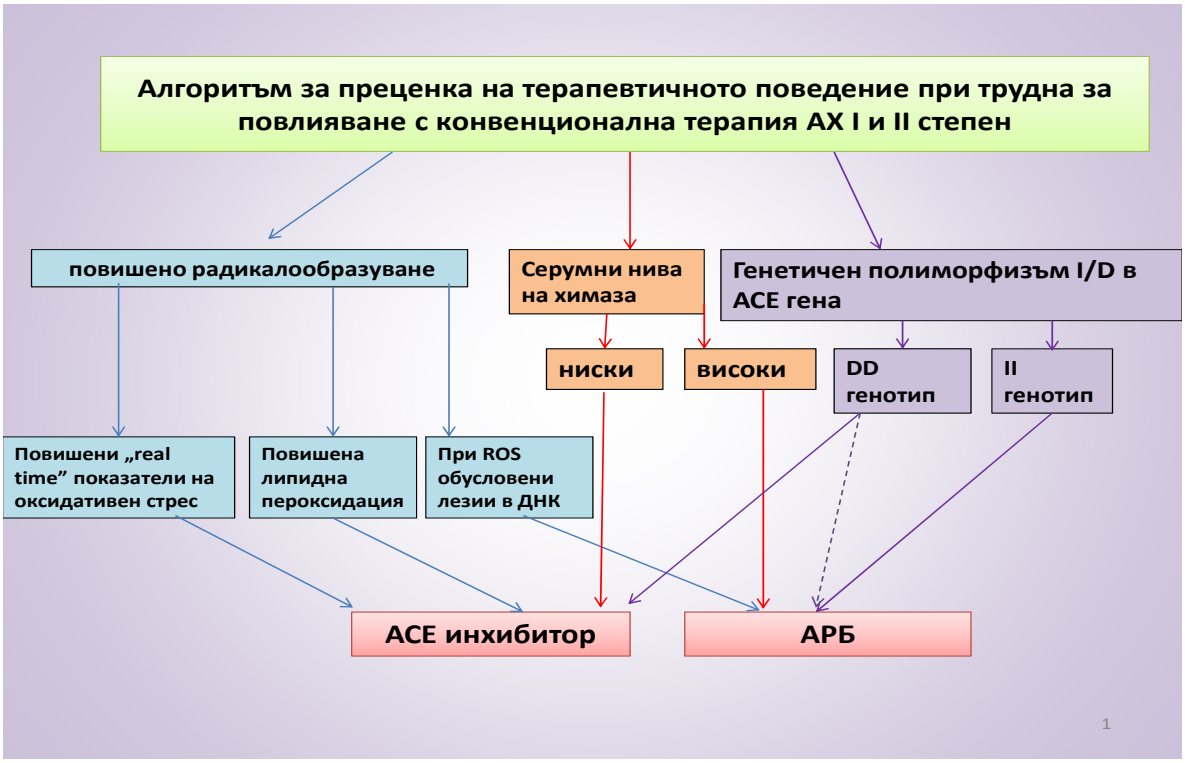
II генотип = ниско ACE ⇒ висока химаза ⇒ не добър контрол на АХ с ACE инхибитори
DD генотип=високо ACE ⇒ по-добър контрол на АХ с ARB

ОБОБЩЕНИЕ

Многофакторната етиопатогенеза на есенциалната хипертония води до колебания относно прилагането на успешна терапевтична стратегия и редица незадоволителни клинични резултати. Познаването на молекулните механизми на атерогенезата, увреждащото действие на рисковите фактори, фармакокинетиката и фармакодинамиката на антихипертензивните средства в съответствие с полови, расови и генетични особености на индивида и фармакоикономиката в световен мащаб водят до по-добри терапевтични резултати. Постигнатите резултати понастоящем са незадоволителни, а прогнозите са за задълбочаване мащабността на проблема. Предвид сериозността и глобалността на заболяването усилията ни са насочени в посока пълно изясняване на патогенетичните механизми и фармакологично въздействие спрямо индивидуалните особеност на пациента, без да се пренебрегва ключовата роля на първичната профилактика. В настоящия труд потвърдихме повишеното радикалообразуване при пациенти с есенциална хипертония и възможната им роля в патофизиологията на

заболяването. Проучването ни показа известно предимство при лечение с АСЕ инхибитори по отношение на липидната пероксидация и на АРБ по отношение увреждането на ДНК. Отчетени са по-високи серумни нива на химаза при пациентите спрямо нормотензивните контроли и възможната ѝ патогенетична роля в атерогенезата, но участието на протеазата в хипертензивния контрол е дискутабилно. Оцени се влиянието на генетичните фактори върху терапевтичната стратегия и в частност на I/D полиморфизма в гена, кодиращ АСЕ. Изследването ни отхвърля значението му като генетичен фактор, повлияващ генетичното предразположение към АХ в българската популация, но резултатите ни насочват към АРБ като терапевтичен избор при индивиди с DD-генотип.

В обобщение на получените резултати нашият екип предлага следния практичен алгоритъм за преценка на терапевтичното поведение при трудна за повлияване с конвенционална терапия АХ I и II степен:



Фиг. 47. Алгоритъм за преценка на терапевтичното поведение при трудна за повлияване с конвенционална терапия АХ I и II степен

VII. ИЗВОДИ

1. Установено е повишено радикалообразуване при пациенти с есенциална хипертония и ролята му в патофизиологията на заболяването.

2. Терапевтично предимство при лечение на есенциална хипертония ,по отношение „real time" показателите на оксидативен стрес и процеса на липидна пероксидация, има приложението на АСЕ инхибитор пред АРБ .

3. По отношение увреждането на ДНК най-изразен протективен ефект има монотерапията на АХ с АРБ.

4. При болни с АХ, на лечение с АСЕ инхибитор, серумната концентрация на химаза е в пъти по-висока, сравнено със здрави нормотензивни контроли и корелира с повишението на общия холестерол.

5. Високите серумни нива на химаза се асоциират с над 6 пъти по-висок риск за лош контрол на хипертонията при терапия с АСЕ инхибитора лизиноприл .

6. Серумните нива на ангиотензин-конвертиращ ензим при хипертоници на лечение с АСЕ инхибитор са по-високи в сравнение с нормотензивните контроли, без разлика между групите с добър и лош контрол на кръвното налягане.

7. Носителството на генотип, съдържащ I-алел (II + ID), се асоциира с лош АСЕ инхибиторен контрол на хипертонията и близо 2 пъти по-висок риск от неконтролирана АХ както при мъжете, така и при жените.

8. При пациенти с АХ генотип-DD е асоцииран с най-високи серумни нива на АСЕ ензима, а генотип II с най-високи серумни нива на химаза.

9. Серумни нива на АСЕ2 са значимо повишени при АХ пациенти с лош контрол на хипертензията при монотерапия с АСЕ инхибитор.

VIII. ПРИНОСИ

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. За първи път в България се доказва предимство при лечение с АСЕ инхибитори по отношение на липидната пероксидация и благоприятен ефект при лечение с АРБ по отношение увреждането на ДНК.

2. За пръв път е изследвано серумно ниво на ензима химаза при пациенти с АХ и е установена силна положителна корелация между нивата на химаза и ангиотензин II при пациенти с неконтролирана хипертония.

3. Показана е функционална връзка между генотип-фенотип по отношение на I/D полиморфизма в АСЕ гена, като са констатирани по-високи серумни нива на химаза при пациенти с генотип II (нископродуциращ АСЕ генотип).

4. Предложен е практически алгоритъм за преценка на терапевтичното поведение при трудна за повлияване с конвенционална терапия АХ I и II степен.

ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

1. Потвърдена е връзката между оксидативен стрес и АХ, както и участието на радикалообразуването в нейната етиопатогенеза.

2. При пациенти с АХ генотип-DD се асоциира с най-високи серумни нива на АСЕ ензима, следвани от тези при генотип-ID, а най-ниски при II-генотип.

3. Установените генотипни и алелни честоти на I/D полиморфизма в АСЕ гена в изследваната група пациенти с АХ са сходни с установените и при други европейски популации, без значима полово обусловена разлика.

