

**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ И**  
**КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ**  
**Гр. Стара Загора**

---

**Д-Р ПЕТЯ ИВАНОВА ГОЙЧЕВА**

**РОЛЯ НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС ПРИ ТИП 2 ЗАХАРЕН ДИАБЕТ**  
**И СЪДОВИТЕ МУ УСЛОЖНЕНИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**за присъждане на образователна и научна степен**  
**„ДОКТОР“**

**Научна специалност „Ендокринология“**

**Област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт**

**Професионално направление 7.1. Медицина**

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:**

**Доц. д-р Боян Иванов Нончев, д.м.**

**НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:**

**Доц. д-р Мариана Пенкова Радичева, д.м.**

**Стара Загора**

**2022**

Дисертацията е одобрена и насочена за защита на Разширен катедрен съвет на катедра „Пропедевтика на вътрешните болести и клинична лаборатория“, Медицински факултет на Тракийски университет – гр. Ст. Загора на 04.07.2022г. (вътрешна защита). Дисертационният труд се състои от 141 страници и съдържа 31 фигури и 15 таблици. Използвани са 322 литературни източника, от които 11 на кирилица.

Докторантът е асистент в Катедра Пропедевтика на вътрешните болести и клинична лаборатория, Медицински факултет на Тракийски университет – гр. Стара Загора.

Публичната защита ще се състои на ..... в Академичната зала на Медицински факултет, Тракийски университет – гр. Ст. Загора, ул. „Армейска“ №11. Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на МФ – гр. СТ. Загора, ул. „Армейска“ №11, ст. 18, тел.: 664648; 0888273813.

**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
Гр. Стара Загора  
КАТЕДРА ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ И КЛИНИЧНА  
ЛАБОРАТОРИЯ**

**Д-Р ПЕТЯ ИВАНОВА ГОЙЧЕВА**

**РОЛЯ НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС ПРИ ТИП 2 ЗАХАРЕН ДИАБЕТ И  
СЪДОВИТЕ МУ УСЛОЖНЕНИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ  
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД  
за присъждане на образователна и научна степен  
„ДОКТОР“**

**Научна специалност „Ендокринология“  
Област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт  
Професионално направление 7.1. Медицина**

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:**

**Доц. д-р Боян Иванов Нончев, д.м.**

**НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:**

**Доц. д-р Мариана Пенкова Радичева, д.м.**

**Официални рецензенти:**

**Доц. д-р Митко Димитров Митков, д.м.**

**Доц. д-р Нарцис Нисим Калева - Ходжева, д.м.**

**Стара Загора**

**2022**

Експерименталните изследвания по настоящия дисертационен труд са проведени в Клиника по Ендокринология и болести на обмяната и ЦКЛ – УМБАЛ „Проф. Стоян Киркович“ АД, гр. СТ. Загора и в Лабораторията по оксидативен стрес и ЕПР центъра на катедра Химия и биохимия на МФ на ТрУ – гр. Ст. Загора.

Изказвам своята огромна благодарност на проф. Веселина Гаджева, дхн, доц. Борис Попов и Симона Попова, доц. Галина Николова от катедра Химия и биохимия за безрезервната подкрепа и съдействие при разработването и подготовката на настоящия дисертационен труд. Благодаря на научния си ръководител доц. д-р Боян Нончев, м.д. и на научния си консултант доц. д-р Мариана Пенкова, д.м. за ценните напътствия. Най-вече благодаря на сестра си – проф. д-р Мариана Ив. Гойчева, д.м за това, че беше до мен през цялото време.

**СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ:****НА КИРИЛИЦА:**

**T2ЗД** – тип 2 захарен диабет

**ССЗ** – сърдечно-съдови заболявания

**ИБС** – исхемична болест на сърцето

**МСБ** – мозъчно-съдова болест

**ДНК** – дезоксирибонуклеинова киселина

**СЗО / WHO** – Световна Здравна Организация

**ОС** – оксидативен стрес

**СОД** – супероксиддисмутаза

**СМК** – свободни мастни киселини

**СР** – свободни радикали

**НАДФН-оксидаза** - никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидаза

**ТХО** – трихлороцетна киселина

**НА ЛАТИНИЦА:**

**IDF** – International Diabetes Federation

**UKPDS** - United Kingdom prospective diabetes study

**DCCT** - Diabetes Control and Complications Trial

**HbA1c** – гликиран хемоглобин

**ВМІ** - индекс на телесна маса

**LDL** – нископлътностни липопротеини

**HDL** – високоплътностни липопротеини

**VLDL** – много нископлътностни липопротеини

**eGFR** – скорост на гломерулна филтрация

**FPG** – плазмена глюкоза на гладно

**EPR** – Електрон Парамагнитен Резонанс

**ROS** – реактивни кислородни видове

**RNS** – реактивни азотни видове

**(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)** – супероксиден радикал

**(<sup>•</sup>OH)** - хидроксилен радикал

**(NO<sup>•</sup>)** – азотоксиден радикал

**(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** - водороден пероксид

**(HOCl)** - хипохлорна киселина

**NADP(H)** – никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидаза

**CAT** - каталаза

**SOD** - супероксиддисмутаза

**Cu/Zn-SOD** – цитозолна супероксиддисмутаза

**8-OHdG** – 8-хидроксидеоксигуанозин

**CO-proteins** – карбонилирани протеини (протеин карбонилно съдържание)

**AGEs** – Advanced Glycation End products

**LN** – полиненаситени мастни киселини

**LOOH** – липиден хидропероксид

**L•** - липиден радикал

**LOO•** - пероксиден радикал

**GR** – глутатион редуктаза

**GPx** – глутатион пероксидаза

**GSH** – редуциран глутатион

**EDTA** – етилендиаминотетраоцетна киселина

**EDTA-2Na** - двунатриева сол на етилендиаминотетраоцетна киселина

**XO** – ксантин оксидаза

**NBT** – нитро блу тетразол (Nitro Blue Tetrazolium)

**HX** - хипоксантин

**TBA** – тиобарбитурова киселина

**DMSO** – диметил сулфоксид

**DNPH** – динитрофенилхидразин

**NOS (iNOS, eNOS, nNOS)** – азотоксид синтетаза – индуцируема, ендотелна, невронална

**PgI<sub>2</sub>** - простаглицин

**PgF<sub>2α</sub>** – простагландин F<sub>2α</sub>

**TXA<sub>2</sub>** – тромбоксан A<sub>2</sub>

**TNFα** – тумор-некротичен фактор α

**NF-κB** – некротичен фактор капа B

## ВЪВЕДЕНИЕ

Захарният диабет е едно от незаразните заболявания, създаващо сериозни предизвикателства към здравните системи на отделните страни и в глобален мащаб, в опит за справяне с широкото му разпространение и свързаните с него усложнения. Той е потенциално инвалидизиращо състояние с непредсказуем клиничен ход и сериозни последици както за болните, така и за обществото. Прогресиращият му характер е свързан с развитието на редица усложнения, включващи мозъчен инсулт, миокарден инфаркт, невропатия, ретинопатия, нефропатия и други социално-значими заболявания. Сърдечно-съдовите и бъбречните заболявания, асоциирани с диабета обуславят значително натоварване за здравните системи. Като хронично заболяване, диабетът засяга редица аспекти от живота на страдащите от него и като цяло - влошава здравно-обусловеното им качество на живот. Освен това (по данни на СЗО 2019), се счита се за една от десетте водещи причина за смърт в световен мащаб, причинявайки летален изход при около 1.6 милиона души по целия свят и се разглежда като третият най-силен рисков фактор за преждевременна смъртност.

В съвременното се натрупваха убедителни доказателства, подкрепящи ролята на оксидативния стрес като една от основните причини за развитието на тип 2 захарен диабет и неговите дългосрочни съдови усложнения. Състоянието на оксидативен стрес се разглежда като дисбаланс между продукцията на реактивни кислородни видове и тяхното неутрализиране и елиминиране чрез протективни механизми. Установено е, че посредством производството на по-големи количества реактивни кислородни видове, оксидативният стрес е замесен в прогресирането на инсулиновата резистентност, дисфункцията на  $\beta$ -клетките на панкреаса, както и в процесите на съдова дегенерация и ускорената атеросклероза при захарен диабет тип 2. Веднъж образувани, прооксидантите, които са с кратък полуживот, но са силно реактивни, предизвикват увреждане на клетките чрез взаимодействие с голям спектър от клетъчни компоненти и биологични молекули - липиди, протеини и нуклеинови киселини и по този начин обуславят патологичните процеси, въввлечени в съдовите и органните увреди, характерни за болестта.

От друга страна, оксидативният стрес стимулира генерирането на възпалителни медиатори, а възпалението от своя страна повишава производството на реактивни кислородни видове, поради което се създава двупосочност на връзката. В този контекст, в съвременното се лансира тезата, че хроничното нискостепенно възпаление, отключено от оксидативен стрес, е свързано с риска от развитие на диабет тип 2 и че субклиничното възпаление допринася за инсулиновата резистентност и съдовите

усложнения на заболяването.

Нерегулираното производство и функция на прооксидантите, създаващо патогенетичната основа на болестта, ги прави обещаващи кандидат-биомаркери, които биха могли да послужат като индикатор за диагностициране на тип 2 захарен диабет, както и като предиктори за развитие на диабет-специфични усложнения. Поради това ние се насочихме към проучване на оксидативен стрес чрез изследване в циркулацията на някои реактивни молекули и продукти на биомолекулна модификация при тип 2 захарен диабет с настъпили специфични съдови усложнения, за да определим тяхната роля в развитието на заболяването и в частност - връзката им с болестните характеристики, със състоянието на компенсация на заболяването, с провежданата терапия, полезността им като диагностични тестове и прогностичната им стойност за възникването на асоциирани усложнения.

## **ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **Цел на проучването:**

На базата на теоретично – експериментални знания, натрупани през последните години в областта на ОС и актуалността на направените от нас обобщения, си поставихме следната **цел**:

Да се анализира оксидативния профил във връзка с болестните характеристики при болни с тип 2 захарен диабет със съдови усложнения от българската популация, за да се оцени ролята на оксидативния стрес за развитието на заболяването и прогностичното значение на някои от маркерите му.

