МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

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

Д-Р МАРИЯНА КОСТОВА ХРИСТОВА

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

АВТОРЕФЕРАТ

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, дм

София, 2020

Дисертационният труд е написан на 155 стандартни машинописни страници, съдържа **35** таблици и **47** фигури. Литературната справка включва **218** заглавия .

Изследванията на оксидативния стрес, свързани с дисертацията, и проследяването на пациентите са извършени в Лаборатория по оксидативен стрес и Лаборатория по ЕПР спектроскопия в Катедра "Химия и биохимия" на Медицинския факултет при Тракийския университет – Стара Загора.

Дисертантът е лекар и асистент по Вътрешни болести към Медицински факултет , Тракийски университет.

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита от Катедрения съвет на Катедра „Пропедевтика на вътрешните болести" при Медицински университет – София.

Научно жури:

1. Проф. д-р Арман Шнорк Постаджиян, дм – вътрешен член за МУ – София, Катедра по обща медицина, МФ, МУ – София
2. Доц. д-р Светослав Тодоров Йовев, дм – вътрешен член за МУ – София, Катедра по сърдечно-съдова хирургия, МФ, МУ – София
3. Проф. д-р Мария Христова Миланова, дмн – външен член за МУ – София, УМБАЛСМ „Н. И. Пирогов"
4. Проф. Снежанка Томова Тишева-Господинова, дм – външен член за МУ – София,
5. Доц. д-р Иван Томов Груев, дм – външен член за МУ – София, Национална многопрофилна транспортна болница

Резервни членове:

1. Проф. д-р Диана Крумова Трендафилова-Лазарова, дм – външен член за МУ – София, Национална многопрофилна транспортна болница
2. Проф. д-р Пламен Маринов Гацов, дмн – външен резервен член за МУ – София, Медицински университет – Плевен

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на КПВБ при МУ – София.

Защитата на дисертационния труд ще се състои **26.02.2020** година от ....:..... часа в залата на КПВБ при МУ – София.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения 4
Въведение 5
I. Цел 7
II. Задачи 7
III. Материал и методи 9
IV. Резултати 13
1. Генотипно разпределение на ACE полиморфизма при пациенти и контроли 13
2. Ефект на I/D ACE полиморфизма върху фенотипа при АХ пациенти и нормотензивни контроли 14
3. Показатели на оксидативния стрес и антиоксидантния статус при пациенти с АХ, разделени според вида на приеманата АХ терапия, и в сравнение с нормотензивни контроли 17
4. Изследване на плазмено ниво на протеини от РААС системата и химаза 24
V. Обсъждане 30
1. ACE I/D полиморфизъм при пациенти и контроли 30
2. Артериална хипертония и оксидативен стрес 34
3. Протеини от РААС системата 44
VI. Изводи 54
VII. Приноси на дисертационния труд 55
VIII. Публикации и участия в конгреси, свързани с дисертационния труд 57
10. Благодарности 60

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

AI	ангиотензин I
AII	ангиотензин II
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
ROS	реактивни кислородни видове

ВЪВЕДЕНИЕ

Артериалната хипертония е един от социално значимите проблеми поради високата заболяемост, болестност, инвалидизация и смъртност. Високото артериално налягане трябва да се разглежда като прогресиращ кардиоваскуларен синдром с не напълно изяснена етиопатогенеза, който води едновременно до морфологични и функционални разстройства в сърдечно-съдовата система.

Хипертонията е водещ 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. Изведена е 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-малки от разходите, свързани с лечението на усложненията.

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% (Akasu et al.) от пациентите не се повлияват или не толерират терапевтично АСЕ инхибиторите. Тази констатация е причината за задълбочени проучвания по отношение патогенезата на АХ, като сред най-често разглежданите въпроси и дискусии са алтернативните ангиотензин I образуващи пътища, генетичните фактори за есенциалната хипертония и техните взаимодействия с факто-

рите 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 ACE инхибиторите с акцент върху ролята на I/D полиморфизма в ACE гена, оксидативния статус на пациента и активността на ACE-независимите пътища.

В литературния обзор е разгледана епидемиологията и рисковите фактори в генезата на АХ. Представени са някои от изследваните генетични полиморфизми, асоциирани с есенциална хипертония, с акцент върху I/D ACE полиморфизма.

Подробно е разгледана ренин-ангиотензинова система включително "локалната" РААС, алтернативните ангиотензин II-образуващи пътища и механизъм на ACE инхибирането.

Дефиниран е „оксидативен стрес“ с подробно разглеждане на неговото физиологично значение и състоянията, които са свързани с дисрегулация на ROS метаболизма. Посочени са източниците на свободни радикали в съдовите клетки (с акцент върху ензима NADPH оксидаза). Акцентира се върху проучвания, касаещи връзката между оксидативен стрес и повишено кръвно налягане.

I. 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.

II. ЗАДАЧИ

2.1. Подбор на група пациенти с АХ (до II степен), отговарящи на опреде-лени 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 опреде-лени 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 зависи-мост 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.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В дисертационния труд са включени изследвания при 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 бяха 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];

Пациентите са диагностицирани и лекувани от наблюдаващия ги общопрактикуващ лекар или кардиолог. Изборът на

[1] Поради проучване на връзката между липидния профил на пациентите и серумното ниво на химаза, лица с установена при изследването дислипидемия не бяха изключени от проучването.

вида на АСЕ инхибитора, АРБ и комбинираното лечение е направен от лекуващия лекар, при спазване на съответните ръководства на *Европейското кардиологично дружество*. Информираното съгласие е изготвено в писмен вид и е подписано от всеки пациент, преди да бъде включен в проучването.