4. Потвърдено е участието на АСЕ2 – хомолог и естествен антагонист на АСЕ, в патогенезата на есенциалната хипертония при хора

IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

1. ***Hristova M.***, G. Nikolova, Y. Karamalakova, D. Komsiiska, M. Penev, V. Gadjeva. Oxidative modifications caused by free radicals in hypertension. Bulgarian Chemical Communications, 2019, 51 (special issue A): 58-62. **IF 0.238**.

2. ***Hristova M***, Stanilova S, Miteva L. Serum concentration of renin-angiotensin system components with respect to I/D ACE polymorphism and response to therapy in essential hypertension. Clin Exp Hypertens. 2019; 41(7): 662-669. doi: 10.1080/10641963.2018.1529782. Epub 2018 Oct 11. **Impact Factor 1.367**

3. Komsiyska D., Penev M, Petrov D, ***Hristova M***. The role of anxiolitics in the treatment of patients with arterial hypertension accompanied by anxiety disorders, - Trakia Journal of Sciences, 2015, 13 (Suppl. 2): 131-135.

4. ***Hristova M***, Penev M, Stanilova S, Miteva L. Preliminary study of the serum chymase levels in patients with arterial hypertension. Trakia Journal of Sciences, 2015, 13 (Suppl. 2): 160-165,

5. ***Hristova M.***, M. Penev, L Miteva The effect of ACE-inhibitor therapy on serum level of angiotensin II. J. BioSci. Biotechnol. 2015, SE/ONLINE: 45-47.

6. ***Hristova M.***, M. Penev. Oxidative stress and cardiovascular diseases. Trakia Journal of Sciences, 2014,12 (3): 300-307.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ

1. Международен конгрес по медицински науки – ICMS 07 и 10 май 2015 Медицински университет – София “Oxidative stress parameters in patients with arterial hypertension” – ***M. Hristova***, G. Nikolova, M. Penev, V. Gadjeva and A. Zheleva – участие с постер

2. Юбилейната научна конференция "20 години Тракийски университет", 19-20 май 2015 г., Стара Загора. “The role of anxiolitics in the treatment of patients with arterial hypertension accompanied by anxiety disorders” – ***Hristova M.***, Penev M., Komsiyska D, Petrov D. – участие с постер

3. Юбилейната научна конференция "20 години Тракийски университет", 19-20 май 2015г. гр. Стара Загора “Preliminary study of the serum chymase levels in patients with arterial hypertension” – ***Hristova M.***, Penev M., Stanilova S., Miteva L., Petrov D. – участие с постер

4 Втора национална конференция за млади учени: “Биологически науки за по-добро бъдеще" 30-31.10.2015, Биологически факултет на Пловдивския университет “Паисий Хилендарски” – „The effect of ACE-inhibitor therapy on serum level of angiotensin II” – ***Hristova, M.,*** M. Penev, L. Miteva – участие с постер

5. XVth International Congress of Medical Sciences for students and young doctors 13-15.05.2016, Sofia, Bulgaria – участие с постер

6. 2nd International Conference on Bio-antioxidants (BIO-ANTIOXIDANTS 2018) - “Study on selected indicators of oxidative stress and antioxidant status in patients with arterial hypertension” – ***Hristova M***., G. Nikolova, Y. Karamalakova, M. Penev, V. Gadjeva – участие с постер

2.7. 8^{-TH} BULGARIAN PEPTIDE SYMPOSIUM with international participation-8/10.06.2018г. ***M. Hristova***, M. Penev, L. Miteva: “Comparative study of the effect on the serum level of ACE and ACE2 of a synthetically produced peptide derivative - lisinopril and a non-peptide triazole derivative valsartan” – участие с постер

2.8. 8^{-TH} BULGARIAN PEPTIDE SYMPOSIUM with international participation 8-10.06.2018 г. G. Nikolova, ***M. Hristova***, Y. Karamalakova, M. Penev, V. Gadjeva: “The influence of synthetically made lisinopril peptide derivate for oxydative changes induced by hypertension” – участие с постер

X. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Chow ,C.K., Teo, K.K., Rangarajan, S., et al. PURE (Prospective Urban Rural Epidemiology) Study investigators. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. JAMA, 2013, 310(9): 959-968.
2. Akasu, M., Urata, H., Kinoshita, A. et al. Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro. Hypertension, 1998, 32(3):514-20.
3. Mancia G., Fagard R., Narkiewicz,K. et al.; 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2013 Jul; 34(28):2159-219.
4. Danaei, G., Finucane, M.M. et al. , National, regional, and global trends in systolic blood pressure since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 786 country-years and 5·4 million participants. Lancet. 2011 Feb 12, 377 (9765): 568-577.
5. World Health Organization. Health statistics and information systems , Global Health Observatory (GHO)-Raised blood pressure-Situation and trends 2014 , Noncommunicable diseases- Risk factors Blood pressure- Mean systolic blood pressure trends.
6. Franklin S.S., Jacobs M.J., Wong N.D., et al. Predominance of isolated systolic hypertension among middle-aged and elderly US hypertensives: analysis based on National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III. , Hypertension , 2001, 37(3):869-74.
7. Staessen, J., Amery, A., Fagard,R. Isolated systolic hypertension in the elderly. J Hypertens, 1990, 9:393-405.
8. Георгиев, Б., Караславова-Доброджалийска, Е. Г., Гочева, Н. Артериална хипертония – познаване на препоръките и контрол на артериалното налягане в клиничната практика, Наука Кардиология, 2012, (2): 53-70.
10. Василевски, Н., Г. Цолова, П. Димитров, А. Манолова. Изследване на факторите на риска за хронични неинфекциозни болести сред население на възраст 25-64 г. в зоните на програма СИНДИ, 2007, Българско списание за обществено здраве 2010 , том 2, 3(2).
11. Narkiewicz, К., Grassi, G., Mancia, G., Hender, T. The sympathetic nervous system and cardiovascular disease. Via Medica, 2008.

12. EUROASPIRE. A European Society of Cardiology survey of secondary prevention of coronary heart disease: principal results. EUROASPIRE Study Group. European Action on Secondary Prevention through Intervention to Reduce Events., Eur Heart J. 1997 Oct, 18(10):1569-1582.
13. Shih,P.A., O'Connor, D.T. Hereditary determinants of human hypertension: strategies in the setting of genetic complexity, Hypertension, 2008 Jun, 51 (6): 1456-1464.
14. Wang, N.Y., Young, J.H., Meoni, L.A et al. Blood pressure change and risk of hypertension associated with parental hypertension: the Johns Hopkins Precursors Study , Arch Intern Med., 2008 Mar 24, 168(6):643-8.
15. Георгиев, Б.,Захариева, С. Генетика на артериалната хипертония. Моногенни хипертонии. Наука Ендокринология, 2013, (1): 27-32.
16. Георгиев, Б., Трендафилова, Е., Балабански, Т., Гочева, Н. Генетика на артериалната хипертония. Наука Кардиология, 2013, (1):19-20.
17. Sandro Gonçalves de Lima, Hatagima,A., Norma Lucena Cavalcanti L. da Silva, Renin-Angiotensin System: is it Possible to Identify Hypertension Susceptibility Genes?, Arq Bras Cardiol 2007 , 89(6) : 388-394.
18. Petkova, R., Chakarov ,S., Ganev, V. Genetic Bases for Predisposition to Common Multifactorial Disease in Man. Part I., Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2007, 21:3, 286-293.
19. Sayed-Tabatabaei, F.A., Oostra, B.A., Isaacs, A., et al. ACE Polymorphisms, Circulation Research.2006, (98) :1123-1133.
20. Tipnis, S.R., Hooper ,N.M., Hyde, R., et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase., J Biol Chem. 2000, 275(43): 33238-33243.
21. Crackower, M.A., Sarao ,R., Oudit ,G.Y., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function, Nature. 2002, 417(6891): 822-828.
22. Santos, R.A., Ferreira, A.J., Simões E., Silva, A.C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2–angiotensin(1–7)–Mas axis. Exp Physiol, 2008 May, 93(5): 519-527.
23. Kucharewicz, I., Pawlak, R., Matys, T. et al. Angiotensin-(1-7): an active member of the renin-angiotensin system. J Physiol Pharmacol. 2002, 53 (4 Pt 1): 533-540.
24. Цвеова, Р., Янева,Т., Димитров, Г., Найденов, К., Търновска-Къдрева, Р., Кънева, Р., Начев, Г., Митев, В. Роля на геномните асоциативни проучвания за изясняване на генетичните основи на артериалната хипертония – Сърдечно-съдови заболявания, 44, 2013, № 3, 47.