За постигане на така формулираната цел трябва да бъдат решени следните **задачи**:

1. Да се определят серумните концентрации на прооксидантите (реактивни кислородни видове [ROS], радикали на азотния окис [ $\bullet$ NO], малоналдеhid [MDA], карбонилирани протеини [CO] и 8-хидрокси-2-деоксигуанозин [8-OHdG]) и антиоксидантите (каталаза [CAT], супероксид дисмутаза [SOD] и аскорбат) при болните с тип 2 ЗД със съдови усложнения и да се сравнят с тези при здрави контроли и диабетици без диабет-специфични съдови компликации.
2. Да се направи сравнителен анализ на изследваните прооксиданти и антиоксиданти при компенсирани и декомпенсирани захарни диабетици.
3. Да се изследват факторите, асоциирани със състоянието на компенсация на диабета, измерено посредством серумните нива на гликирания хемоглобин (HbA1c)



4. Да се изследват половите различия в параметрите за оксидативен стрес при болни с тип 2 захарен диабет със съдови усложнения.
5. Да се анализират клиничните асоциации на оксидативните маркери при болни с тип 2 захарен диабет със съдови усложнения
6. Да се изследва диагностичната/предиктивната стойност на тестваните прооксиданти: реактивни кислородни видове (ROS), радикали на азотния окис ( $\bullet\text{NO}$ ), малоналдеhid (MDA), карбонилирани протеини (CO) и 8-хидроксидеооксигуанозин (8-OHdG) за развитието на тип 2 захарен диабет със съдови усложнения.
7. Да се анализират сравнително средните серумни концентрации на прооксидантите и антиоксидантите сред болните с тип 2 ЗД с микро-/макрovasкуларни усложнения по отношение на вида лечение.
8. Да се проучи връзката на болестната продължителност с изявата на диабет-специфични съдови усложнения и ко-морбидности, асоциирани тип 2 ЗД.
9. Да се установи независимото влияние на прооксидантите за развитието на съдови усложнения и съпътстващи заболявания при тип 2 захарен диабет.

## **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **Описание на изследваната кохорта**

В проучването са включени пациенти със ЗД тип 2, изпълващи критериите на СЗО за заболяването [WHO, 2006], които са били насочени за хоспитализация в Клиника по ендокринология и болести на обмяната на УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“, Стара Загора. Проучваната популация се състои от 93 пациенти със ЗД тип 2 и специфични за заболяването съдови усложнения, 94 здрави контроли с нормални тестове за глюкозен толеранс и липса на анамнеза за съдово заболяване или дислипидемия и 16 новодиагностицирани диабетици (тип 2) без прояви на съдово заболяване.

### **Клинични и лабораторни методи за оценка на показателите**

#### **Анамнеза и обективно състояние на болните**

Събрани бяха данни за демографските и клиничните характеристики на болните, включително медицинска история, както и резултати от значими за заболяването лабораторни изследвания. Данните за всеки пациент и здравите лица обобщихме в изготвен за целите на проучването протокол. От всеки участник беше получено писмено информирано съгласие (приложение 3) и проучването беше одобрено от локалната Етична комисия.

Наличието на затлъстяване беше дефинирано въз основа на индекса на телесната маса (BMI)  $> 30\text{kg/m}^2$  (приложение 1).

За всеки пациент беше получена информация относно терапията за диабета с инсулин и/или перорални хипогликемични средства (сулфанилурейни препарати и бигваниди).

Документирани бяха всички налични съпътстващи заболявания на изследваните лица, като по подобие на други проучвания, особен интерес за нас представляваха артериалната хипертония, дефинирана като систолно кръвно налягане  $\geq 140\text{ mmHg}$ , диастолно кръвно налягане  $\geq 90\text{ mmHg}$  или употреба на антихипертензивни лекарства и неалкохолната чернодробна стеатоза.

### **Оценка на макроангиопатичните усложнения**

Пациентите са определени като преживели сърдечно-съдов инцидент, ако имат диагностицирани коронарна болест на сърцето, мозъчно-съдова болест и/или периферна артериална болест.

### **Оценка на микроангиопатичните усложнения**

Верифицирането на наличие или липса на микроангиопатични усложнения, индуцирани от диабета (невропатия, ретинопатия и нефропатия) се основава на диагноза, поставена от лекар-специалист. За полиневропатията - посредством комбинация от физикално изследване и специфични тестове – електромиография и тестване на нервната проводимост и други. За ретинопатията след цялостен офталмологичен преглед, включително провеждане на фундоскопско изследване. Освен чрез документирана диагноза от нефролог, за скринирането и диагностицирането на диабетната нефропатия измерихме албумина в прясна проба от първа сутрешна урина по време на болничния престой, вземайки в съображение, че микроалбуминурията е най-ранният маркер за бъбречно увреждане. Наличие на хронично бъбречно заболяване приехме при редуциран размер на гломерулната филтрация, определен при стойности на eGFR  $< 90\text{ ml/min}$  калкулирани чрез формулата на Cockcroft-Gault [National Kidney Foundation K/DOQI] (приложение 2).

### **Клинично-лабораторни анализи**

За откриване на нарушения в мастната обмяна, изследвахме липидния профил, като венозната кръв на пациентите с диабет и контролите беше събрана сутрин след поне 10 часово гладуване през нощта. Панелът включва измервания на плазмените нива на общия холестерол, нископлътностните и високоплътностните липопротеини и на триглицеридите. Всички стойности са в mmol/L (милимола на литър) и се базират на измервания нагладно, с референтни граници за общия холестерол  $< 5.70$ , за LDL -

холестерол (low-density lipoprotein) до 3.0, за HDL - холестерол (high-density lipoprotein) над 0.90 и за триглицеридите < 5.70. Хиперхолестеролемията беше дефинирана като наличие на високи нива на плазмения холестерол, като следствие от повишаването на холестерола и богатите на аполипопротеин В (apoB) липопротеини, наречени липопротеини с ниска плътност (LDL) или нисък HDL, и/или документирана употреба на липидо-понижаващи средства. Хипертриглицеридемия приехме при повишени стойности на този показател над посочената норма.

Като параметри за гликемичен контрол бяха измерени плазмените концентрации на глюкоза на гладно и гликирания хемоглобин (HbA1c %). HbA1c представлява средна мярка за гликемичната експозиция и плазмените нива на глюкозата ретроспективно, през предходните 8 до 12 седмици. Лош гликемичен контрол възприехме при стойности на HbA1c > 7% и FPG > 6,1 mmol/l.

Кръвно-захарните профили, серумния креатинин, липидите и гликирания хемоглобин бяха изследвани посредством рутинни лабораторни методики в ЦКЛ на УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“, Стара Загора с помощта на затворена система COBAS Integra 400 на фирма Roche.

Венозна кръв се вземаше в Клиника по Ендокринология и болести на обмяната в деня на извършване на изследването чрез венепункция от периферен венозен източник между 8.00 и 10.00 часа преди обяд с антикоагулант комплексон. Кръвта се доставяше в 3,5ml контейнери с антикоагулант EDTA - за отделяне на плазма и еритроцити.

### **Измерване на оксидативните маркери**

Изследванията на оксидативен стрес бяха извършени в лабораториите по “Оксидативен стрес” и “ЕПР спектроскопия” в катедра “Химия и биохимия” на Медицински факултет, Тракийски университет. Спектрофотометричните измервания бяха извършени със спектрофотометър Thermo Science. EPR изследванията бяха извършени при стайна температура на EPR спектрометър X-band EMXmicro Bruker, Germany, оборудван със стандартен резонатор. За изследване на пробите като епруветки бяха използвани кварцови капилярки, които след затваряне се поставят в стандартни EPR кварцови тръбички.

### **Химикали и реактиви**

Използваните реактиви: Xanthine Oxidase from bovine milk (XO), Nitro Blue Tetrazolium (NBT), Нурохантин (HX) (6-Hydroxypurine), 2-Thiobarbituric acid (TBA), Carboxy.PTIO-potassium salt, Dimethyl sulfoxide (DMSO), N-tert-butyl-alpha-phenylnitron (PBN), 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) - са търговски продукт на

фирмата Sigma-Aldrich, USA. За определяне на 8-OHdG използвахме ELISA кит OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit 8-OHdG Quantitation на Cell Biolabs, INC, USA.

### **Биохимични аналитични методи**

Обработка на периферна кръв

Обработка на еритроцити

Депротенизиране на плазмата

### **Спектрофотометрични методи**

Определяне на продуктите на липидно перокисление в плазма

Определяне на супероксиддисмутазна активност (SOD) в еритроцитен лизат

Определяне на каталазна активност (CAT) в еритроцитен лизат

Спектрофотометрично измерване на протеин-карбонилно съдържание в плазма

### **Методи, базирани на електронен парамагнитен резонанс (EPR методи)**

Ex vivo EPR метод за изследване нивото на аскорбатни радикали като маркери за оксидативен стрес в плазма

Определяне нивото на ROS продукти в плазма чрез ex vivo EPR спин улавяща техника

Определяне нивото на •NO радикали в плазма чрез ex vivo EPR спин улавяща техника

Обработване на получените EPR спектри и изчисления

### **Имуно-ензимни методи**

Количествено определяне на 8-OHdG

### **Статистически анализ**

### **Включващи и изключващи критерии**

**Включващи критерии:**

1. Мъже и жени, навършили възраст 18 г.
2. Потвърдена диагноза ЗД тип 2, съгласно критериите на СЗО (2006).
3. Различна продължителност и състояние на компенсация на болестта.

4. Пациенти, лекувани с различни терапевтични режими, съобразно стандарта за лечението на заболяването: инсулин и/или перорални хипогликемични агенти.

#### **Изключващи критерии:**

1. Настояща активна остра или хронична инфекция, включително остър или хроничен вирусен хепатит В и С, HIV инфекция или туберкулоза.
2. Анамнеза за злокачествено заболяване.
3. Диагностицирано хормонално заболяване, различно от ЗД тип 2.
4. Значима коморбидност (кардиоваскуларна, неврологична, бъбречна, чернодробна, метаболитна, гастроинтестинална, хематологична, имунологична и др.) – нестабилно или неконтролирано остро или хронично заболяване.
5. Други заболявания, включително психични, които по мнение на изследователя са неподходящи за включване на болния в проучването.
6. Наличие на диабетна кетоацидоза.
7. Прием на антиоксидантни добавки.