1. Групи пациенти с АХ според терапията ми:

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

Таблица 1. Основни характеристики на пациентите, включени в дисертационния труд

1а) Възрастово разпределение

	АСЕ 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

1б) Хипертензивен контрол

	Контролирана хипертония	**Неконтролирана хипертония**
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

2. Контролна група

20 души – нормотензивни доброволци, съответстващи по пол и възраст на включените в проучването пациенти

Оценка на хипертензивния контрол

• Пациентите са с диагностицирано заболяване от минимум 6 месеца, с назначена съответна терапия. Проследяването се осъществява от ОПЛ или превантивен кардиологичен кабинет:

– добър контрол – отчитане на оптимално, нормално или високо нормално АН при всеки контролен преглед, вкл. съобщените от пациента стойности при измерване в дома.

– „неконтролирани“ болни – установени стойности на АН систолно > 139 mm Hg и/или диастолно > 89 mm Hg при поне два различни по време контролни прегледа и съобщени повишени стойности на АН при домашно мониториране.

• Към „неконтролираната“ група включваме и пациентите с понижение на кръвното налягане при проведеното лечение, без да бъдат достигнати таргетните стойности.

• При „неконтролираните“ хипертоници липсата на терапевтичен ефект е отчетена още при започване на терапията, т.е. не няма период, през което да е бил постигнат адекватен хипертензивен контрол.

Изследване на оксидативен статус

Изследвахме показатели в реално време („real time“)

• ROS продукти – реактивоспособни химични видове, съдържащи кислород; включва пероксиди, супероксид хидроксилен радикал и синглет кислород – метод ЕПР спектроскопия

• Аскорбатни радикали – метод ЕПР спектроскопия

• •NO радикал в кръвен серум – метод ЕПР спектроскопия.

Изследвахме крайни продукти на окисление на липиди, протеини и нуклеинови киселини.

• Плазмените нива на липидно перокисление (MDA) – спектрофотометрични методи;

• Нивото на модифицираните протеини в кръвна плазма – PCC – чрез ELISA;

• Количеството на 8-OHdG за ДНК увреждане – чрез ELISA.

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 амплификационния продукт е по-къс и е с дължина 190 bp, означаван като D-алел

Определяне на серумните нива на химаза, ангиотензин 2, ангиотензин конвертиращ ензим и ACE2 – чрез ELISA

За изчисляване на генотипните и алелните честоти на изследваните полиморфизми беше използвана статическа програма – SPSS software, version 21 (IBM, Chicago, IL), и резултатите са представени като процент или като десетична дроб. Статистическата обработка на данните и тяхното представяне в графичен или табличен вид беше извършено с помощта на софтуерните продукти SPSS software, Stastica и Excel.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Генотипно разпределение на ACE полиморфизма при пациенти и контроли

Генотипизирането по ACE полиморфизма беше осъществено при общо 140 пациенти чрез PCR-базиран метод. Наблюдаваното генотипно разпределение на ACE полиморфизма при пациентите (χ^2 = 1.922; df = 2; p = 0.383) и контролите (χ^2 = 1.5; df = 2; p = 0.472) беше в съответствие с очакваното, съгласно закона на Харди-Вайберг. На табл. 2 са представени получените резултати при изследваната група пациенти.

Таблица 2. 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)	Контролирана АХ (n = 86)	Неконтролирана 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%)

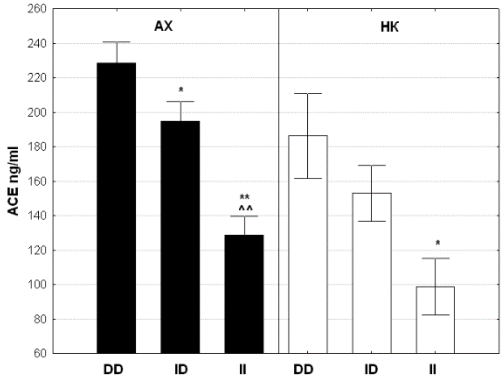
Установените генотипни и алелни честоти в изследваната група пациенти с АХ бяха сходни с контролната група, както и с констатираните при други европейски популации. Не бяха установени

различия в генотипните и алелните честоти между мъже и жени, както и между пациенти с добър или лош контрол на АХ.

При пациентите с неконтролирана хипертония се наблюдава тенденция за по-висока честота на генотипи, съдържащи I-алел (II+ID), докато DD-генотип беше с по-висока честота сред пациентите с контролирана АХ (OR=1.872; 95% CI: 0.847-4.170; p = 0.092). Предвид малката група от нормотензивни контроли последващите анализи бяха фокусирани върху подгрупите хипертоници, разделени в зависимост от пола и контрола на АХ.

2. Ефект на I/D ACE полиморфизма върху фенотипа при АХ пациенти и нормотензивни 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 хипертензивните пациенти и нормотензивните контроли (фиг. 1).