25. Jeunemaitre, X., Lifton, R.P., Hunt, S.C. et al. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension., Nat Genet.1992, 1:72–75.
26. Schmidt, S., van Hooft, I.M., Grobbee, D.E., et al. Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. J Hypertens, 1993, Apr,11(4):345-348.
27. Agarwal, A., Williams, G.H., Fisher, N.D. Genetics of human hypertension. Trends Endocrinol Metab .2005, 16: 127-133.
28. Sayed-Tabatabaei, F.A., Houwing-Duistermaat, J.J., van Duijn, C.M., Witteman, J.C. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and carotid artery wall thickness: a meta-analysis., Stroke. 2003, 34: 1634-1639.
29. Sousa, A.C., Palma dos Reis, R., Pereira, A., et al. Genetic Polymorphisms Associated with the Onset of Arterial Hypertension in a Portuguese Population. Acta Med Port, 2018 Oct, 31(10): 542-550.
30. Umburanas, R.C., Estabile, P.C., Mateus, R.P. et al. ACE Gene I/D polymorphism and systemic arterial hypertension in different classes of hypertensive individuals. MOJ Biology and Medicine, 2019 ,4(1)22-28.
31. Mengesha, H.G., Petrucka, P., Spence, C., Tafesse, T.B. Effects of angiotensin converting enzyme gene polymorphism on hypertension in Africa: A meta-analysis and systematic review. PLoS One, 2019 Feb. 14, 14(2): e0211054.
32. Tepperman, J. Metabolic and Endocrine Physiology by Jay Tepperman Perspectives in Biology and Medicine, 1963, 6(2) 272-274.
33. Ferrario C.M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst., 2006, 7(1):3-14.
34. Heras, M.M., Nieves del Castillo Rodríguez and Juan F. Navarro González. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Renal and Cardiovascular Disease and the Effects of its Pharmacological Blockade, J Diabetes Metab ,Feb.2012.3(1) 2-24.
35. Pratt, R.E., Flynn, J.A., Hobart, P.M., Paul, M., Dzau, V.J. Different secretory pathways of renin from mouse cells transfected with the human renin gene. J. Biol. Chem. March 1988, 263 (7): 3137-3141.
36. Basso,N., Terragno, N.A. History about the discovery of the renin-angiotensin system. Hypertension, 2001, Dec 1.
37. Campbell, D.J. Clinical relevance of local Renin Angiotensin systems. Front Endocrinol (Lausanne). 2014 Jul 14.

38. Shahveisi, K., Mousavi, S.H., Hosseini, M., et al. The role of local renin-angiotensin system on high glucose-induced cell toxicity, apoptosis and reactive oxygen species production in PC12 cells. Iran J Basic Med Sci. 2014 Aug, 17(8):613-621.
39. Thekkumkara, T. Texas Tech University – Health Sciences Center - School Of Pharmacy – Research. Biography Thomas Thekkumkara. Достъпна на: https://www.ttuhsc.edu/sop/research/thekkumkarabio.aspx [01.08.2016]
40. Ravina,E. The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs.
41. Scholkens,B., Landraf, W. ACE inhibition and atherogenesis. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2002 May, 80(4):354-359
42. Григиров М., Владимирова-Китова Л., Пенков Н. и съавт., Кардиология. Под ред М. Григоров, София, БКИ, 2010, стр. 531-560.
43. Dzau, V.J., Bernstein, K., Ce lermajer,D., et al. , Pathophysiologic and Therapeutic Importance of Tissue ACE: A Consensus Report. Cardiovascular Drugs and Therapy, 2002 ,16(2): 149-160.
44. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F et al. An insertion/ deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest, 1990 Oct, 86(4):1343-1346.
45. Kennedy,S., Wu, J., Wadsworth, R.M., Lawrence, C.E., Maffia, P., Mast cells and vascular diseases. Pharmacol Ther.,2013 , 138(1):53-65.
46. Galli, S. J., & Tsai, M.IgE and mast cells in allergic disease.,Nat Med, 2012 , 18: 693–704.
47. Abraham, S. N., & St John, A. L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens., Nat Rev Immunol 2010 , 10, 440-452.
48. Maurer, M., Wedemeyer, J., Metz, M., et al.Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity., Nature, 2004 , 432, 512–516.
49. Theoharides, T. C., Sismanopoulos, N., Delivanis, D. et al. Mast cells squeeze the heart and stretch the gird: their role in atherosclerosis and obesity. Trends Pharmacol Sci, 2011, 32: 534-542.
50. Becker, B.F. All because of the mast cell: blocking the angiotensin receptor-1 should be better than inhibiting ACE (theoretically),Cardiovasc Res, 2011, 92(1):7-9.
51. Schramm, A., Matusik, P. et al. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology.,Vascul Pharmacol. 2012 May-Jun, 56(5-6):216-231.
52. Balasubramanyam, M. Antioxidants and Cardiovascular Disease – Where Do We Stand? The Asian Journal of diabetology, 2006, 8(1): 48-52.

53. Harrison,D.G.,Griendling,K.K., Oxidative stress and hypertension , Hypertension primer –fourth edition 2008 p 201-204.
54. Förstermann U., Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease.,Pflugers Arch. 2010 May , 459(6):923-39.
55. Queisser,N., Schupp,N., Aldosterone, oxidative stress, and NF-κB activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases., Free Radic Biol Med. 2012 Jul 15 , 53(2):314-27.
56. Touyz, R. M. Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension What Is the Clinical Significance?,Hypertension. 2004 Sep ,44(3):248-52.
57. Touyz, R.M.,Tabet, F., Schiffrin,E.L.,Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension.,Clin Exp Pharmacol Physiol. 2003 , 30: 860–866.
58. Chiarugi,P., Cirri,P., Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction.,Trends Biochem Sci.2003 , 28: 509–51.
59. Tsutsui, H., Kinugawa ,S., Matsushima, S., Oxidative stress and heart failure , Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Dec ,301(6):H2181-90.
60. Montezano,A. C.Touyz , Rhian M., Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular , 2012 Jan., 3-48
61. Cai, H.,Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms,and consequences, Cardiovasc Res,2005 , 68(1): 26–36.
62. Cai, Hua, Harrison, David G., Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress., Circ Res. 2000 Nov 10 , 87(10):840-4.
63. Куюмджиева А., Петрова, В., Курс: Клетъчни защитни механизми срещу оксидативен стрес , Биологически факултет, Софийски университет “Св. Климент Охридски” ,София 2010 Достъпен на: http:uni-lab.net/Materials/e-student/Oxidative_stress_response_2010.pdf [01.07.2016]
64. Culotta, E., Koshland, D. E. Jr. NO news is good news.,Science,1992 ,258(5090): 1862–5.
65. Förstermann,U., Sessa,W.C., Nitric oxide synthases: regulation and function.,Eur Heart J. 2012 Apr ,33(7):829-37.
66. Andrew, P. J., Mayer, B., Enzymatic function of nitric oxide synthases.,Cardiovasc Res 1999 , 43:pp. 521–31.
67. Mokretar K., Velinov H., Postadjiyan A., Apostolova M. ; Association of polymorphisms in eNOS and RAAS with developing of CAD in Bulgarian patients,. Association of polymorphisms in eNOS and RAAS with developing of CAD in Bulgarian patients – Genet Test Mol Biomarkers. 2016 Feb;20(2):67-73.