## **РЕЗУЛТАТИ**

### ***Клинични и лабораторни характеристики на изследваните болни***

Общо 93 пациенти с тип 2 ЗД с диабет-специфични съдови усложнения (съотношение мъже: жени 1: 1.3) на възраст от 30 до 88 години, средна възраст (mean  $\pm$  SD)  $64.2 \pm 9.8$  години са включени в проучването. Средната продължителност на болестта беше  $12.7 \pm 8.6$  години с обхват от 1 до 40. Големият диапазон на променливите, свързани с демографските характеристики, отразява обширния спектър на нашата популация със ЗД. Около половината от диабетниците (58.1%) бяха с обезитет. Деветдесет болни (96.8%) имаха диабетна невропатия, 24 (25.8%) имаха ретинопатия и 7 (7.5%) – нефропатия. Пропорцията/делът на болните, страдащи от исхемична болест на сърцето, беше 37.6%. Единадесет от болните (11.8%) имаха анамнеза за мозъчно-съдова болест. Нито един от диабетниците не беше представен със симптоматично заболяване на артериите на долните крайници. Към момента на включване в проучването 54 (58%) от пациентите с тип 2 ЗД със съдово заболяване бяха с лоша компенсация на болестта, дефинирана като  $HbA1c > 7\%$  и стойности на кръвната захар нагладно  $> 6.1$  ммол/л.

По отношение на провежданата терапия, диабетниците с добър гликемичен

контрол (39 пациента) приемаха перорални хипогликемизиращи агенти (сулфанилурейни препарати и бигваниди) ( $n = 32$ ), като при 6 болни бигванидите бяха комбинирани с инсулин; 7 пациенти бяха на монотерапия с инсулин. В подгрупата на диабетиците с лош гликемичен контрол ( $n = 54$ ), 15 бяха лекувани с перорални хипогликемизиращи агенти (сулфанилурейни препарати плюс бигваниди); 39 бяха на инсулинова терапия, при 21 от които тя беше комбинирана с перорален медикамент (инсулин плюс бигваниди).

Сравнението е направено с 94 здрави доброволци, 41 мъже и 53 жени, на възраст от 35 до 83 години, средна възраст (mean  $\pm$  SD)  $56.6 \pm 11.2$  години. Само 7 (7.4%) от контролите имаха леко повишено телесно тегло (BMI 31–33). Участниците бяха съпоставими по пол. Също така, за целите на сравнителния анализ, прооксидантните профили бяха изследвани при малка подгрупа ( $n = 16$ ) от новодиагностицирани болни със ЗД тип 2, които нямаха данни за съдови усложнения, на средна възраст (mean  $\pm$  SD)  $59.6 \pm 12.8$  години (27 – 70 години) и съотношение мъже: жени 1: 1.3. Болните със и без съдово заболяване бяха балансирани/съответстваха по пол и възраст.

На таблица 1 са представени ключовите характеристики на диабетиците с придружаващо съдово заболяване и здравите контроли.

**Табл. 1** Основни характеристики на болните с тип 2 ЗД със съдови усложнения и здравите контроли

Характеристики	Тип 2 ЗД със съдови усложнения (n=93)	Контроли (n=94)	Стойност на <i>p</i>
Възраст (год.), mean $\pm$ SD	64.24 $\pm$ 9.76	56.57 $\pm$ 11.19	<0.001
Пол: мъже/жени	41/52	41/53	0.948
Продължителност на заболяването (год.), mean $\pm$ SD	12.70 $\pm$ 8.65	-	-
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), mean $\pm$ SD	31.52 $\pm$ 5.89	25.23 $\pm$ 3.52	<0.001
BMI > 30 kg/m <sup>2</sup> , n (%)	54 (58.1)	7 (7.4)	<0.001
Кр. захар (mmol/l), mean $\pm$ SD	9.52 $\pm$ 5.18	4.97 $\pm$ 0.32	<0.001
Кр. захар > 6.1 mmol/l, n (%)	62 (66.7)	0 (0)	-
HbA1c (%), mean $\pm$ SD	8.20 $\pm$ 2.06	5.06 $\pm$ 0.27	<0.001
HbA1c > 7%, n (%)	53 (57.0)	0 (0)	-
Холестерол (mmol/l), mean $\pm$ SD	5.12 $\pm$ 1.38	4.43 $\pm$ 0.76	<0.001
Триглицериди (mmol/l), mean $\pm$ SD	2.43 $\pm$ 1.27	1.52 $\pm$ 0.44	<0.001
HDL холестерол (mmol/l), mean $\pm$ SD	1.25 $\pm$ 0.38	1.01 $\pm$ 0.28	<0.001

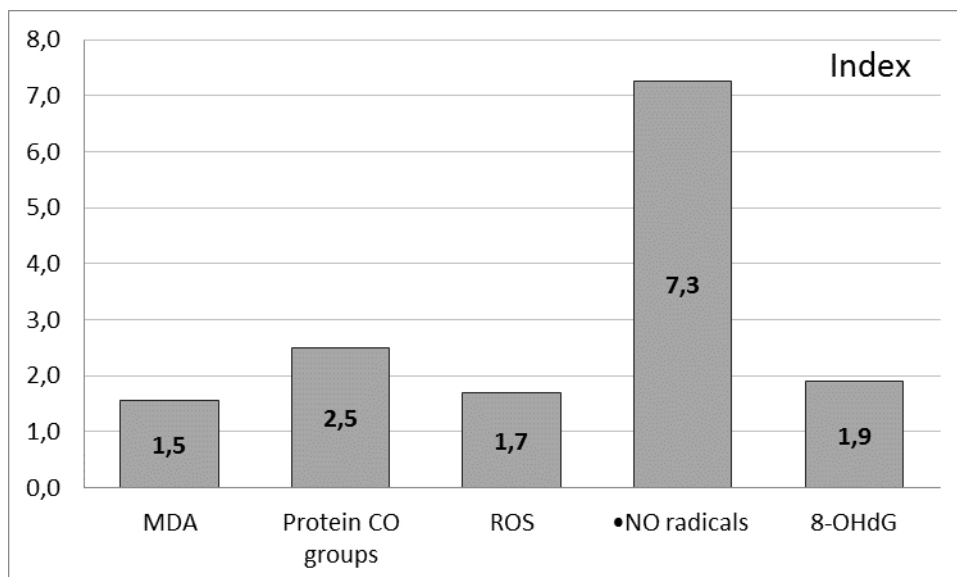
LDL холестерол (mmol/l), mean $\pm$ SD	2.86 $\pm$ 1.10	2.32 $\pm$ 0.62	<0.001
Микроваскуларни усложнения, n (%)			
Невропатия	90 (96.8)	-	-
Ретинопатия	24 (25.8)	-	-
Нефропатия	7 (7.5)	-	-
Макроваскуларни усложнения, n (%)			
ИБС	35 (37.6)	-	-
МСБ	11 (11.8)	-	-
Терапия, n (%)			
Инсулин	25 (26.9)	-	-
Инсулин + перорални хипогликемични агенти	27 (29.0)	-	-
Перорални хипогликемични агенти	41 (44.1)	-	-
ROS (arbitrary units), mean $\pm$ SD	2.01 $\pm$ 0.76	1.19 $\pm$ 1.28	<0.001
MDA ( $\mu$ mol/l), mean $\pm$ SD	3.27 $\pm$ 1.01	2.12 $\pm$ 0.55	<0.001
Протеин СО групи (nmol/mg), mean $\pm$ SD	8.06 $\pm$ 3.81	3.23 $\pm$ 2.58	<0.001
8-OHdG (ng/mL), mean $\pm$ SD	2.34 $\pm$ 1.19	1.24 $\pm$ 0.51	<0.001
•NO радикали (arbitrary units), mean $\pm$ SD	31.22 $\pm$ 3.98	4.30 $\pm$ 5.01	<0.001

BMI = body mass index; HbA1c = glycated hemoglobin; HDL = high density lipids; LDL = low density lipids; ROS = reactive oxygen species; MDA = malondialdehyde; 8-OHdG = 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; •NO радикали = радикали на азотния оксид

### ***Серумни нива на изследваните прооксиданти и антиоксиданти при болните от ЗД и здравите лица***

Серумните концентрации на изследваните прооксиданти и сравнението между групите - болни от тип 2 ЗД със съдови увреждания и здрави контроли е представено в Таблица 1.

Нивата на оксидативен стрес в циркулацията, измерен посредством петте биохимични маркера, бяха значително по-високи и в двете подгрупи диабетици в сравнение със здравите лица, с отчетливо по-високи стойности при тези с признаци на съдова увреда (табл. 1). За по-добро разбиране, съотношението на средните серумни концентрации на прооксидантите при болните със ЗД спрямо здравите индивиди е представено като индекс/числено съотношение (фиг. 1).

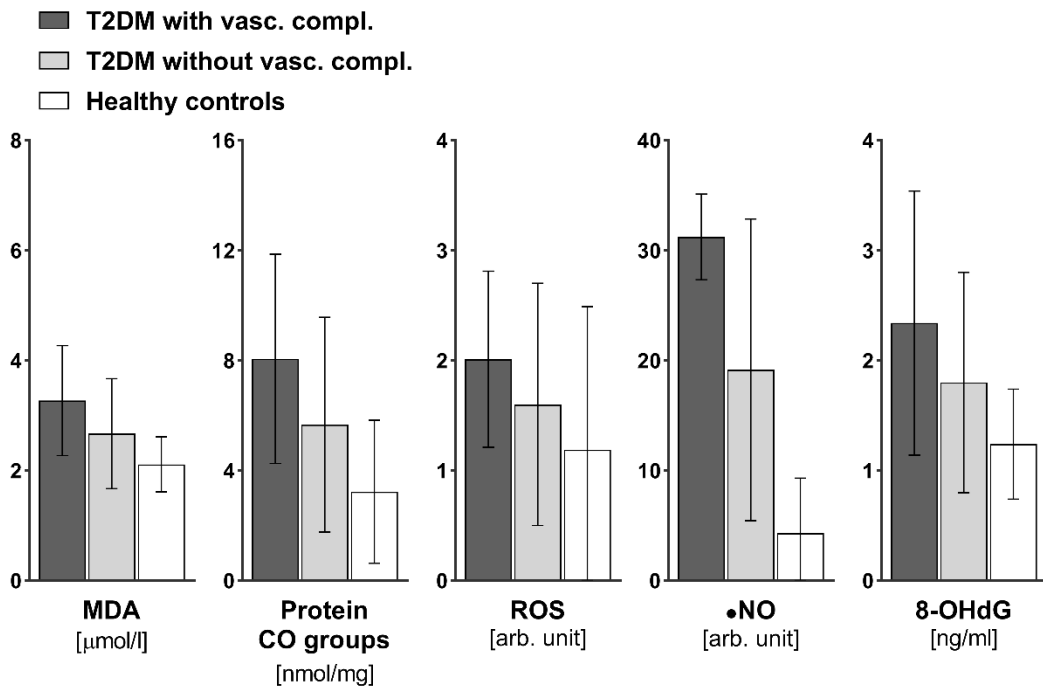


**Фиг. 1** Числено съотношение на средните серумни концентрации на петте прооксиданта при диабетичите спрямо здравите индивиди

Не наблюдавахме значима разлика в серумните концентрации на всички оксидативни маркери сред диабетичите със съдово заболяване, които имаха затлъстяване и тези без затлъстяване ( $p > 0.05$  за всички).