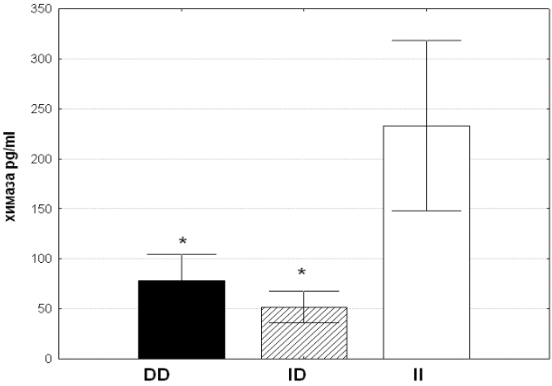


Фиг. 1. Серумни нива на ACE в зависимост от генотипа по ACE I/D полиморфизма при пациенти с АХ и нормотензивни контроли (НК). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка; *p < 0.05; **p < 0.01 в сравнение с DD-генотип; ^^p < 0.01 в сравнение с ID-генотип

При пациенти с АХ генотип-DD бе асоцииран с най-високи серумни нива на АСЕ ензима, следвани от тези при генотип-ID, а най-ниски бяха при II-генотип. Установено беше по-високо серумно ниво (*концентрация*) на АСЕ при пациенти с хипертония, хомозиготи по делецията в АСЕ гена (228.4 ± 76.5 ng/ml) в сравнение с хетерозиготни пациенти (194.8 ± 70.7 ng/ml; p = 0.044) и в сравнение с пациенти, хомозиготи по инсерцията (128.5 ± 55.2 g/ml; p < 0.0001). При хипертониците с генотип-II серумните нива на ензима бяха 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 беше установена статистически значима разлика 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).

Предвид значимия ефект на генотипа по АСЕ полиморфизмът върху количеството серумен АСЕ бе направено предположението, че това би имало ефект и върху серумната концентрация на ангиотензин 2 като продукт на АСЕ ензима. В допълнение предположихме, че АСЕ полиморфизмът може да проявява индиректен функционално свързан ефект върху серумните нива на химаза, като ключов ензим в алтернативния път за синтез на вазоактивния ангиотензин 2. За да проверим тази хипотеза, беше проведен асоциативен анализ в група пациенти (n = 30) от мъжки пол на монотерапия с АСЕ инхибитори, с генотипно разпределение сходно на това в общата група от пациенти с АХ.

Серумните концентрации на вазоактивния ангиотензин 2 бяха сходни между трите генотипа. При генотип-DD бяха установени 18.5 ± 1.5 pg/ml, при генотип-ID – 19.1 ± 1.7 pg/ml, а при генотип-II – 18.4 ± 2.9 pg/ml. По отношение на серумните нива на химаза установихме значимо повишение при генотип-II, който е асоцииран с най-ниските нива на АСЕ ензима (фиг. 2).



Фиг. 2. 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. *p < 0.05 в сравнение с II-генотип

Наблюдават се по-високи серумни нива на химаза при пациенти с генотип II (нископродуциращ 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 в 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 3. Съпоставка на алелното разпределение при пациенти според серумната концентрация на химаза

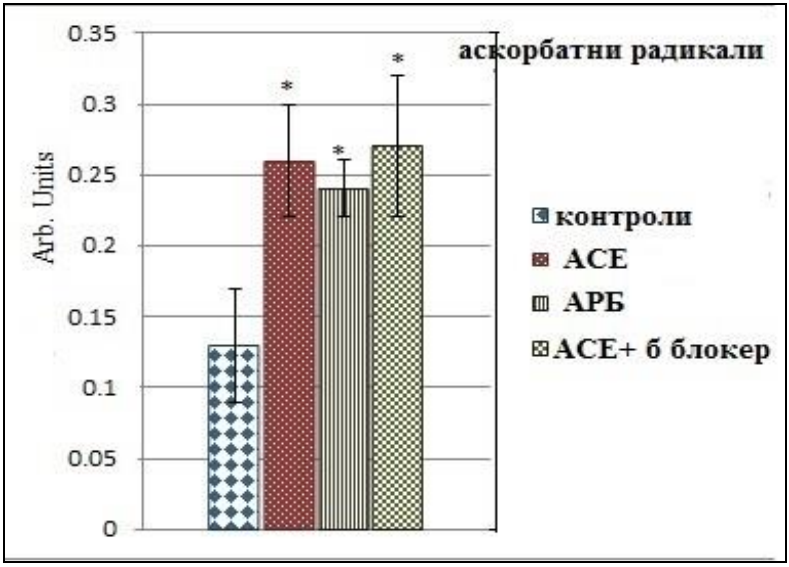
	Висока химаза (над 37.86 pg/ml)	ниско ACE (под 37.86 pg/ml)	OR	95% CI	p-value
DD	6 (46%)	7 (54%)	ref		
ID	6 (55%)	5 (45%)	1.4	0.209-9.616	0.682
II	**5 (83%)**	**1 (17%)**	***5.833***	***0.402-175.434***	***0.127***
ID+II спрямо DD	11 (65%)	6 (35%)	2.139	0.387-12.328	0.310
DD+ID спрямо II	12 (50%)	12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

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

3. Показатели на оксидативния стрес и антиоксидантния статус при пациенти с АХ, разделени според вида на приеманата АХ терапия, и в сравнение с нормотензивни контроли

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

3.1.1. Определяне на аскорбатни радикали („real time")



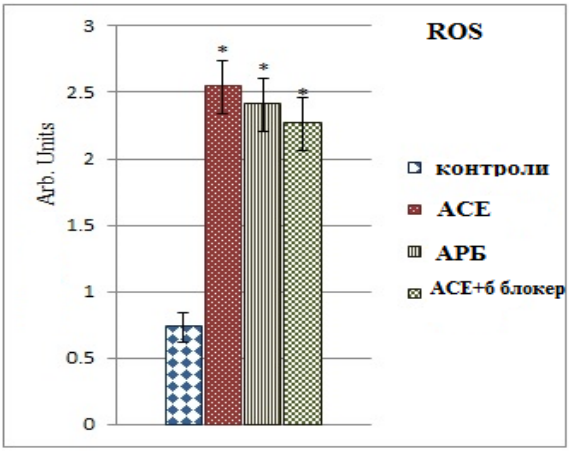
Фиг. 3. Съпоставка между хипертоници, разделени в зависимост от вида на приеманата терапия, и нормотензивни контроли по отношение нивото на аскорбатни радикали. *p > 0.05 спрямо controls

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 при сравнение с контролната група.