68. Sugamura,K. and Keaney Jr.- Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Disease,Free Radic Biol Med. 2011 Sep tember 1 , 51(5): 978–992.
69. Griffith,O.W., Stuehr,D.J., Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism.,Annu Rev Physiol. 1995 , 57:707–736.
70. Maia, L. B., Moura, J. J. Nitrite reduction by xanthine oxidase family enzymes: a new class of nitrite reductases.,J Biol Inorg Chem,2011 , 16(3): 443–60.
71. Cai, H., Harrison, D. G. ,Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role ofoxidant stress, Circ Res ,2000 , 87: 840–4.
72. Mudau,M., Genis,A., Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis.,Cardiovasc J Afr. 2012 May ,23(4):222-31.
73. Wilcox, J.N., Subramanian,R.R., Sundell,C.L., Tracey,W.R., Pollock, J.S., Harrison, D.G., Marsden,P.A., Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels.,Arterioscler Thromb Vasc Biol.1997 ,17:2479–2488.
74. Pou ,S., Pou, W.S., Bredt, D.S., Snyder, S.H., Rosen, G.M.,Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase., J Biol Chem. 1992, 267(34):24173-6.
75. Shimokawa, H., Flavahan, N.A., Vanhoutte, P.M., Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries, Circulation. 1991,83:652–660.
76. Harrison,D.G.,Endothelial function and oxidant stress.,Clin Cardiol.1997 ,20:II-11–II-17
77. Rubanyi,G.M.,Vanhoutte,P.M.,Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor., Am J Physiol. 1986 ,250:H822–H827.
78. Thomson,L., Trujillo, M., Telleri,R., Radi R., Kinetics of cytochrome c2+oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems.,Arch Biochem Biophys.1995 ,319:491–497.
79. Mugge,A., Elwell, J.H., Peterson, T.E., Hofmeyer, T.G., Heistad ,D.D., Harrison, D.G. , Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits.,Circ Res. 1991 ,69:1293–1300.
80. Durante,W., Sen, A.K., Sunahara, F.A. ,Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats.,Br J Pharmacol.1988 , 94:463–468.
81. Lockette ,W., Otsuka, Y., Carretero ,O., The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension.,Hypertension.1986 ,8:II61–II66.

82. Oyama, Y., Kawasaki, H., Hattori, Y., Kanno, M., Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats.,Eur J Pharmacol.1986 ,132:75–78.
83. Baunbach, G., Mechanisms of vascular remodeling, Hypertension primer,fourth edition 2008, 61(195-198)
84. Цветков Н., Бочев Г. Свободно-радикални увреждания и перспективи на антиоксидантната профилактика и терапия, ВМИ Плевен, 2000.
85. Yin ,Y., et al. Inflammasomes: sensors of metabolic stresses for vascular inflammation.,Front Biosci (Landmark Ed). 2013 Jan 1 ,18:638-49.
86. Гаджева, В., Монография, оксидативен стрес, рак и химиотерапия, 2М, Стара Загора, 2007.
87. Juni, R.P., Duckers H.J. et al. Oxidative stress and pathological changes after coronary artery interventions.,J Am Coll Cardiol. 2013 Apr 9 ,61(14):1471-81.
88. Intengan, H.D., Schiffrin,E.L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis., Hypertension. 2001 Sep ,38(3 Pt 2):581-7.
89. Lushchak Volodymyr, Oxidative Stress and Diseases, 2012, Apr. 25, 87-141.
90. Drummond,G.R., Selemidis, S. et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets ,Nat Rev Drug Discov. 2011 June , 10(6): 453–471.
91. Touyz, R.M. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells - implications in cardiovascular disease, Braz J Med Biol Res, August 2004, Volume 37(8) 1263-1273.
92. Touyz, R.M. Reactive oxygen species and mediators of oxidative stress, Hypertension primer. 4th edit., 2008 , 30-34.
93. Ceriello,A., Possible Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension,Diabetes Care. 2008 Feb , 31, Suppl 2: 181-4.
94. Landmesser, Cai, Dikalov, McCann, Hwang,Jo, Holland and Harrison. Role of p47phox in Vascular Oxidative Stress and Hypertension Caused by Angiotensin II, Hypertension, 2002 Oct , 40 (4): 511-515.
95. Touyz, R.M., Chen, X., Tabet, F., et al. Expression of a gp91phox-containing leukocyte-type NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells: modulation by Ang II. Circ Res 2002 , 90:1205-1213.
96. Touyz, R.M., Yao, G., Quinn, M.T., Pagano P.J., Schiffrin ,E.L., Arterioscler Thromb Vasc Biol.p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II., 2005 Mar, 25(3):512-518.

97. Halcox J.P., Quyyumi,A. A., Endothelial function and cardiovascular disease. Hypertension primer – fourth edition, 2008, 204-208.
98. George, J. and Struthers,A. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. Vasc Health Risk Manag. 2009 , 5: 265–272.
99. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C.,Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacol Rev. 2006 , 58(1):87–114.
100. Della Corte, E., Gozzetti, G., Novello, F., Stirpe, F. Properties of the xanthine oxidase from human liver., Biochim Biophys Acta, 1969, 191: 164-166.
101. Guerciolini, R., Szumlanski, C., Weinshilboum, R.M., Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. Clin Pharmacol Ther. 1991 Dec , 50 (6): 663-672.
102. Berry ,C.E., Hare ,J.M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. J Physiol, 2004, 16, 555 (Pt 3): 589-606.
103. Harrison,R., Structure and function of xanthine oxidoreductase:Where are we now?,Free Radical Biology & Medicine,2002 , 33(6) 774-797.
104.Granger ,D.N., Hollwarth ,M.E., Parks, D.A., Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals.,Acta Physiol Scand Suppl. 1986 , 548:47-63.
105. Radi, R., Rubbo, H., Bush, K., Freeman ,B.A., Xanthine Oxidase Binding to Glycosaminoglycans: Kinetics and Superoxide Dismutase Interactions of Immobilized Xanthine Oxidase-Heparin Complexes., Arch Biochem Biophys. 1997 , 339(1):125-135.
106. Panus, P.C., Wright, S.A., Chumley, P.H. et al. The contribution of vascular endothelial xanthine dehydrogenase/oxidase to oxygen-mediated cell injury. Arch Biochem Biophys. 1992, 294 (2): 695-702.
107. Suzuki, H., DeLano, F. A., Parks, D. A. et al. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 4754-4759.
108. DeLano, F. A., Parks, D. A., Ruedi, J. M., Babior, B. M., Schmid-Schonbein, G.W. Microvascular display of xanthine oxidase and NAD(P)H oxidase in the spontaneously hypertensive rat. ,Microcirculation , 2006 , 13 (7): pp. 551–66.
109. Verhaar ,M.C., Wever, R.M., Kastelein, J.J. et al. 5- methyltetrahydrofolate the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolemia., Circulation. 1998 , 97:237-241.
110. Armitage, J.M., Bowman, L., Clarke, R.J. et al. Effects of homocysteine-lowering with folic acid plus vitamin B12 vs placebo on mortality and major morbidity in myocardial infarction survivors: a randomized trial. JAMA, 2010, Jun 23, 303(24):2486-94.

111. Oelze, M., Daiber, A., Brandes, R. P., et al. Nebivolol inhibits superoxide formation by NAD(P)H oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats., Hypertension,2006 , 48(4): 677-684.
112. Walkowska, A., Sadowski, J., Kompanowska-Jezierska E., Oxidative stress and neuronal NOS activity: putative determinants of rapid blood pressure increase after renal denervation in anaesthetised rats , Physiol Res. 2013 Jul 18 ,62(3):257-66.
113. Fotino, A.D., Thompson-Paul, A.M., Bazzano, L.A. Effect of coenzyme Q_{10} supplementation on heart failure: a meta-analysis. Am J Clin Nutr. 2013 Feb ,97(2):268-75
114. Manna, S. K., Zhang, H. J., Yan, T., et al. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1., J Biol Chem, 1998 , 273(21): 13245–54.
115. Alvarez, S., Valdez, L. B., Zaobornyj, T., Boveris, A. Oxygen dependence of mitochondrial nitric oxide synthase activity.,Biochem Biophys Res Commun, 2003 , 305(3): pp. 771–5.
116. Boveris, A., Chance, B. ,The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. ,Biochem J,1973 , 134(3): 707–16.
117. P. M., Foster, D. B., Crow, M., Cooke, C. A., et al. Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(36): 14849-54.
118. Dai, D. F., Johnson, S. C., Villarin, J. J., et al., Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure., Circ Res , 2011 , 108(7): 837–46.
119. Tinkel ,J., Hassanain, H., Khouri ,S.J., Cardiovascular antioxidant therapy: a review of supplements, pharmacotherapies, and mechanisms., Cardiol Rev. 2012 Mar-Apr ,20(2):77-83.
120. Fortuno, A., Olivan, S., Beloqui, O., et al. Association of increased phagocytic NAD(P)H oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. J Hypertens, 2004 , 22: 2169-2175.
121. Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Matsuura, H., Oshima, T., Chayama, K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension., N Engl J Med , 2002 , 346: 1954–62.
122. Lee, V. M., Quinn, P. A., Jennings, S. C., Ng, L. L. ,Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia.,J Hypertens ,2003 , 21: 395-402.