Оксидантните профили сред двете подгрупи диабетичи демонстрираха сигнификантно повишени MDA ( $3.27 \pm 1.01$  vs.  $2.45 \pm 0.65$ ,  $p = 0.001$ ), •NO ( $31.22 \pm 3.98$  vs.  $24.27 \pm 5.87$ ,  $p < 0.001$ ), значимо повишено съдържание на карбонилираните протеини в циркулацията ( $8.06 \pm 3.81$  vs.  $5.58 \pm 1.34$ ,  $p = 0.009$ ) и несигнификантно, но числено по-високи нива на ROS ( $2.01 \pm 0.76$  vs.  $1.61 \pm 0.76$ ,  $p = 0.147$ ) и 8-OHdG ( $2.34 \pm 1.19$  vs.  $1.59 \pm 0.50$ ,  $p = 0.109$ ) при диабет с данни за асоциирано ангажиране на съдовете спрямо липсващо васкуларно ангажиране. На фигура 2 е показан повишения оксидативен капацитет при болни с тип 2 ЗД, независимо от наличието или липсата на съдово заболяване спрямо здравите контроли.

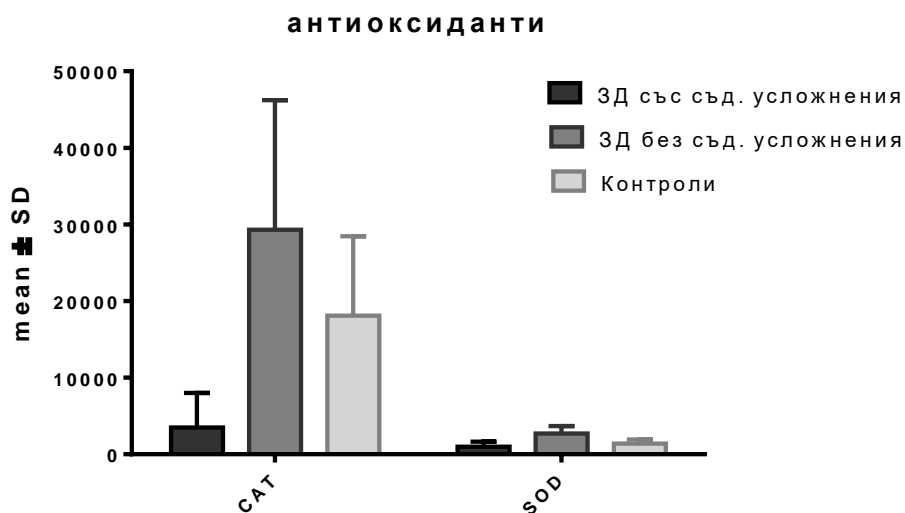




**Фиг. 2** Сравнение на средните серумни концентрации на оксидативните маркери при болните с тип 2 ЗД със и без съдови усложнения спрямо здравите индивиди

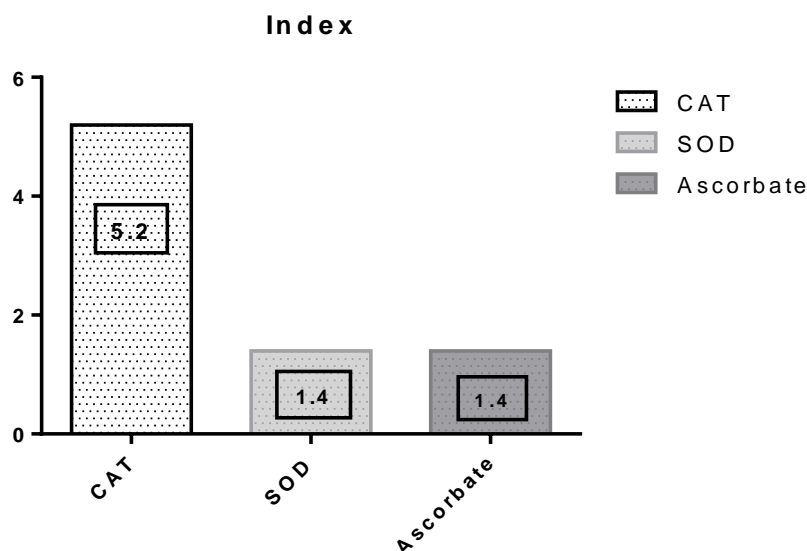
За разлика от диабетиците, като цяло концентрациите на петте прооксиданта в серума на здравите лица показаха неправилно разпределение, вариращо в широки граници в индивидуалните кръвни проби, докато при пациентите със ЗД се установи хомогенност на вариациите в циркулаторните нива, с изключение на тези за 8-OHdG, които показаха асиметрия в разпределението в групата на ЗД със съдови усложнения, вариращо от нива под 25-я перцентил на средните стойности при 21.5% до високи стойности над 75-я перцентил при 24.7% от случаите. Когато пациентите и контролите бяха разделени на подгрупи на базата на 95-тия перцентил на средните стойности на прооксидантите при здравите контроли, 64.5% от пациентите със ЗД имаха стойности на MDA по-високи от 95-тия перцентил спрямо 4.3% от здравите индивиди ( $\chi^2 = 75.41$ ,  $p < 0.001$ ), 39.8% от пациентите със ЗД имаха стойности на карбонилираните протеини по-високи от 95-тия перцентил спрямо 3.3% от здравите индивиди ( $\chi^2 = 35.99$ ,  $p < 0.001$ ), 100% от пациентите със ЗД имаха стойности на •NO по-високи от 95-тия перцентил спрямо 4.9% от здравите индивиди ( $\chi^2 = 1.59$ ,  $p < 0.001$ ), 58.1% от пациентите със ЗД имаха стойности на 8-OHdG по-високи от 95-тия перцентил спрямо 4.9% от здравите индивиди ( $\chi^2 = 54.99$ ,  $p < 0.001$ ). По отношение на ROS 3.2% от пациентите със ЗД имаха стойности по-високи от 95-тия перцентил спрямо 5.3% от здравите индивиди, без сигнификантна разлика ( $\chi^2 = 0.50$ ,  $p = 0.479$ ).

Противоположно на това, установихме сигнификантно по-ниски концентрации на антиоксидантите в серума при тип 2 ЗД със съдови усложнения в сравнение със здравите контроли, както следва: CAT ( $3477.82 \pm 4538.63$  vs.  $18105.14 \pm 10353.63$ ,  $p < 0.001$ ), SOD ( $1001.83 \pm 634.76$  vs.  $1379.52 \pm 562.83$ ,  $p < 0.001$ ) и аскорбат ( $0.21 \pm 0.09$  vs.  $0.29 \pm 0.32$ ,  $p = 0.05$ ). Междугруповото сравнение при диабетците със и без съдови прояви включва само каталаза и супероксид дисмутаза поради липса на данни за аскорбат в подгрупата без съдово ангажиране. То демонстрира също значимо по-ниски стойности на двата антиоксиданта при по-тежката форма на ЗД, обусловена от съпътстващите съдови компликации: CAT ( $3477.82 \pm 4538.63$  vs.  $29314.29 \pm 16925.75$ ,  $p < 0.001$ ), SOD ( $1001.83 \pm 634.76$  vs.  $2700.38 \pm 987.17$ ,  $p < 0.001$ ) (фиг. 3).



**Фиг. 3** Сравнение на средните серумни концентрации на анти-оксидантите при болните с тип 2 ЗД със и без съдови усложнения спрямо здравите индивиди

При здравите лица серумните нива на каталазата бяха 5.2 пъти по-високи, а тези на супероксид дисмутазата и на аскорбата – 1.4-кратно по-високи в сравнение с диабетците (фиг. 4).



**Фиг. 4** Числено съотношение на средните серумни концентрации на трите антиоксиданта при здравите индивиди спрямо диабетците

***Сравнение на изследваните прооксиданти и антиоксиданти съобразно компенсацията на захарния диабет***

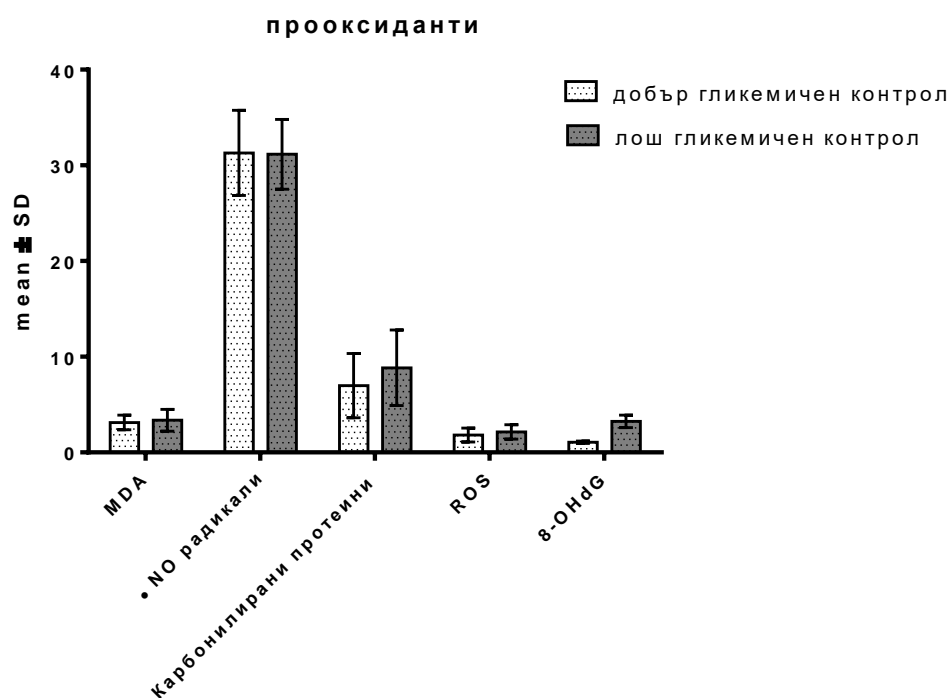
Анализирахме сравнително средните серумни концентрации на тестваните прооксиданти и антиоксиданти при болните със ЗД, съобразно компенсацията на заболяването ( $HbA1c \leq 7$  и кр. зах. нагл.  $\leq 6.1$  спрямо  $HbA1c > 7$  и кр. зах. нагл.  $> 6.1$ ). Нивата на карбонилираните протеини, ROS и 8-OHdG бяха сигнификантно повишени при недобре компенсиран диабет в сравнение със състоянието на добър гликемичен контрол, докато тези на MDA и  $\bullet NO$  бяха сходни при двете състояния (табл. 2, фиг. 5).