Не бе установена статистически значима разлика между пациентите на различен вид антихипертензивно лечение.

3.1.2. Определяне на ROS продукти чрез спин-улавящия агент PBN („real time“)

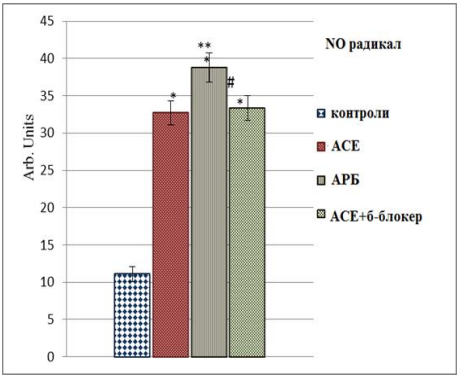


Фиг. 4. Съпоставка между хипертоници, разделени в зависимост от вида на приеманата терапия, и нормотензивни контроли по отношение на нивото на ROS в плазмата

Група	Средна стойност ± стандартна грешка	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

Определяне на нивото на ROS продукти в плазмата показа значително по-високото им ниво при болните с АХ, сравнени с контролната група. Не бе установена статистически значима разлика между пациентите на различен вид АХ лечение.

3.1.3. Определяне на •NO радикала чрез спин-улавящия агент Carboxy-PTIO(„real time“)



Фиг. 5. Съпоставка между хипертоници, разделени в зависимост от вида на приеманата терапия, и нормотензивни контроли по отношение на нивото на генерираните •NO радикали в плазмата

Група	Средна стойност ± стандартна грешка	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 + Bisoprolol	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 разкри значително по-високото им ниво при болните с АХ в сравнение с контролната група. Съпоставянето между отделните групи хипертоници на различна антихипертензивна терапия демонстрира статистически значимо по-високо радикалообразуване при пациентите на терапия с Valsartan 160 mg/дн.:

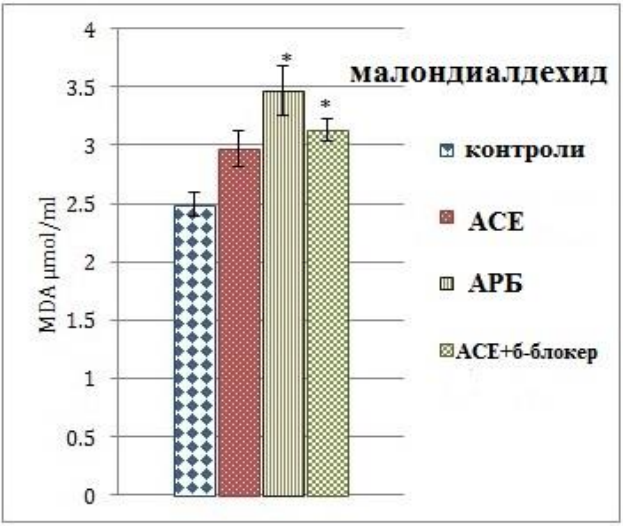
– монотерапия с Lisinopril 5-10 mg/дн. – 32,7 Arb. Units NO radicals спрямо Valsartan 160 mg/дн. – 38,79 Arb. Units NO radicals (**p = 0,03)**;

– 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).**

Този факт представя известно предимство при използване на ACE и ренинови инхибитори пред АРБ по отношение на „real time" показателите на оксидативен стрес.

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

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

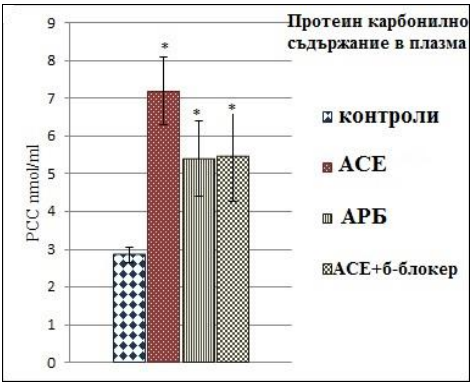


Фиг. 6. Съпоставка между хипертоници, разделени в зависимост от вида на приеманата терапия, и нормотензивни контроли по отношение количеството на продуктите на прекисно окисление в плазмата (MDA – µmol/ml)

Съпоставката в плазмените MDA нива показа значително повишено количеството на продуктите на прекисно окисление в плазмата на пациентите с АХ в сравнение с контролната група. Най-ниска липидна пероксидация между болните бе установена при монотерапия с АСЕ инхибитор, като отчетената стойност не се различава статистически с нивото при здрави контроли.