123. Ward, N. C., Hodgson, J. M., Puddey, I. B., et al. Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition and lifestyle., Free Radic Biol Med, 2004 , 36:. 226–232.
124. Kashyap, M.K.,Yadav, V., Sherawat, B.S., et al. Different antioxidants status, total antioxidant power and free radicals in essential hypertension. Mol Cell Biochem. 2005 , Sep, 277 (1-2): 89-99.
125. Rodrigo, R., Prat H., Passalacqua, W. et al. Relationship between oxidative stress and essential hypertension. Hypertens Res. 2007, 30 (12): 1159-1167 .
126. Jeong-Hwa Han et al. Association between oxidative stress and blood pressure in Korean subclinical hypertensive patients, Korean J Nutr. 2013 Apr, 46 (2): 126-136.
127. Георгиев, Б., Караславова-Доброджалийска, Е., Гочева, Н. Артериална хипертония – предпочитания за лечение и избор на терапия в България. Наука кардиология, 2012, №3, 101-112.
128. Ivanov, I.T., & V. Gadjeva. Influence of some DNA-alkylating drugs on thermal stability, acid and osmotic resistance of the membrane of whole human erythrocytes and their ghosts. Die Pharmazie, 55.9 (2000): 672.
129. Plaser Z.A., Cushman L.L., Jonson B.C. ,Estimation of product of lipid peroxidation (Malonyl Dialdehyde) in biochemical systems. Anal Biochem 16:359-364.
130. Gadjeva V, D. Kuchukova, R. Georgieva Influence of polychemotherapy on the antioxidant levels and lipid peroxidation in patients with lymphoproliferative diseases. Comparative Clinical Pathology 14(1), (2005): 13-18.
131. Bailey D. Ascorbate, blood–brain barrier function and acute mountain sickness: a radical hypothesis. Wilderness Environ Med. ,15 (2004): 231-233.
132. Shi, H., Sui, Y., Wang, X. et al. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of Carassius auratus. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmcol. 2005, 140 (1): 115-121.
133. Zheleva, A., Karamalakova, Y., Mishra, A., Gadjeva, V. Studies on biological activity of a potential alkylating antitumour drug containing nitroxyl free radical structure. 6th SPIN Conference, 26-29 Sept, Marseille, France, Book of Abstracts, 2011, 129.
134. Yoshioka T., Iwamoto N., Lto K. An applicationof Electron Paramagnetic Rasonance to evaluate nitric oxide and its quenchers. J. Am Soc Nephrol, 1996, 7: 961-965.
135. Yokoyama K., Hashiba K., Wakabayashi H., Hashimoto K., Saton K., Kurihara T., Motohashi N. & Sakagami H., Inhibition of LPS-stimulated NO production in mouse macrophage-like cells by Tropolones. Anticaner Research, 2004, 24: 3917-3922..

136. Patel P. R, Bevan R. J, Mistry N and Lunec J. Evidence of oligonucleotides containing 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. Free Radic Biol Med. 2007 Feb 15; 42 (4): 552-558. Epub 2006 Nov 30
137. Alberti A., & Hudson A., In: Electron Spin Resonance, Eds. Atherton, N.M., Davies, M.J. and Gilbert, B.C. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK,1996, 15: 32-58.
138. Adhikari S., Joshi R., Patro, B. S. et al. Antioxidant activity of bakuchiol: Experimental evidences and theoretical treatments on the possible involvement of the terpenoid chain. Chem. Res. Toxicol.,2003, 16: 1062-1069.
139. Желева А., Електрон-парамагнитен резонанс – оксидативен статус и антиоксидантна активност. Монография, АИ Тракийски университет, Стара Загора, 2012.
140. Dalle-Donne, Isabella, Ranieri Rossi, Daniela Giustarini, Aldo Milzani, and Roberto Colombo. "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress." Clinica Chimica Acta 329, no. 1 (2003): 23-38.
141. Levine, R. L., Wehr, N. , Williams, J. A., et al. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins.Methods Mol. Biol.99 (2000): 15–24.
142. McKersie, B. D. Patent Application 13/138,736. 2010.
143. Huang, W.Y., Davidge, S.T., Wu, J. et al.Bioactive natural constituents from food sources-potential use in hypertension prevention and treatment., Crit Rev Food Sci Nutr. 2013, 53(6):615-30.
144. Debreceni, B., Debreceni, L. ,Why do homocysteine-lowering B vitamin and antioxidant E vitamin supplementations appear to be ineffective in the prevention of cardiovascular diseases? Cardiovasc Ther. 2012 Aug ,30(4):227-33.
145. Wahlqvist, M.L. Antioxidant relevance to human health. Asia Pac J Clin Nutr, 2013, 22 (2):171-6.
146. Rees, K., Hartley ,L., Day, C. et al. ,Selenium supplementation for the primary prevention of cardiovascular disease. Cochrane Database Syst Rev, 2013 Jan 31, (1): CD009671.
147. Русева,Б., Селен и съдова стен. Наука Диетология, 1, 2011, 16-20.
148. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. East Mediterranean Health, Jr 4 (1998): 350-60.
149. Колева, Г. Храненето като фактор от стила на живот при пациенти с артериална хипертония, Здравни грижи, 2018, ISSN 1312-2592.
150. Aseervatham,G.S.,Sivasudha ,T.,Jeyadevi ,R., Arul Ananth, D. ,Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans--an overview , Environ Sci Pollut Res Int. 2013 Jul ,20(7):4356-69.

151. Al-Gubory ,K.H. Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. Reprod Biomed Online. 2014 Jul , 29(1):17-31.
152. King, D.E., Mainous, A.G. 3rd, Matheson, E.M., Everett ,C.J. Impact of healthy lifestyle on mortality in people with normal blood pressure, LDL cholesterol, and C-reactive protein. Eur J Prev Cardiol, 2013 Feb, 20 (1): 73-79.
153. Codoñer-Franch, P., Valls-Bellés, V., Arilla-Codoñer, A., Alonso-Iglesias, E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. Transl Res, 2011 Dec, 158 (6): 369-84.
154. Консулова, П., Орбецова, М., Затлъстяване в детско-юношеска възраст-диагноза, рискови фактори, характеристики. Наука Ендокринология, 2013, № 4, 125-128.
155. Hoogwerf B.J.,Young J.B. The HOPE study. Ramipril lowered cardiovascular risk, but vitamin E did not. Cleve Clin J Med., 2000 Apr, 67(4):287-93.
156. Heart Protection Study Collaborative Group, MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial , Lancet, 2002 Jul 6, 360 (9326): 7-22.
157. Ozkanlar,S., Akcay, F., Antioxidant vitamins in atherosclerosis--animal experiments and clinical studies. Adv Clin Exp Med. 2012 Jan-Feb ,21(1):115-23.
158. Baradaran,A., Nasri,H. and Rafieian-Kopaei,M., Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants, J Res Med Sci., 2014 Apr , 19(4): 358–367.
159. Kuiper,C. et Vissers,M., Ascorbate as a co-factor for Fe- and 2-oxoglutarate dependent dioxygenases: physiological activity in tumor growth and progression. Front. Oncol., 2014 Dec, 4: 359.
160. Buettner, G.R. et Jurkiewicz B.A.: Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. Free Radic Biol Med, 1993, 14: 49-55.
161. Buettner, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. Arch Biochem Biophys. 1993, 300: 535-43.
162. Николова, Г. Провокиращ ефект на синтетични и природни антиоксиданти срещу оксидативен стрес, предизвикан от болестта на Паркинсон и нейната терапия. 2014
163. Pagan-Carlo L.A., Garcia L.A., Hutchison, J.L., et al. Captopril lowers coronary venous free radical concentration after direct current cardiac shocks. Chest, 1999 Aug, 116(2):484-7.