**Табл. 2** Средни серумни концентрации на оксидативните биомаркери при пациентите със ЗД, стратифицирани съобразно компенсацията на заболяването.

	<b><math>HbA1c \leq 7</math> и кр. зах. нагл. <math>\leq 6.1</math></b>	<b><math>HbA1c &gt; 7</math> и кр. зах. нагл. <math>&gt; 6.1</math></b>	
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	<i>P</i> стойност*
<b><i>про-оксиданти</i></b>			
<b>MDA</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	3.13 $\pm$ 0.77	3.37 $\pm$ 1.14	0.493
<b><math>\bullet NO</math> радикали</b> (arbitrary units)	31.30 $\pm$ 4.44	31.16 $\pm$ 3.65	0.711

<b>Карбонилирани протеини</b> (nmol/mg)	6.98 ± 3.35	8.84 ± 3.95	0.019
<b>ROS</b> (arbitrary units)	1.81 ± 0.73	2.14 ± 0.76	0.031
<b>8-OHdG</b> (ng/mL)	1.07 ± 0.13	3.25 ± 0.65	< 0.001
<b>анти-оксиданти</b>			
<b>CAT</b> (U/gHb)	3287.13 ± 4512.97	3650.41 ± 4626.13	0.787
<b>SOD</b> (U/ml)	884.61 ± 743.46	1073.83 ± 540.70	0.025
<b>Ascorbate</b> (μmol/L)	0.23 ± 0.07	0.21 ± 0.10	0.155

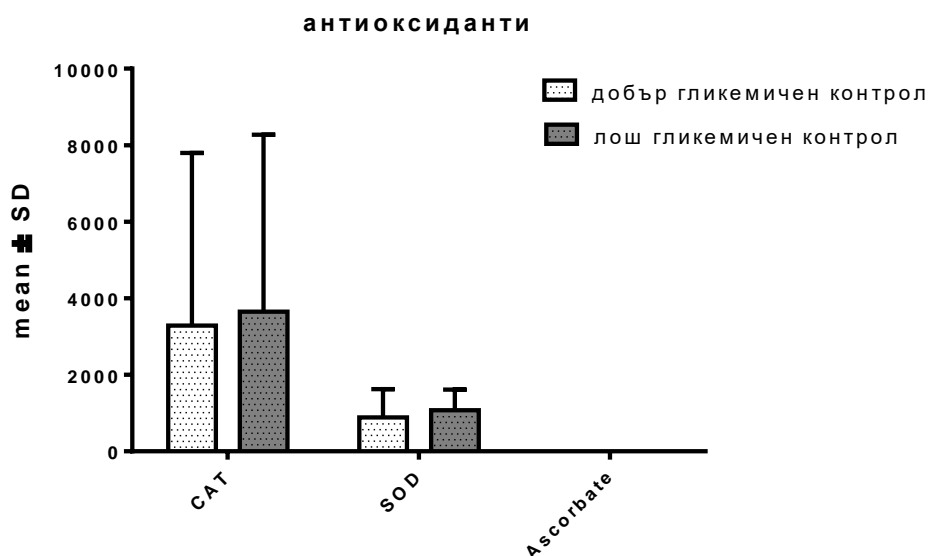
\*Mann-Whitney U test



**Фиг. 5** Сравнение на средните серумни концентрации на оксидативните маркери при болните с тип 2 ЗД със и без съдови усложнения според състоянието на компенсация

Пациентите със ЗД, изявили влошена компенсация, не показаха значима разлика в серумните концентрации на антиоксидантите каталаза и аскорбат спрямо тези с добра

компенсация на диабета, но средните циркулаторни нива на супероксид дисмутазата бяха по-високи при декомпенсирания диабет (табл. 2, фиг. 6).



**Фиг. 6** Сравнение на средните серумни концентрации на антиоксидантите при болните с Т2ЗД със и без съдови усложнения съобразно компенсацията на диабета

**Фактори, асоциирани със състоянието на компенсация на ЗД, измерено посредством серумните нива на гликирания хемоглобин (HbA1c)**

Изследвахме едномерните асоциации между HbA1c и крос-секционно оценените параметри за оксидативен стрес посредством калкулиране на корелационните коефициенти на Pearson. Установихме слаба корелация между HbA1c с карбонилираните протеини ( $r = 0.260$ ,  $p = 0.012$ ) и силна връзка с 8-OHdG ( $r = 0.697$ ,  $p < 0.001$ ) при липса на сигнификантни корелации с другите биохимични маркери.

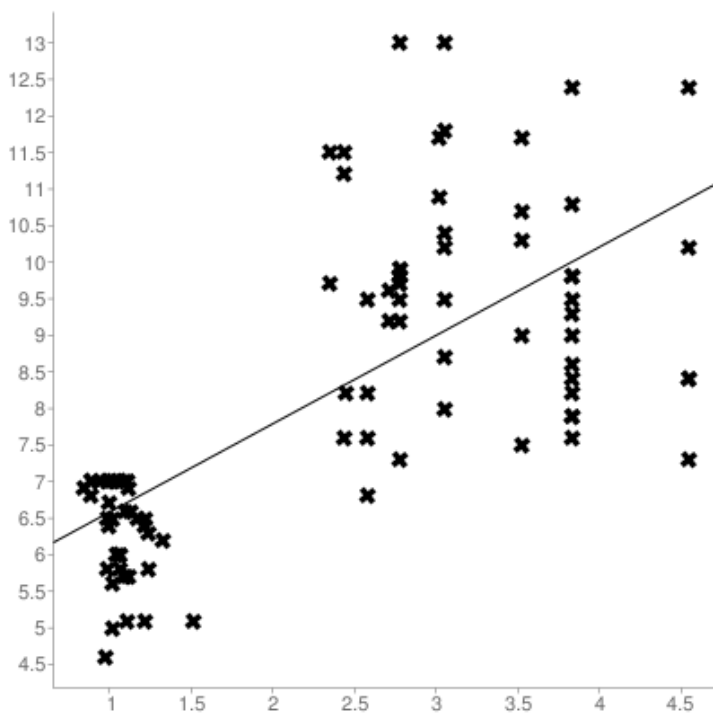
В допълнение, връзката беше изследвана с многофакторен анализ – множествена линейна регресия. Единственият фактор, идентифициран с най-силно влияние върху нивата на гликирания хемоглобин, беше 8-OHdG. Регресионният коефициент и Т-теста за верифициране на сигнификантността са представени на таблица 3. Изчисленият параметър като регресионен коефициент описва връзката между 8-OHdG, допринасящ независимо за обяснението на промените в зависимата променлива (HbA1c). Калкулираният коефициент на детерминация  $R^2$  е 0.537, означаващо че модела обяснява около 53.7% от вариациите в нивата на гликирания хемоглобин.

**Табл. 3** Многофакторна връзка между нивата на 8-OHdG и HbA1c, установена с линеен регресионен анализ

Показател	Коефициенти	95% CI	t	p
<b>8-OHdG</b>	1.209	0.926 – 1.493	8.483	< 0.001
<b>карбонилирани протеини</b>	0.052	-0.041 – 0.144	1.110	0.270

Моделите са коригирани спрямо възрастта, давността на болестта, индекса на телесната маса.

Фигура 7 изобразява резултатите от линейната регресия. Представен е модела на взаимовръзката между HbA1c и 8-OHdG посредством диаграмата на техните пресечни точки. Когато променливите корелират, точките се струпват покрай линията. Колкото по-добра е корелацията, толкова по-плътно точките се движат близо до линията.



**Фиг. 7** Диаграма на разсейване (scatter plot), изобразяваща връзката между гликирания хемоглобин и 8-OHdG. Върху хоризонталната ос (x) е нанесена променливата 8-OHdG, а върху вертикалната ос (y) - HbA1c.

***Полови различия в серумната концентрация на изследваните оксидативни маркери при болните от ЗД и здравите лица***

Не установихме полови различия в концентрацията на карбонилираните протеини, ROS, •NO и 8-OHdG в серума при болните със ЗД ( $p = 0.632$ ,  $p = 0.581$ ,  $p = 0.128$ ,  $p = 0.587$ , респективно). Сигнификантна разлика при страдащите от заболяването наблюдавахме само в циркулиращите нива на MDA, които бяха подчертано по-високи при мъжете спрямо жените ( $p = 0.015$ ). При здравите лица сравнителните анализи

вътре в групата показаха сходни серумни концентрации на карбонилираните протеини, ROS и 8-OHdG при двата пола. Нивата на MDA ( $p = 0.001$ ) бяха значимо по-високи при мъжете спрямо жените (табл. 4).

**Таблица 4.** Сравнение по пол на серумните нива на изследваните оксидативни маркери при болните със ЗД и здравите контроли.