Група	Средна стой-ност ± стан-дартна 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
Комб. терапия Lisinopril + Bissoprolol	3.13 ± 0.1	p = 0.00 ACE + β-блокер/контроли	АРБ/ACE + β-блокер p = 0.48

3.2.2. Определяне на протеин карбонилно съдържание (PCC)



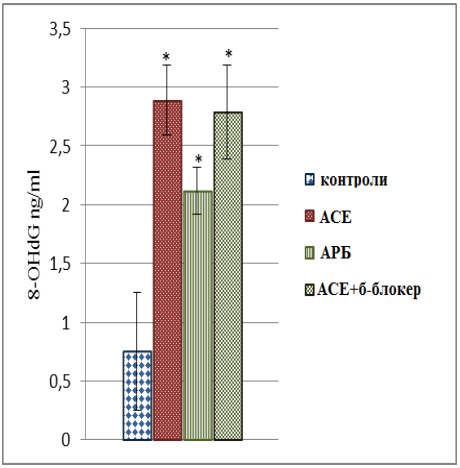
Фиг. 7. Съпоставка между хипертоници, разделени в зависимост от вида на приеманата терапия, и нормотензивни контроли по отношение на протеин-карбонилното съдържание (PCC) в плазмата

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

От направените от нас изследвания става ясно, че при хипертониците протеин-карбонилното съдържание (PCC) е значително по-високо в сравнение със здравите контроли.

Не бе установена статистически значима разлика между пациентите на различен вид АХ лечение.

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



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

Група	Средна стойност ± стандартна грешка	Сравнение с контроли (р-стойност)	Междугрупово сравнение (р-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

Резултатите показват значително по-високи плазмени нива при болните с АХ в сравнение с контролната група. Съпоставянето между отделните групи хипертоници на различна антихипертензивна терапия демонстрира статистически значимо повисока плазмена концентрация на 8-OHdG при пациентите на монотерапия с АСЕ инхибитор в сравнение с монотерапия с АРБ (2,89 ng/mL спрямо 2,12 ng/mL; p = 0,03).

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

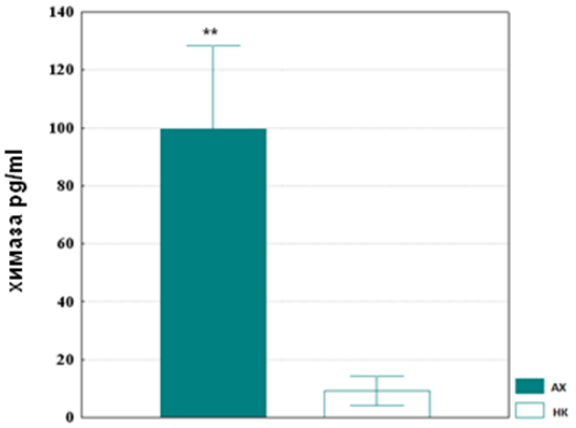
4.1. Изследване на серумните нива на ангиотензин-конвертиращ ензим (АСЕ) и ангиотензин 2

За целите на настоящия научен труд и представяне на съответните корелационни зависимости бяха изследвани серумните нива на АСЕ и ангиотензин 2

Установено беше по-високо серумно ниво (*концентрация*) на АСЕ в общата група пациенти с хипертония (191.8 ± 79 ng/ml) в сравнение със здравите контроли (158.8 ± 47.9 ng/ml; p = 0.047). В зависимост от контрола на хипертонията констатирахме повисоко серумно ниво на АСЕ при пациентите с добър хипертензивен контрол в сравнение с болните с неконтролирана хипертония (212.4 ± 87 ng/ml срещу 191 ± 77 ng/ml), разликата не е статистически значима (p = 0.166).

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 АН 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).

4.2. Определяне на серумните нива на химаза



Фиг. 9. Серумни нива на химаза при пациенти с артериална хипертония (АХ) и нормотензивни контроли (НК). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка, **p < 0.01 в сравнение с контроли

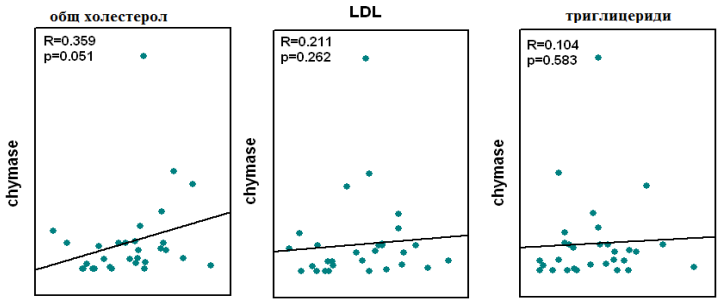
Нашето изследване разкри значително повишени нива на серумна химаза при пациентите в сравнение със здравите контроли (99.6 ± 159 спрямо 9.34 ± 10 pg/ml; p = 0.0076). Разликата в серумните нива на химазата между пациентите с добър и лош контрол на АН е малка и незначима (95 ± 186 спрямо 107 ± 104 pg/ml; p = 0.85)

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

Таблица 4. 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**

При изследването на липидния профил на разглежданата група установихме повишено ниво на общия и LDL холестерол при пациенти с неконтролирана хипертония в сравнение с лицата с добре контролирано АН (5.8 ± 0.96 спрямо 4.5 ± 1.1 mmol/l; p = 0.004; и 3.14 ± 0.99 спрямо съответно 2.4 ± 0.69 mmol/l; p = 0.03). Анализирахме взаимовръзката между серумните нива на химаза и показателите на липидния профил при хипертониците (общия и LDL холестерола, както и нивата на триглицеридите). Наблюдаваше се слаба положителна корелация между серумните нива на химаза и общия холестерол (R = 0,359; p = 0.051) при болните. Не бяха установени значими зависимости между серумните нива на химаза с нивата на LDL холестерола и на триглицеридите.