164. Wu, Y., Yang, H., Yang, B. et al. Association of polymorphisms in prolylcarboxypeptidase and chymase genes with essential hypertension in the Chinese Han population. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2013 Sep, 14(3):263-270.
165. Nakamura, K., Murakami, M., Miura, D. et al. Beta-blockers and oxidative stress in patients with heart failure. Pharmaceuticals (Basel). 2011 Aug, 4(8): 1088-1100.
166. Halliwell B., Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. Drugs Aging, 2001, 18: 685-716.
167.Kohen R and Nyska A, Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantication Tox. Path, 2002,30(6) : 620–650.
168. Halliwell B., Gutteridge, J.M.C., Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford. 1989 , 188(1) 169-180.
169. Gill, S. and Tuteja, N., Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry,2010 , 48(12): 909-930.
170. Kyaw, M., Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., et al. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. Acta Pharmacol Sin. 2004 Aug ,25(8):977-85.
171. Chopra, M.,Beswick, H.,Clapperton, M., et al. Antioxidant effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors: free radical and oxidant scavenging are sulfhydryl dependent, but lipid peroxidation is inhibited by both sulfhydryl- and nonsulfhydryl-containing ACE inhibitors. J Cardiovasc Pharmacol, 1992, 19(3):330-40.
172. Yang, H.Y., Kao ,P.F., Chen ,T.H., et al. Effects of the angiotensin II type 1 receptor antagonist valsartan on the expression of superoxide dismutase in hypertensive patients., J Clin Pharmacol. 2007 Mar, 47(3):397-403.
173. Gomes, A., Costa, D., Lima, J.L., Fernandes, E., Antioxidant activity of beta-blockers: an effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species, Bioorganic & Medicinal Chemistry 28 Feb 2006, 14(13):4568-4577.
174. Bloodsworth,A., O'Donnell, V.B., Freeman,B.A., Nitric Oxide Regulation of Free Radical– and Enzyme-Mediated Lipid and Lipoprotein Oxidation,Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2000 , 20:1707-1715.
175. Шкодрова, М., Чичова, М., Минков, И., Азотният оксид – сигнална молекула от нов тип. Влияние на азотния оксид върху функциите на митохондриите и подходи за изследване. Годишник на ШУ „Еп. Константин Преславски", Природни науки, Биология ,2010, XX B6, 5-22.

176. Илиев, А., Желев, Л., Ланджов, Б., Котов, Г., Хинова-Палова, Д., Палов, А. Роля на невроналната азотен оксид синтетаза в сърдечната патология. Medical Magazine Кардиология, Април 2016, 34-37
177. Jianyu Li, Xiangmin Zhao, Xinmei Li, et al. Angiotensin II type 2 receptor-dependent increases in nitric oxide synthase expression in the pulmonary endothelium is mediated via a Gαi3/Ras/Raf/MAPK pathway ,American Journal of Physiology - Cell Physiology , 11 June 2007, 292(6): C2185-C2196.
178. Čolak, E. New markers of oxidative to macromolecules, JMB, 2008, 27 (1): 1-16.
179. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clinical chemistry, 2006, 52(4): 601-623.
180. Dalle-Donne I, Rossi R., Giustarini D., et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, Clin. Chim. Acta, 2003, 329: 23-38.
181. Yuan, Z., Shioji, K., Kihara, Y., Takenaka, H., Onozawa ,Y., Kishimoto, C., Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis: anti-inflammatory effects associated with antioxidant property. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Jan, 286(1):H83-90.
182. Wu , B.,Lin ,R., Dai, R., Chen, C., Wu ,H., Hong, M.., Valsartan attenuates oxidative stress and NF-κB activation and reduces myocardial apoptosis after ischemia and reperfusion.,Eur J Pharmacol. 2013 Apr 5 ,705(1-3):140-7.
183 Dézsi, C.A. The Different Therapeutic Choices with ARBs. Which One to Give? When? Why? Am J Cardiovasc Drugs, 2016, 16 (4): 255-266.
184. Jamerson, K, Weber, M.A., Bakris, G.L., et al. Benazepril plus Amlodipine or Hydrochlorothiazide for Hypertension in High-Risk Patients. N Engl J Med, 2008, 359: 2417-2428.
185. Георгиев, Б. Контрол на артериалното налягане при пациенти с артериална хипертония Време ли е за смяна на монотерапията с фиксирана комбинация? Наука Кардиология 2008, (4): 176-182.
186. Илиева, А. П. Инхибиране на ангиотензин и ендотелин конвертиращите ензими и ролята им в профилактиката и лечението на микроалбуминурията при захарен диабет тип 2. София 2016.
187. Schunkert, H., Ingelfinger, J.R., Hirsch, A.T. et al. Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin II., Circ Res. 1993 Feb ,72(2):312-318.
188. Li,Y., Li,X. and Yuan,H., Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system Cardiovasc Diagn Ther. 2012 Mar; 2(1): 56–62.
189. López-Sendón J, Swedberg K, McMurray et al. Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. The Task

Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. Eur Heart J, 2004 Aug, 25(16): 1454-1470.

190. Company C, Piqueras L, Naim Abu Nabah Y et al. Contributions of ACE and mast cell chymase to endogenous angiotensin II generation and leucocyte recruitment in vivo. Cardiovasc Res., 2011, 92(1): 48-56.
191. Persson, I. Red wine, white wine, rosé wine, and grape juice inhibit angiotensin-converting enzyme in human endothelial cells. Int J Nutrit Pharmacol Neurol Dis, 2013, 3(1): 17-23.
192. Úri, K., Fagyas, M., Mányiné Siket, I. et al. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: circulating ACE2 as abiomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure. 2014 Apr 1, 9(4): e87845.
193. Li, S., Wang, Z., Yan, X., et al. Association between circulating angiotensin-converting enzyme 2 and cardiac remodeling in hypertensive patients. Peptides. 2017 Apr, 90: 63-68.
194. Patel, V.B., Clarke, N., Wang, Z., et al. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. J Mol Cell Cardiol, 2014 Jan, 66: 167-76.
195. Urata, H., Hoffmann ,S., Ganten, D. Tissue angiotensin II system in the human heart. Eur Heart J, 1994 Dec ,15 (Suppl D): 68-78.
196. Stergiou G.S., Skeva I.I., Baibas N.M. et al. Does the antihypertensive response to angiotensin converting enzyme inhibition predict the antihypertensive response to angiotensin receptor antagonism? Am J Hypertens. 2001 , 14 (7 Pt 1): 688-693.
197. Arakawa ,K., Urata ,H., Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. Hypertension,2000 , 36(4):638-641.
198. Kanemitsu, H., Takai, S., Tsuneyoshi, H., et al. Chymase inhibition prevents cardiac fibrosis and dysfunction after myocardial infarction in rats. Hypertens Res., 2006, 29(1):57-64.
199. Uehara ,Y., Urata, H., Ideishi, M. et al. Chymase inhibition suppresses high-cholesterol diet-induced lipid accumulation in the hamster aorta. Cardiovasc Res. ,2002, 55(4):870-6.
200. Uehara ,Y., Urata ,H., Sasaguri ,M., Ideishi ,M., Sakata, N., Tashiro ,T., Kimura ,M., Arakawa ,K., Increased Chymase Activity in Internal Thoracic Artery of Patients With Hypercholesterolemia. Hypertension,2000; 35(1 Pt 1):55-60.