	<b>ЗД</b>	<b>Контроли</b>	
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	<i>P</i> стойност*
<b>MDA (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>			
<b>мъже</b>	3.39 $\pm$ 1.24	2.30 $\pm$ 0.45	< 0.001
<b>жени</b>	3.17 $\pm$ 0.78	1.95 $\pm$ 0.57	< 0.001
<i>P</i> стойност в групата*	0.015	0.001	
<b>Протейн СО групи (nmol/mg)</b>			
<b>мъже</b>	8.46 $\pm$ 4.39	2.87 $\pm$ 2.61	< 0.001
<b>жени</b>	7.74 $\pm$ 3.28	3.52 $\pm$ 2.56	< 0.001
<i>P</i> стойност в групата*	n.s.	n.s.	
<b>ROS (arbitrary units)</b>			
<b>мъже</b>	1.99 $\pm$ 0.76	1.00 $\pm$ 1.01	< 0.001
<b>жени</b>	2.02 $\pm$ 0.78	1.34 $\pm$ 1.44	< 0.001
<i>P</i> стойност в групата*	n.s.	n.s.	
<b>•NO (arbitrary units)</b>			
<b>мъже</b>	31.65 $\pm$ 3.56	6.35 $\pm$ 6.53	< 0.001
<b>жени</b>	30.89 $\pm$ 4.28	2.58 $\pm$ 2.09	< 0.001
<i>P</i> стойност в групата*	n.s.	$p < 0.001$	
<b>8-OHdG (ng/mL)</b>			
<b>мъже</b>	2.37 $\pm$ 1.17	1.33 $\pm$ 0.57	< 0.001
<b>жени</b>	2.32 $\pm$ 1.22	1.17 $\pm$ 0.45	< 0.001
<i>P</i> стойност в групата*	n.s.	n.s.	
<b>Catalase (U/gHb)</b>			

<b>мъже</b>	3830.00 ± 4869.85	21166.63 ± 8949.60	< 0.001
<b>жени</b>	3200.13 ± 4287.26	16314.45 ± 10772.15	< 0.001
<i>P</i> стойност в групата*	n.s.	0.029	
<b>SOD (U/ml)</b>			
<b>мъже</b>	927.41 ± 574.67	1583.30 ± 587.42	< 0.001
<b>жени</b>	1060.50 ± 678.13	1260.32 ± 517.12	0.016
<i>P</i> стойност в групата*	n.s.	0.016	
<b>Ascorbate (µmol/L)</b>			
<b>мъже</b>	0.21 ± 0.09	0.26 ± 0.28	n.s.
<b>жени</b>	0.22 ± 0.09	0.31 ± 0.35	n.s.
<i>P</i> стойност в групата*	n.s.	n.s.	

\*Mann-Whitney U test

Между групите болни и здрави мъже отчетохме сигнификатна разлика в системните нива на каталаза и супероксид дисмутаза, но не и на аскорбат (табл. 4). Сравнението между болните и здравите жени също показва повишени средни стойности на същите антиоксиданти, нивата на аскорбат бяха сходни (табл. 4).

***Връзка на серумната концентрация на изследваните оксидативни маркери с болестните характеристики при тип 2 ЗД с васкуларни усложнения***

Изследвана беше връзката на промените в циркулаторните нива на маркерите на оксидативен стрес с възрастта, пола, болестната продължителност, клиничните (ВМІ, наличието/липсата на микро- и макроваскуларни увреди) и лабораторните параметри (характеризиращи глюкозния метаболизъм, липидния профил, пикочната киселина и бъбречната функция) при тип 2 ЗД с диабет-специфични съдови усложнения.

Изчисленият корелационен коефициент на Pearson показва слаба асоциация на MDA с плазмените нива на кръвната захар на гладно и серумния креатинин ( $r = 0.298$ ,  $p = 0.004$ ;  $r = 0.206$ ,  $p = 0.047$ , респективно) и тенденция за слаба връзка с нивата на урикемия ( $r = 0.233$ ,  $p = 0.087$ ). Калкулирането на бисериалната корелация показва обратна корелация на MDA с диагностицирана диабетна невропатия ( $r = -0.391$ ,  $p < 0.001$ ) и слаба позитивна корелация на този прооксидант с изявата на диабетна нефропатия ( $r = 0.235$ ,  $p = 0.023$ ). Установена беше слаба позитивна асоциация на



карбонилираните протеини с параметрите за гликемичен контрол - гликирания хемоглобин, представляващ средна мярка за гликемична експозиция във времето ( $r = 0.260$ ,  $p = 0.012$ ), както и с моментната гликемия на гладно ( $r = 0.231$ ,  $p = 0.026$ ) и средните глюкозни нива ( $r = 0.275$ ,  $p = 0.008$ ). Аналогично, системните нива на 8-OHdG показаха силна сигнификантна корелация с всички лабораторни параметри, отразяващи нарушенията в глюкозния метаболизъм – с HbA1c ( $r = 0.697$ ,  $p < 0.001$ ), с плазмената глюкоза на гладно ( $r = 0.585$ ,  $p < 0.001$ ) и средните глюкозни нива ( $r = 0.565$ ,  $p < 0.001$ ), слаба обратна корелация със стойностите на пикочната киселина ( $r = -0.278$ ,  $p = 0.040$ ) и тенденция за връзка с нивата на общия холестерол ( $r = 0.184$ ,  $p = 0.078$ ). Плазмените 8-OHdG нива корелираха негативно с диабетната невропатия ( $r = -0.548$ ,  $p < 0.001$ ) и позитивно с наличието на диабетна ретинопатия ( $r = 0.269$ ,  $p = 0.009$ ) и анамнеза за преживян мозъчен инсулт ( $r = 0.306$ ,  $p = 0.003$ ). Намерихме също сигнификантна връзка между ROS и наличието на диабетна ретинопатия ( $r = 0.307$ ,  $p = 0.003$ ) (табл. 5). Не беше установена асоциация за •NO радикали с каквато и да е васкуларна компликация или състоянието на компенсация на диабета. Нито един от прооксидантите не показва връзка с демографските параметри възраст и пол, както и с болестната продължителност и индекса на телесна маса.

**Таблица 5.** Бисериални коефициенти на корелация на прооксидантите с наличието/липсата на микро- и макроаскуларни съдови увреждания

	Диабетна полиневропатия	Диабетна нефропатия	Диабетна ретинопатия	Мозъчен инсулт
<b>MDA</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	-0.391**	0.235*	n.s.	n.s.
<b>Протеин СО групи</b> (nmol/mg)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>ROS</b> (arbitrary units)	n.s.	n.s.	0.307*	n.s.
<b>•NO</b> (arbitrary units)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>8-OHdG</b> (ng/mL)	-0.548**	n.s.	0.269*	0.306*

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$

Серумната супероксид дисмутаза показва корелация с показателите на бъбречната функция – креатининов клирънс, измерващ размера на гломерулната филтрация ( $r = 0.195$ ,  $p = 0.061$ ) и негативна асоциация със серумния креатинин ( $r = -0.248$ ,  $p = 0.016$ ), също така слаба корелация с HDL холестерола ( $r = 0.257$ ,  $p = 0.023$ ) и тенденция за обратна корелация с плазмената концентрация на пикочната киселина ( $r = -0.243$ ,  $p = 0.074$ ). Нивата на аскорбата в циркуляцията демонстрираха обратна корелационна зависимост с параметрите за гликемичен контрол – HbA1c ( $r = -0.198$ ,  $p = 0.057$ ), плазмените глюкозни нива на гладно ( $r = -0.179$ ,  $p = 0.087$ ) и средната глюкозна концентрация ( $r = -0.230$ ,  $p = 0.027$ ). Нивата на каталаза не показаха връзка с нито един от изследваните лабораторните параметри. Подобно на прооксидантите, нито един от трите антиоксиданти не показва зависимост от възрастта, пола и телесното тегло.

***Корелационен анализ (Pearson Correlation) на серумните концентрации на прооксидантите и антиоксидантите***

Установихме слаба положителна корелационна зависимост между циркулиращите 8-OHdG и протеин-СО групи ( $r = 0.276$ ,  $p = 0.007$ ), както и между 8-OHdG и ROS-продуктите ( $r = 0.225$ ,  $p = 0.03$ ). •NO радикали не демонстрираха корелационна зависимост с нито един от изследваните биомаркери на оксидативен стрес. SOD показва слаба обратна зависимост с MDA ( $r = -0.292$ ,  $p = 0.004$ ) и серумния аскорбат ( $r = -0.244$ ,  $p = 0.019$ ) и слаба положителна връзка с ROS продуктите ( $r = 0.267$ ,  $p = 0.010$ ). Аскорбатът също прояви слаба положителна корелация с MDA и ROS ( $r = 0.277$ ,  $p = 0.007$ ;  $r = 0.261$ ,  $p = 0.011$ , респективно), докато между каталазата и карбонилираните протеини наблюдавахме умерена положителна корелация ( $r = 0.326$ ,  $p = 0.001$ ) (табл. 6).

**Таблица 6.** Корелационни анализи (Pearson Correlation) на серумните нива на прооксидантите и антиоксидантите при болните със ЗД

	MDA	Карбон. протеини	ROS	•NO	8-OHdG	CAT	SOD	Ascorbate
MDA	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0.292	0.277
Карбон. протеини	n.s.	-	n.s.	n.s.	0.276	0.326*	n.s.	n.s.
ROS	n.s.	n.s.	-	n.s.	0.225	n.s.	0.267	0.261

•NO	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
8-OHdG	n.s.	0.276	0.225	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.
CAT	n.s.	0.326	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.
SOD	-0.292	n.s.	0.267	n.s.	n.s.	n.s.	-	-0.244
Ascorbate	0.277	n.s.	0.261	n.s.	n.s.	n.s.	-0.244	-

за всички  $p < 0.05$

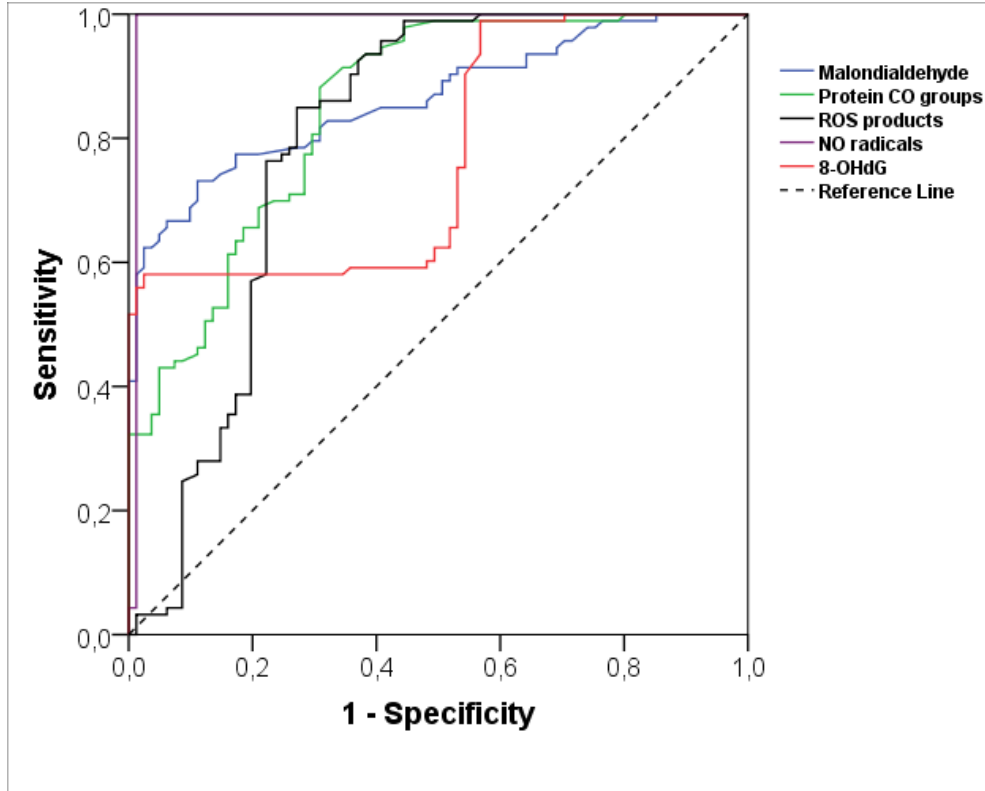
***Предиктивна стойност на изследваните прооксиданти при захарен диабет. Receiver operating characteristic криви с прагови стойности на прооксидантите за детекция на ЗД тип 2 асоцииран със съдови усложнения.***

Анализирахме нивата на прооксидантите в циркулацията при ЗД с васкуларни усложнения в сравнение със здрави индивиди, за да определим тяхната диагностична полезност. За диференциране на предиктивната точност на прооксидантите при откриване на болестта с най-добрата комбинация от стойности на чувствителност и специфичност, изчислихме receiver operating characteristic (ROC). Моделът е осъществен, за да разграничи съответното болестно състояние и липсата на такова.