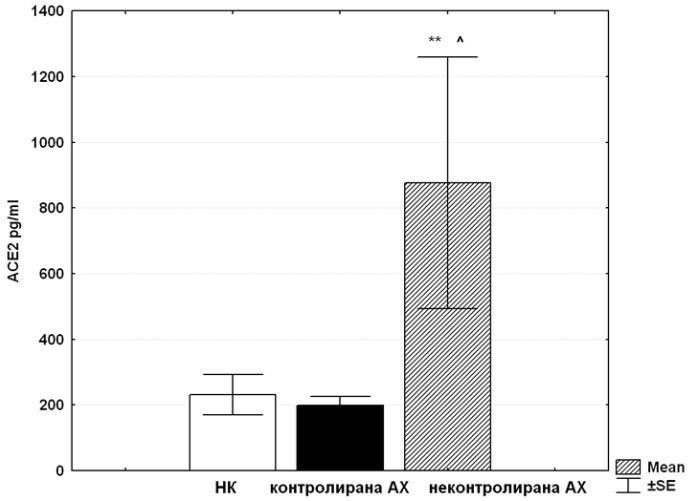


Фиг. 10. Корелационен анализ между химазата, общия холестерол, LDL холестерола и нивата на триглицеридите при хипертензивни пациенти

4.3. Серумните нива на ACE2

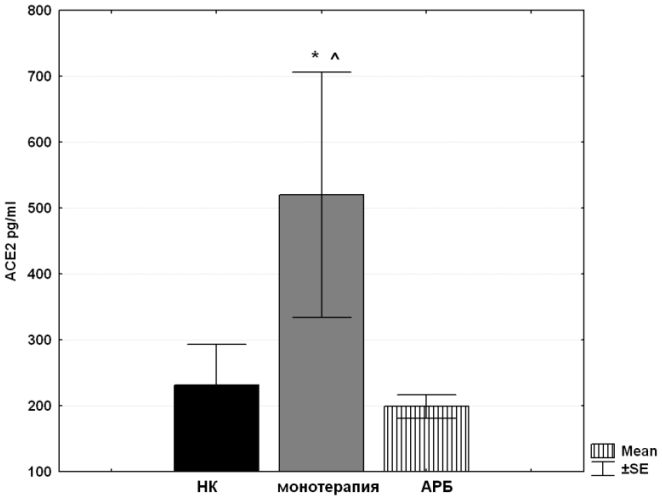
Серумните нива на ACE2 бяха определени при група от 71 пациенти с АХ, от които 14 – на терапия с АРБ, и 57 пациенти – на монотерапия с АСЕ инхибитори, както и при 20 нормотензивни контроли. Установено бе значимо повишение на серумния ACE2 при пациентите с АХ в сравнение с контролите (456.8 ± 150 спрямо 231.1 ± 61.6 pg/ml; p = 0.013).

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



Фиг. 11. 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 < 0.01 в сравнение с контроли; ^p < 0.01 в сравнение с пациенти с контролирана АХ

При анализа на серумните нива на ACE2 в зависимост от вида на терапията при хипертензивните пациенти (фиг. 12) установихме значимо по-високи серумни нива на ACE2 при третираните с монотерапия с АСЕ инхибитори (520.2 ± 186.2 pg/ml) както в сравнение с контролната група (231.1 ± 61.6 pg/ml; p = 0.029), така и при сравнение с пациентите на терапия с АРБ (198.9 ± 18 pg/ml, p = 0.05).



Фиг. 12 Серумни нива на ACE2 при нормотензивни контроли (НК) и пациента с диагностицирана АХ на монотерапия с АЦЕ инхибитори (n = 57) и АРБ (n = 14). Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка; *p < 0.05 в сравнение с контроли; ^p<0.01 в сравнение с АРБ

Като взехме под внимание както вида, така и ефективността на антихипертензивната терапия, бе установено, че значимото повишение на серумен ACE2 при пациентите с лош контрол на хипертонията се наблюдава само при лицата на монотерапия с АСЕ инхибитори. При хипертониците на терапия с АРБ с неефективен или с добър контрол на АХ, серумните нива на ACE2 бяха сходни.

Таблица 5. 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	

V. ОБСЪЖДАНЕ

1. ACE I/D полиморфизъм при пациенти и контроли

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 (Agerholm-Larsen, B. et al., 2000). 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 българска-та популация. Получените от нас резултати съвпадат с резултатите на някои автори, провели аналогични проучвания (Mondry, A., 2005; Castellano, M., 2003; Freitas, S.R.S, 2007; Company, C.,2011; Iwai, N., et al. 1994; Vasku, A. et al., 1998; Tiret, L.et al., 1998). Предвид поставена цел на настоящия дисертационен труд анализите ни бяха фокусирани върху подгрупите пациенти, разделени в зависимост от пола и контрола на АХ, за да се оцени влиянието на генетичните фактори върху терапевтичния отговор към ACE 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 популa-

ция (Lemes, V.A., et al. 2013). 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 (Kh. Dhanachandra Singh et al., 2014), както и при някои националности от китайската раса (Li, Y., et al. 2012).

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 свърза-на с по-високата честота на мъжкия пол (Мокретар, К.,2015).

Резултатите от проведените изследвания сочат, че при пациентите с не-контролирана 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. (2006) считат, че полиморфизмът II детерминира понижаване на трансформиращия растежен фактор-бета1 (TGF-β1) при терапия с ARB. 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 (Agachan, B., 2003), 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 ен-зимна активност от хомозиготите по отношение на инсерцията (генотип-II). Този факт бе потвърден

и при нашите изследвания. При пациенти с АХ генотип-DD е асоциран 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 генотипно-то 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 сравне-ние 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 контроли-рана 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. 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 ACE 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. (2006). Те считат, че I/D ACE полиморфизмът не е модификатор на систолното и диастолното кръвно налягане при терапия с диуретик, бета-блокер, калциев-антагонист или ACE инхибитор. Трябва да отбележим също, че при пациенти на монотерапия или комбинирана терапия средните нива на ACE 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 ACE 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 ен-зима, значимо по-високи от тези при генотип-II.