201. Murakami, K., Uehara,Y., Abe, S., Inoue ,Y., Ideishi, M., Saku, K., Urata, H., Positive correlation between chymase-like angiotensin II-forming activity in mononuclear cells and serum cholesterol level. J Cardiol. ,2007;50(5):291-8;
202. Gunda, P. , Nagalingam, S., Tirunilai ,P., Role of Tagged SNPs of the AGT Gene in Causing Susceptibility to Essential Hypertension/ / Clin Exp Hypertens 2016 Jul 11 , 38 (6), 520-525.
203. Hadjadj, S., Belloum, R., Bouhanick, B., Gallois, Y., Guilloteau, G., Chatellier, G., Alhenc-Gelas, F., Marre, M., Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. J Am Soc Nephrol. 2001; 12(3): 541-549.
204. Marre, M., Genetics and the prediction of complications in type 1 diabetes. Diabetes Care. 1999; 22 (2): B53-58.
205. Seki, N., Hashimoto, N., Suzuki ,Y., Yagui, K., Saito, Y., Differential effects of RAS inhibitors associated with ACE gene polymorphisms in type 2 diabetic nephropathy// Diabetes Res Clin Pract, 2006, 72(2): 135-141.
206. Agerholm-Larsen ,B.,Nordestgaard ,B.G., Tybjaerg-Hansen,A. ,ACE gene polymorphism in cardiovascular disease: meta-analyses of small and large studies in whites. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Feb; 20(2):484-92.
207. Mondry,A., Loh ,M., Liu, P., Zhu, A.L., Nagel ,M. Polymorphism of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. BMC Nephrol. 2005; 6 (1): 1-11.
208. Castellano, M., Glorioso ,N., Cusi ,D., Sarzani ,R., Fabris, B., Opoche,r G., et al. Genetic polymorphism of the renin-angiotensin-aldosterone system and arterial hypertension in the Italian population: the GENIPER Project. J Hypertens. 2003; 21 (10): 1853-60.
209. Freitas ,S.R..S, Cabello ,P.H., Moura-Neto ,R.S., Dolinsky, L.C., Lima, A.B., Barros ,M., Bittencourt ,I., Cordovil, I.L. ,Analysis of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms in resistant hypertension. Braz J Med Biol Res. 2007; 40 (3): 309-16.
210. Iwai,N., Ohmichi,N., Nakamura,Y., Kinoshita,M. DD-genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. Circulation.1994; 90: 2622-2628.
211. Vasku, A., Soucek, M., Znojil, V.et al. Angiotensin I-converting enzyme and angiotensinogen gene interaction and prediction of essential hypertension. Kidney Int. 1998; 53: 1479-1482.
212. Tiret, L., Blanc, H., Ruidavets,J.B., et al. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. Projet d'Etude des Genes de

l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle. J Hypertens. 1998;16: 37-44.

213. Lemes, V.A., Neves,A.L.,Guazzelli, I.C., et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with increased adiposity and blood pressure in obese children and adolescents. Gene. 2013, Dec 15; 532(2):197-202.
214. Dhanachandra Singh Kh., Ajay Jajodia, Harpreet Kaur, Ritushree Kukreti and Muthusamy Karthikeyan, Gender Specific Association of RAS Gene Polymorphism with Essential Hypertension: A Case-Control StudyBiomed Res Int. 2014,Apr 17,1-10.
215. Мокретар, К. Микроструктурни геномни аберации при пациенти със сърдечно-съдови заболявания. София 2015.
216. Agachan, B., Isbir, T., Yilmaz, H., Akoglu, E., Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensina II type 1 receptor A1166C gene polymorphism in Turkish hypertensive patients. Exp Mol Med. 2003; 35 (6): 545-9.
217. Schelleman H., Klungel O.H., van Duijn C.M., Witteman J.C., Hofman, A., de Boer ,A., Stricker, B.H. Drug-gene interaction between the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and antihypertensive therapy. Ann Pharmacother. 2006 Feb;40(2):212-8.
218. Jacobsen, P.K., Tarnow ,L., Parving, H.H. Time to consider ACE insertion/deletion genotypes and individual renoprotective treatment in diabetic nephropathy? Kidney Int. 2006 Apr;69(8):1293-5.

XI. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Анкетна карта –хипертония

АКН – артериално кръвно налягане

АХ – артериална хипертония

1. Име

2. Пол

а) m

б) f

3. Възраст

а) 25-34

б) 35-44

в) 45-54

г) 55-64

д) 65-74

е) над 75

4. Стойност на АКН, клинично измерено от консултиращия лекар (три прегледа):

а) 130-139/85-89

б)140-159/90-99(I степен АХ)

в) 160-179/и или 100-109 (II степен)

г) ≥ 140 и/или ≥ 100

д) изолирана систолна хипертония

≥ 140 < 90

5. Максимални стойности на АКН, съобщени анамнестично от пациента − .....

6. Давност на АХ

а) новооткрита

б) под 6 м.

в) 6 м.−1 год.

г) над 1 год.

7. Приемате ли редовно медикаменти за лечение на АХ?

а) да, монотерапия

б) да, комбинирана терапия

в) не

8. (Само при положителен отговор на Въпрос 7) **Повлия ли се АКН от приема на назначената анти-хипертензивна терапия:**

а) Не

б) Има понижение в стойностите на АКН, но то все още не е в нормални граници

в) Да

9. Имате ли придружаващи заболявания на ССС(на органите на кръвообращението):

а) Да(МКБ10)……

б) Не

10. Имате ли родственици по права линия(майка/баща,баба,пра-баба) или по съребрена линия II степен (брат/сестра) със:

а) АХ

б) преживян сърдечно-съдов инцидент

в) захарен диабет

г) не

11.Тютюнопушене през последните 5 години:

а) не

б) да (брой цигари дневно-….)

12. Ежедневен прием на алкохол (концентрат) :

а) не

б) да, ежедневно до 100 мл.концентрат (или 1 бира/чаша вино)

в) да, ежедневно над 100 мл.концентрат

13. Наличие на регистрирана при контролен преглед повишена кръвна захар на гладно

а) не

б) да, препоръчан е диетичен режим

в) да, диагностициран захарен диабет (давност – …; терапия – ……)

14. Наличие на повишен общ холестерол при контролен преглед:

а) не

б) да, спазва препоръчана от специалист диета

в) да, назначена медикаментозна терапия

г) да, но без предприети мерки

15.Наличие на физическа активност над 30 мин. дневно:

а) да

б) не

16. Спазване на диетичен режим (възможен повече от един отговор):

а) не

б) да, ограничен е общият калориен прием

в) да, ограничен е приемът на мазнини

г) да, ограничени са простите въглехидрати (бяло брашно,захарни изделия – бисквити, бонбони, вафли …)

д) да, ограничен прием на готварска сол

е) да, като цяло стремеж към здравословно хранене

17. Талия:……..

18. ИТМ:……. (тегло – ……..)

19. Прием на синтетични антиоксиданти ,като добавка към хранителния режим:

а) не

б) да (вит. A, C, E, коензим Q, Se…… – да се посочат)

20. През последната година:

а) подлагане на високоенергетични въздействия (йонизиращи лъчения, UV радиация) – (да/не)

б) системно физическо свръхнатоварване (да/не)

в) работа с индустриални химични замърсители (пестициди,хербициди,торове, нитрати,тежки метали) – (да/не)

г) прием на антибиотици,кортикостероиди,химиотерапевтици – (да/не)

д) отопление с „дървени печки“,работа или обитание на регион с висока промишлена или транспортна активност – (да/не)

е) повишена концентрация на O_3 – озонатори за въздух – (да/не)

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Поради лекото разминаване в референтните стойности за различните лаборатории ние използвахме следните референции :
Хемоглобин (по World Health Organization) -
Жени над 15 год., нераждали
– норма ≥ 120 g/l.
– лека анемия 110-119 g/l. При дефицит на желязо анемията е „тежка“,дори при липса на клинични прояви
– умерена анемия 80-109 g/l.
– тежка анемия под 80 g/l.
Мъже над 15 год.
– норма ≥ 130 g/l.
– лека анемия 110-129 g/l.
– умерена анемия 80-109 g/l.
– тежка анемия под 80 g/l.
MCV в er. = (Hct [в L / L] / RBC [в x10 ^{12} / L]) x 1000 норма 80-96 fL
Левкоцити- 4.5-10.5 x 10^9 клетки/L
Тромбоцити 140-400 x 10^9 клетки/L

INR (International Normalized Ratio) е международна система за представяне на резултатите от тестовете за коагулация на кръвта, установена от Международната здравна организация и Международния Комитет по тромбоза и хемостаза. Всички резултати са стандартизирани чрез международния индекс за чувствителност (ISI) за основния тромбопластинов реагент в комбинация с използвания инструмент за осъществяване на теста. Повечето лаборатории използват анализатори, които автоматично изчисляват INR.

$$INR \quad \frac{\textit{(време на съсирване на плазмата на болен) ISI}}{\textit{(време на съсирване на плазмата на здрав индивид) ISI}} \quad = 0{,}7\text{-}1{,}3$$

Скриниране чрез протромбиновото време може да разкрие вроден или придобит недоимък на фактори от външната система на кръвосъсирване.
СУЕ – неспецифичен показател. Заедно със стойността на левкоцитите може да бъде използван за отхвърляне на остри възпалителни заболявания и някои хронични възпалителни процеси.