Фигура 8 показва ROC кривите на различните прооксиданти на фона на болестното състояние с високи прагови стойности за всички биохимични параметри: за MDA 2.49  $\mu\text{mol/l}$ ; за карбонилираните протеини 5.29  $\text{nmol/mg}$ ; за ROS 1.33 арб. единици; за •NO радикали 17.68 арб. единици и за 8-OHdG 1.44  $\text{ng/ml}$ . Сигнификантна площ под кривата беше получена за всички анализирани биомаркери ( $p < 0.001$  за всички) (табл. 7). Достигнатата сигнификантност за петте изследвани прооксиданта ни дава основание да приемем добра диагностична способност на тези биохимични тестове за разграничаване на истински положителния процент болни спрямо фалшиво положителното съотношение, при получените прагови стойности.

Площта под кривата за азотния оксид е много голяма и значително по-голяма в сравнение с тази за другите прооксиданти, достигайки стойност близо до 1, което предполага по-голяма диагностична точност на този биохимичен тест. Площите под кривите за малондиалдехид и карбонилираните протеини са също значителни и с много близки стойности (фиг. 7, табл. 7). Таблица 7 и 8 описва праговите стойности, чувствителност и специфичност, положителна и отрицателна предиктивна стойност за 5-те прооксиданта в двете проучвани групи.

**Фиг. 8** Receiver operating characteristic криви с прагови стойности на оксидативните биомаркери за откриване на ЗД тип 2 с диабет-индуцирани съдови увреди.



**Таблица 7.** Резултати от ROC анализа: площ под кривата, интервал на доверителност, стойност на „p“

Прооксиданти	Площ под кривата	SE	p	95% CI	
Малондиалдехид	0.863	0.027	<0.001	0.809	0.916
Карбонилирани протеини	0.849	0.029	<0.001	0.792	0.905
ROS	0.799	0.037	<0.001	0.726	0.872
•NO радикали	0.988	0.012	<0.001	0.965	1.000
8-OHdG	0.773	0.036	<0.001	0.703	0.843

SE = standard error; p = стойност на p; CI = confidence interval; ROS = reactive oxygen species; ROS = reactive oxygen species; •NO = радикали на азотния оксид; 8-OHdG = 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

**Таблица 8.** Резултати от ROC анализа: cut-off, чувствителност, специфичност, положителна предиктивна стойност, отрицателна предиктивна стойност

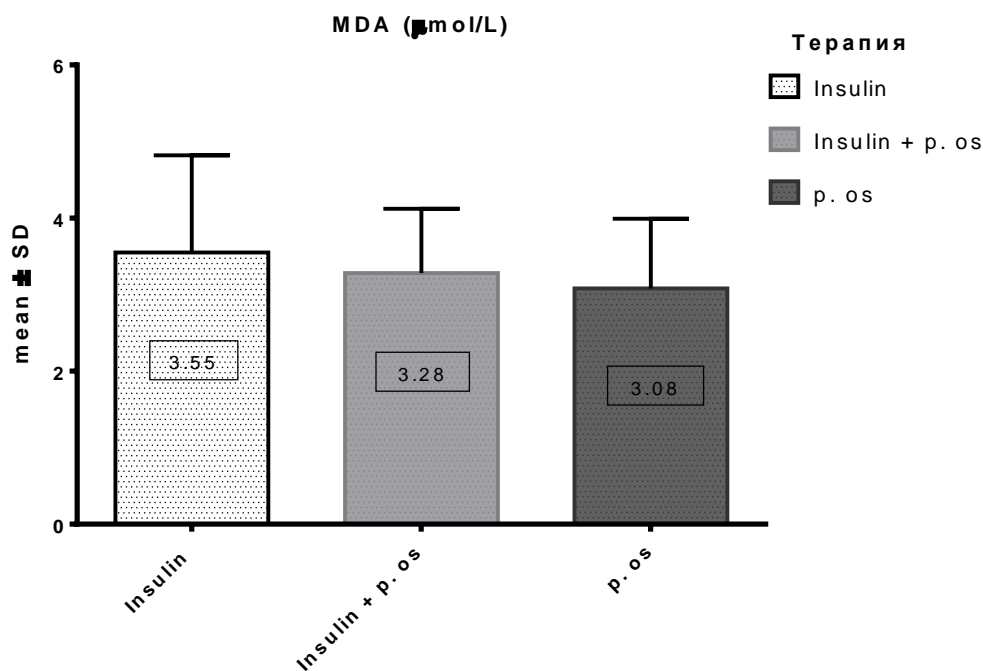
Прооксиданти	Cut-off	Чувствителност (%)	Специфичност (%)	ППС (%)	ОПС (%)

Малондиалдехид	2.49	77.4	77.7	77.4	77.7
Карбонилирани протеини	5.29	71.0	72.5	72.5	71.0
ROS	1.33	77.4	74.5	75.0	76.9
•NO радикали	17.68	100.0	98.8	98.9	100.0
8-OHdG	1.44	59.1	63.0	64.7	57.3

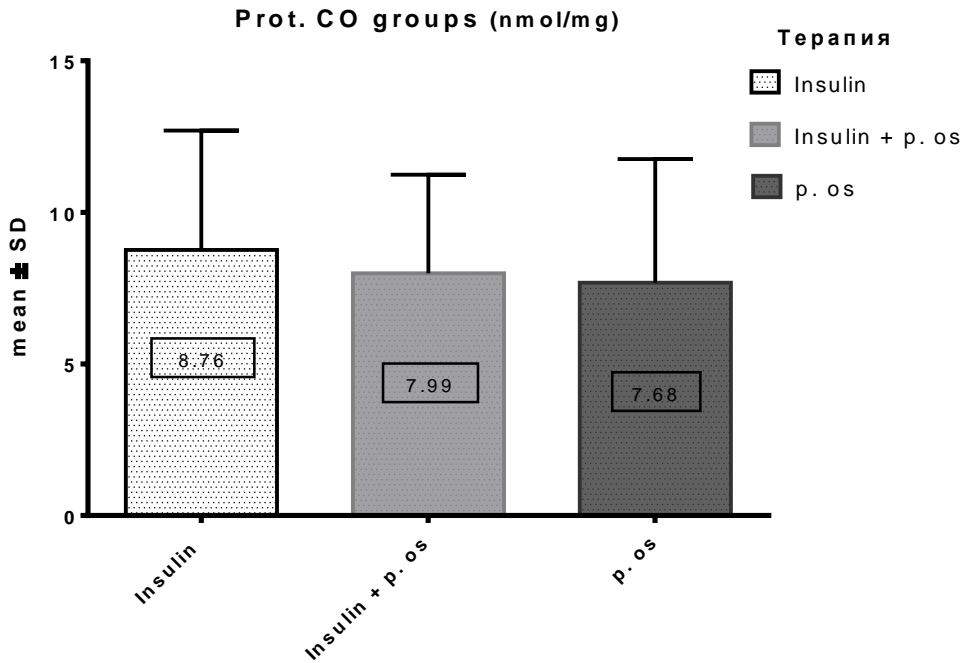
Cut-off = прагови стойности; ППС = положителна предиктивна стойност; ОПС = отрицателна предиктивна стойност; ROS = reactive oxygen species; •NO = радикали на азотния оксид; 8-OHdG = 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

***Сравнителен анализ на средните серумни концентрации на прооксидантите и антиоксидантите сред болните със ЗД тип 2 с микро-/макровакуларни усложнения по отношение на вида лечение***

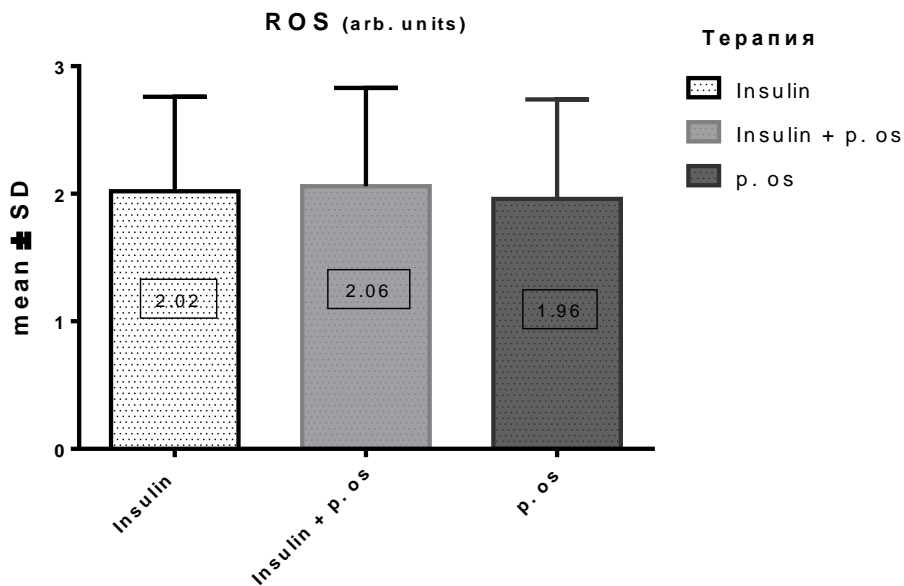
Сравнени бяха подгрупите болни, лекувани с Insulin, Insulin + перорални антидиабетни средства и само перорални антидиабетни средства. Средните серумни концентрации на анализирания прооксидант и антиоксиданти и сравнението им сред болните със ЗД тип 2, лекувани с различни терапевтични режими, е представено на фигури 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 16. Те са съпоставими и не се различават статистически за всички биохимични маркери, с изключение на 8-OHdG, чийто серумни нива бяха сигнификантно по-ниски при пациентите, лекувани с перорални антидиабетни средства ( $p = 0.012$ , One Way ANOVA тест) спрямо болните на лечение с Insulin и/или Insulin + перорални антидиабетни средства.