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.

2. Артериална хипертония и оксидативен стрес

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; Fortuno, A. et al., 2004; Higashi, Y. et al., 2002; Kashyap M. K., 2005; Rodrigo R . et al. 2007; Jeong-Hwa, 2013). 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. (2014), но изследователите работят в посока на възможностите за антиоксидантно лечение, без експериментално доказателство за изказаната хипотеза. Някои авторски колективи развиват идеята за вторично повишено радикалообразуване в резултат на директно стимулиране на съдова NADPH оксидаза при пациенти с есенциална хипертония (Touyz R.M., 2004). 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 (Цветков Н., 2014).

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.

2.1. 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.

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 АСЕ инхибитори, съдържащи сулфхидрилна група (SH-), т.е. предполага се, че "почистването" на свободните кислородни радикали е сулфхидрил-зависимо (Pagan-Carlo, L.A., 1999). 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 АСЕ 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) (Wu, Y. et al., 2013). 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 (Nakamura, K., 2011). 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.

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 (Николова, Г., 2014). Kyaw et al. (2004) посочват атеросклерозата и исхемичната болест на сърцето като заболявания, свързани с небалансирана продукция на ROS. Подобна констатация би могла да се направи и въз основа на получените при нашето проучване резултати, предвид установеното значително повисокото ниво на ROS при болните с АХ.

При всеки от избраните терапевтични подходи се обсъжда известна антиоксидантна активност (Chopra, 1992; Yang, et al., 2007; Gomes, A., 2006), 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 окси-

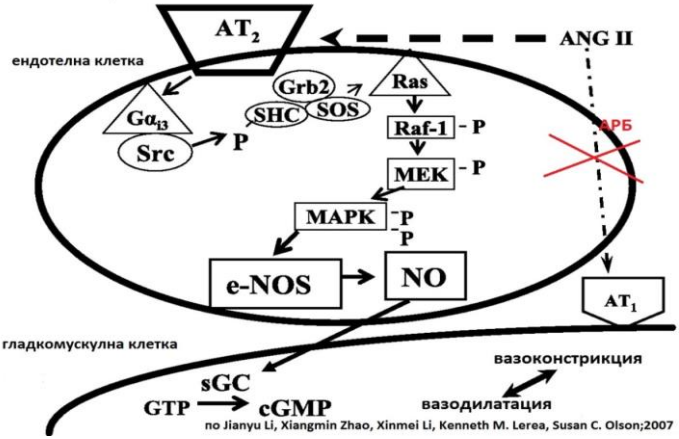
дативния стрес – крайни продукти на окисление на липиди, протеини и нуклеинови киселини.

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 (Bloodsworth, A. et al., 2000, Шкодрова, M.et al., 2010).

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. 13). 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

(Илиев, А и др., 2016). 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. 13. 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

Констатираното представя известно предимство при използване на ACE 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 ACE инхибитор

пред АРБ, дори и при придружаващи заболявания в чийто етиопатогенеза 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.

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

Най-ниска липидна пероксидация установихме при болни на лечение с АСЕ инхибитор, като отчетената стойност не се различаваше статистически с нивото при здрави контроли. По литературни данни от АСЕ 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 (Chopra, M. et al., 1992). 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 АСЕ инхибитори (Chopra, M. et al., 1992). 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.

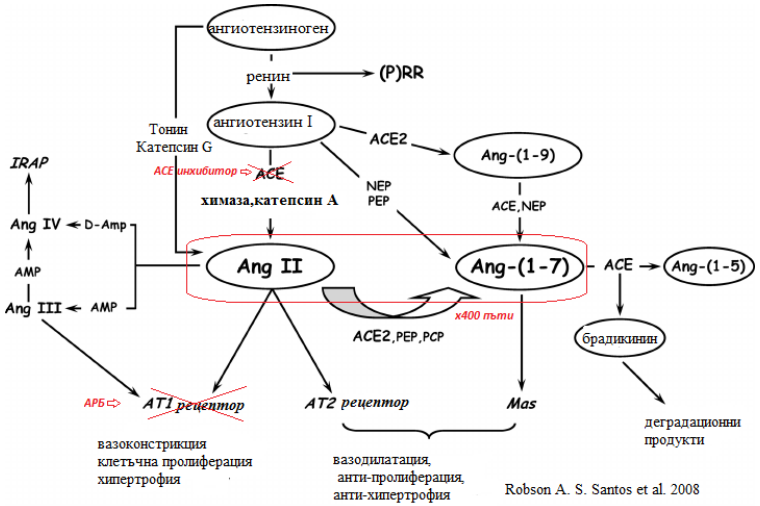
При нашето изследване всички групи болни показаха значително по-високо плазмено протеин карбонилно съдържание в сравнение с контролната група здрави индивиди, без статистически значимо превъзходство на някоя от приложените терапии. Вероятно нито една от избраните терапевтични схеми не е в състояние значително 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 (Yuan, Z., 2004). 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 (Николова, Г., 2014). 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 ACE инхибиторите върху системата ренин-ангиотензин-алдостерон, ангиотензин I може да се метаболизира по

два варианта: **1**) посредством ACE 2 метаболизиране до ангиотензин 1-9 (функцията му все още не е изяснена); от ангиотензин 1-9 чрез ACE 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 ACE 2 до ангиотензин 1-7 (поради ниското ниво на блокиране на РААС на ниво АТ-1 рецептор). ACE 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 ACE 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. 14. Ренин-ангиотензиновата системна каскада – Santos,R. et al., 2008

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-кВ-транслокация към ядрото, което също може да даде обяснение за наблюдаваните резултати.