Мъже до 50 години	< 15 mm/h
Жени до 50 години	< 25mm/h
Мъже над 50 години	< 20mm/h
Жени над 50 години	< 30mm/h

ALAT и ASAT в серума са отчетени в съответствие с препоръките на Европейския комитет за клинични лабораторни стандарти (European Committee for Clinical Laboratory Standards -ECCLS).
ALAT до 40 U/l
ASAT до 47 U/l

Нормалната стойност на показателите и INR , при липса на оплаквания от страна на болния цели отхвърляне на чернодробно увреждане

Креатинин – класификацията на хронична бъбречна недостатъчност въз основа на серумния креатинин (като за норма се счита стойност под 133 μmol/L) не се възприема в KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. В новите препоръки са указани стадии на хронично бъбречно заболяване (ХБЗ), като при ХБЗ стадий 5 говорим за бъбречна недостатъчност.

Гломерулната филтрация бе изчислена чрез MDRD GFR Calculator

Таблица 12. Стадии на ХБЗ определяни по ГФ (mL/min/1.73 m^2)

Стадии	**ГФ**	
G1	≥ 90	Нормална или висока
G2	89-60	Леко намалена
G 3a	59-45	Леко до умерено намалена
G 3 b	44-30	Умерено до силно намалена
G 4	29-15	Силно намалена
G 5	> 15	Бъбречна недостатъчност

Включените в проучването пациенти в 30% са в стадии G 3a и70 % са в G2 Трябва да се има предвид известното понижение на ГФ с възрастта.

Кръвна захар на гладно: Плазмена концентрация на кръвната захар на гладно (ПГГ) ≥7.0 mmol/l (измерена след поне 8 часа въздържание от всякакъв калориен прием) е добър скринингов метод за наличен захарен диабет.

Приложение 3

Декларация за информирано съгласие

Аз долоподписаният/долоподписаната……..……
……...

Декларирам, че:

1. Д-р Христова, в качеството си на редовен докторант към II Катедра „Вътрешни болести“, ми даде подробна информация относно същността, целите и ползите на провежданото научно изследване.
2. Запознат/а съм с естеството на инвазивната процедура, която ще ми бъде извършена (венепункция), заедно с всички възможни последствия, които може да донесе за моето здраве.
3. Наясно съм, че участието в научното изследване е напълно доброволно.
4. Гарантирано ми бе, че моите лични данни ще бъдат използвани САМО за целите на настоящия проект и няма да бъдат разпространени или предоставени за друга цел без изрично мое съгласие.
5. Имах възможност да задавам въпроси и получих необходимата за мен информация.
6. Предоставено ми бе достатъчно време за размисъл и вземане на решение за участие в изследването.
7. Личното ми достойнство не бе накърнено по никакъв повод от страна на участниците в научния проект и медицинския персонал.

Изразявам своето информирано съгласие за доброволно участие в изследването!

Дата:…….
Подпис:……

Име и фамилия на изследователя:
……

Потвърждавам, че обясних на пациента същността и целта на настоящия научен проект на разбираем език. Предоставих достатъчно време за размисъл и вземане на решение за участие в изследването. Изследваният (ата) имаше възможност да задава въпроси.

Дата:……..
Подпис:……

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
СТАРА ЗАГОРА
unisz-iso.org
uni-sz.bg

Конкурс за финансиране на научни проекти – 2014г.

766 13.02.14

научен проект

тема:

Терапевтичен отговор към приложение на АСЕ инхибитори при пациенти с артериална хипертония и различни нива на оксидативен стрес

Научен колектив:
Ръководител на проекта:Доц. д-р.Маргарит Пенев,д.м.
Членове: Доц. Люба Митева,дбн
Гл. ас. д-р. Детелина Комсийска
докторант Д-р.Марияна Христова
докторант Доника Иванова
студент Христина Христова
студент Калоян Иванов

ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
СТАРА ЗАГОРА

Конкурс за финансиране на научни проекти – 2014г.

ФОРМА ЗА ЕТИЧНА РАБОТА С ЖИВОТНИ И ХОРА

А.

ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКАТА РАБОТА ПО НАУЧНИЯ ПРОЕКТ СВЪРЗАНА ЛИ Е С:	ДА	НЕ
1. ХОРА	да	
2. ЖИВОТНИ		
3. ЛИЧНИ ДАННИ	да	
4. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ ОТ ХОРА	да	

Б. ЦЕЛ, ОБОСНОВКА И КРАТКО ОПИСАНИЕ НА НАУЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ, СВЪРЗАНО С т. А (до 1 стр.)

В настоящият проект се предвижда работата с две групи пациенти-основна и контролна.Двете групи ще бъдат подложени на различна терапия с цел оптимизиране на стойностите на артериалното кръвно налягане и лечение на установената им артериална хипертония.Преди и известно време след започване на терапия ще им бъде взета кръвна проба и в резултат от направените изследвания ще бъдат формирани изводи съгласно поставената цел и задачи подробно формулирани в точка 3.

Предвид факта,че работата по настоящия проект е свързана с пациенти и вземането на биологичен материал от тях е необходимо получаването на информирано съгласие преди включването на всеки един от болните.На пациентът се разясняват детайлно целта и задачите на проекта, необходимостта от терапия на настоящото състояние (артериална хипертония) и последствията които носи липсата на лечение върху здравето му.Акцентира се върху доброволното участие и се гарантира,че личните данни на пациента ще бъдат използвани само за целите на проекта и няма да бъдат разпространени или предоставени за друга цел без излишно негово съгласие.На всеки един болен се разясняват допълнително инвазивните процедури,които ще бъдат извършвани (венепункция).Гарантира се пълната стерилност на средата при извършване на манипулацията.

Личното достойнство на пациентите няма да бъде накърнено по никакъв повод от страна на участниците на научния проект и медицинския персонал.Ще бъде отговорено изчерпателно на всички поставени към екипа въпроси.

Всеки един пациент има правото да прекъсне участието си в проекта.

Информираното съгласие бива изготвено в писмен вид и подписано от пациента преди включването му в проекта.

В. СТАНОВИЩЕ НА КОМИСИЯТА ПО ЕТИКА:

☒ РАЗРЕШАВА СЕ ИЗВЪРШВАНЕ НА НАУЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ.

☐ НЕ СЕ РАЗРЕШАВА ИЗВЪРШВАНЕ НА НАУЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ.

Председател:

Членове:

XII. БЛАГОДАРНОСТИ

БЛАГОДАРЯ СЪРДЕЧНО:

- На научните ми ръководители – ***доц. д-р Емил Манов, дм***, и ***доц. д-р Маргарит Пенев, дм***, за съдействието при изработването, написването и оформянето на настоящата дисертация, за безрезервната подкрепа и доверието в мен през последните години и за всичко, на което са ме научили.
- На доц. Люба Митева, дмб, за подкрепата, всестранната помощ и методичните насоки за осъществяване на изследванията.
- На всички мои колеги и приятели от Катедра “Химия и биохимия” и Катедра "Молекулярна биология и генетика" на Медицинския факултет при Тракийския университет – Стара Загора, за моралната подкрепа, приятелската атмосфера и помощта при лабораторните експерименти.
- На съпруга и семейството ми за вярата, за подкрепата и за любовта им.