Изследванията ни представят значимо превъзходство на лечението с АРБ, спрямо АСЕ 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 (2016) при проучвания с мишки установява подобряване на ендотелната функция, намаляване на съдовия и на кавернозния оксидативен стрес при терапия с ирбесартан.

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

3. Протеини от РААС системата

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 реак-

ция) 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 (Dzau, V.J. et al., 2002). 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 (Илиева, А.П., 2016).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 (Schunkert, H., et al., 1993). 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, където високото серумно ниво на ангиотензин II не стимулира свръхпродукция на конвер-

тиращ 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 (Li, Y., et al., 2012). При реализиране на ефекторния механизъм, активността и синтеза на ангиотензин-конвертиращия ензим се понижава. В присъствие на АСЕ инхибитори недостигът на ангиотензин 2 и/или излишъкът на ензимния субстрат ангиотензин 1 индуцират повишен синтез на АСЕ (López-Sendón, J., et al., 2004).

Що се отнася до АСЕ2, 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 АСЕ2 за патогенезата на АХ и сърдечна недостатъчност (192, 193). Установените по-високи нива на серумен АСЕ2 при изследваните от нас пациенти с АХ са в съответствие с тези предходни проучвания. В допълнение, нашето проучване показва значимо повишение на серумния АСЕ2 при пациенти на монотерапия с АСЕ инхибитор с лош контрол на заболяването, за разлика от пациентите на АРБ.

АСЕ2 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-МАРК фосфорилирането на TACE и повишава активността на протеазата. Patel и съавт. Доказват, че блокирането на ангиотензин тип 1 рецептора предотвратява освобождаването на АСЕ2 от мембранно-свързаната му форма в миокарда, което съответно води до повишение на разтворимата форма на АСЕ2 и вероятно корелира със „загуба“ на ензима в тъканите и неговия протективен локален ефект (Patel, V.B. et al., 2014). 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, вероятно, от една страна, се предотвратява освобождаването на ACE2 в циркулация, а от друга, се медиира активиране на AT2 рецептора.

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 (Kennedy, S. et al., 2013). 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 (Илиева, А.П., 2016). 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 (Akasu, M. et al., 1998). За разлика от сърцето на плъх, основният (80%) компонент на ангиотензин II обра-

зуваща активност в левия вентрикул се дължи на човешка химаза (Urata, H., et al., 1994). 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. (2011) 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 (Company, C. et al., 2011), 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 (Stergiou G.S., et al., 2001). 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 сърдечно-съдовата 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 (Arakawa ,K., et al., 2000). 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 миокард-

ната фиброза и сърдечна дисфункция след инфаркт на миокарда (Kanemitsu, H., et al., 2006).

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 (Uehara, Y., et al., 2002). 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 (Akasu, M., 1998) 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 (Uehara ,Y. et al., 2002). 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 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 (Company, C. et al., 2011) 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 сърдечносъдови 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. Нашето изследване показва по-слаба връзка между количествата на химазата и общия холестерол в се-

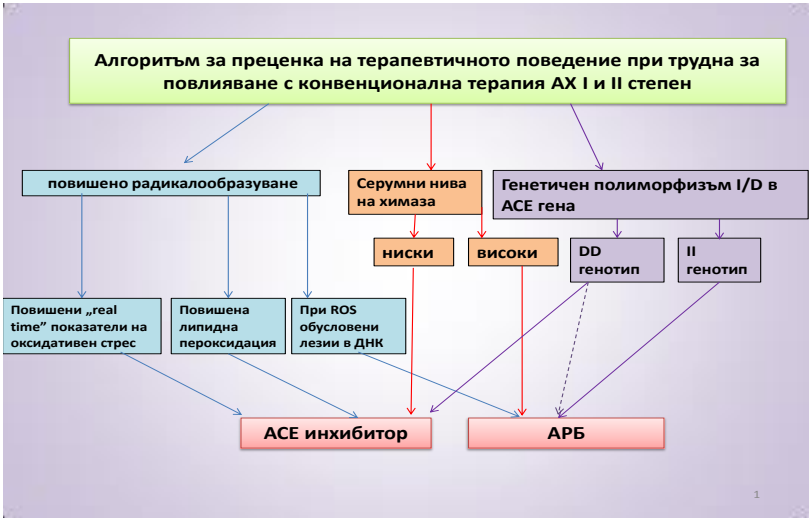
рума и не изследва химазната ензимна активност. Предполагаме, че е възможно усилване на наблюдаваните корелации при обхващане на по-голяма група пациенти.

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. Постигнати-те 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 на-

сочват 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. 15. Алгоритъм за преценка на терапевтичното поведение при трудна за повлияване с конвенционална терапия АХ I и II степен

VI. 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.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

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 ни-ва 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 участие-то 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 ACE 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 ACE2 – хомолог и естествен антагонист на ACE, в патогенезата на есенциалната хипертония при хора

VIII. 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. Kara-malakova, M. Penev, V. Gadjeva: “The influence of synthetically made lisinopril peptide derivate for oxydative chang-es induced by hypertension” – участие с постер.

10. 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.