**Фиг. 9** Серумни нива на малондиалдехид при болните с тип 2 ЗД, лекувани с Insulin, Insulin + перорални антидиабетни средства и само перорални антидиабетни средства. Представен е mean  $\pm$  SD.

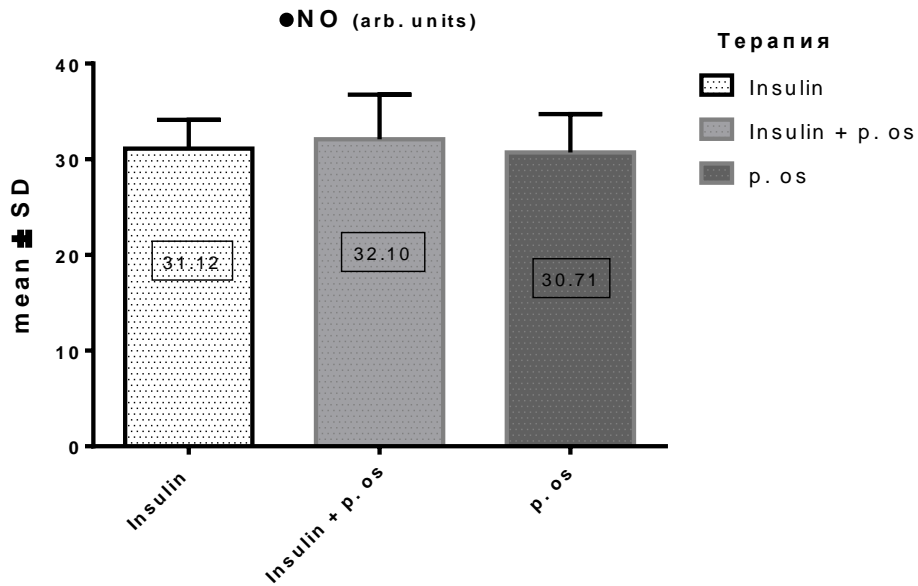


**Фиг. 10** Серумни нива на карбонилираните протеини при болните с тип 2 ЗД, лекувани с Insulin, Insulin + перорални антидиабетни средства и само перорални антидиабетни средства. Представен е mean  $\pm$  SD.

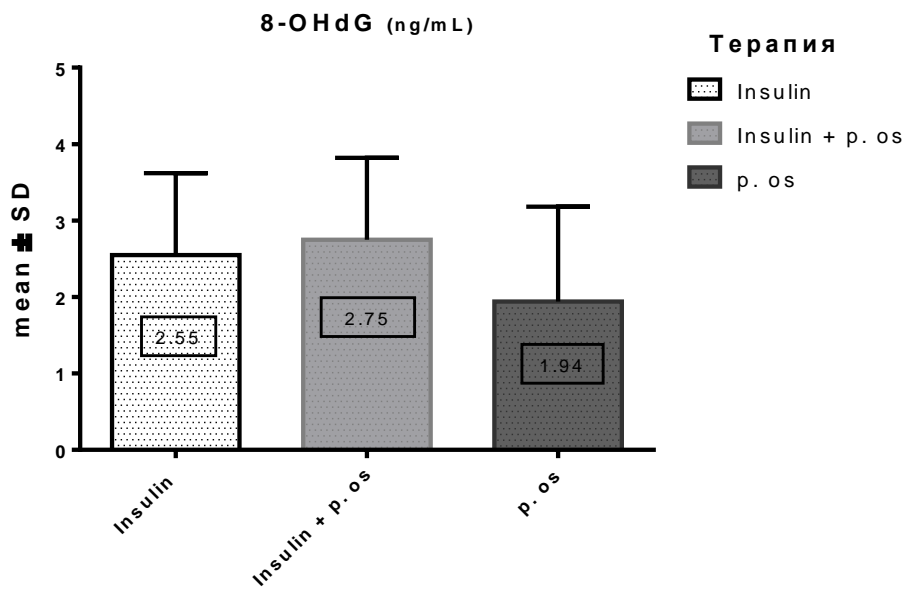


**Фиг. 11** Серумни нива на реактивните кислородни видове при болните с тип 2 ЗД, лекувани с Insulin, Insulin + перорални антидиабетни средства и само перорални

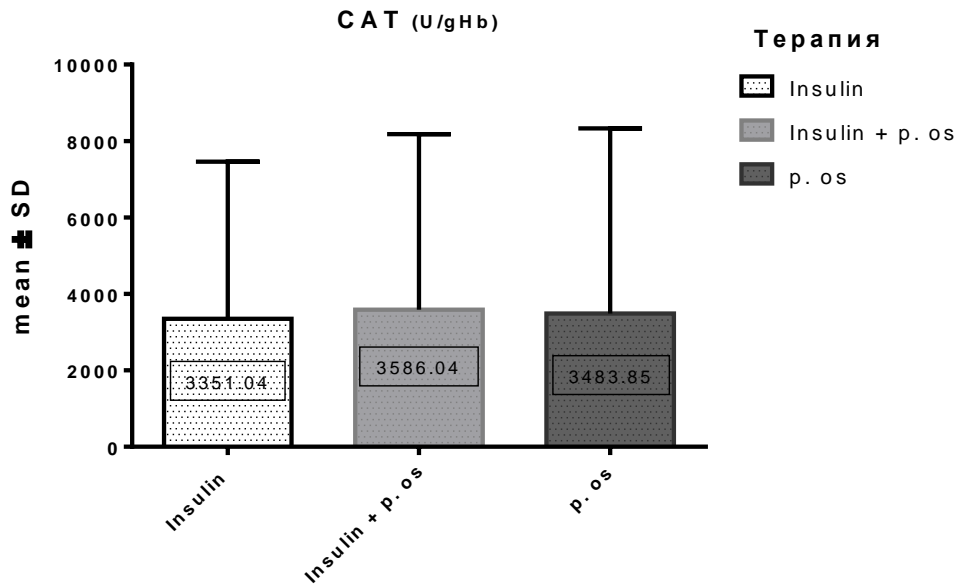
антидиабетни средства. Представен е mean  $\pm$  SD.



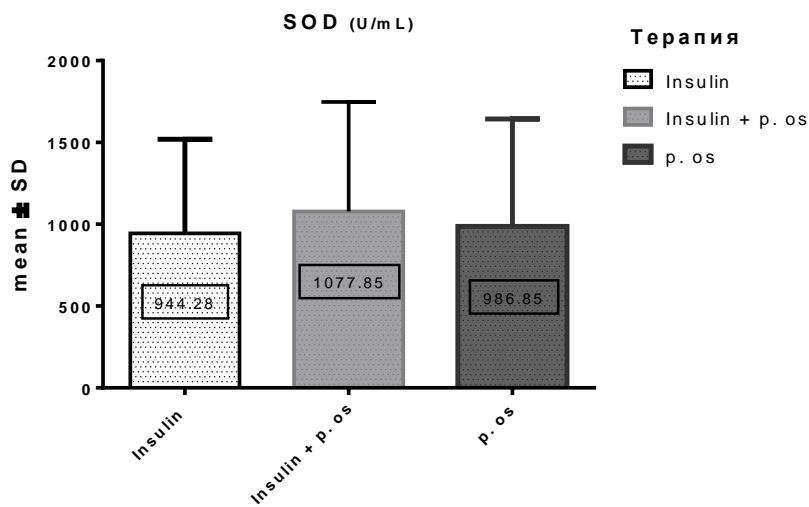
**Фиг. 12** Серумни нива на азотния оксид при болните с тип 2 ЗД, лекувани с Insulin, Insulin + перорални антидиабетни средства и само перорални антидиабетни средства. Представен е mean  $\pm$  SD.



**Фиг. 13** Серумни нива на 8-OHdG при болните с тип 2 ЗД, лекувани с Insulin, Insulin + перорални антидиабетни средства и само перорални антидиабетни средства. Представен е mean  $\pm$  SD.

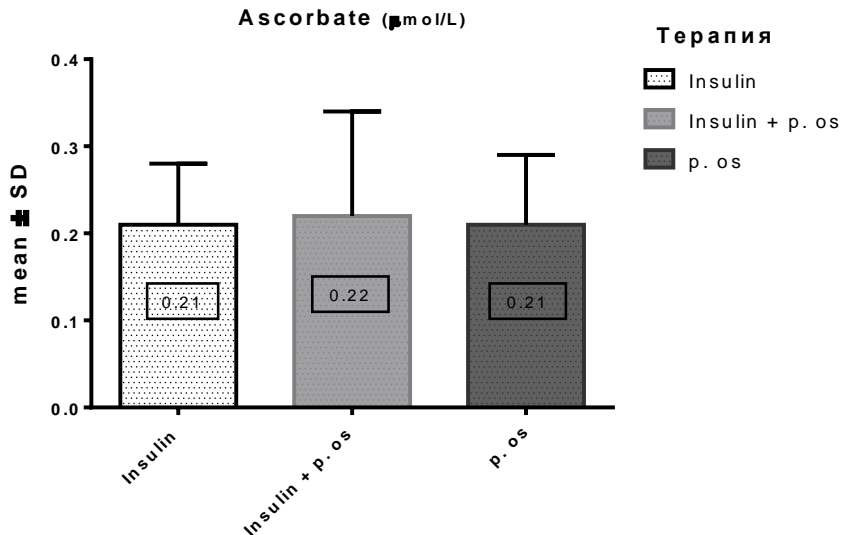


**Фиг. 14** Серумни нива на каталазата при болните с тип 2 ЗД, лекувани с Insulin, Insulin + перорални антидиабетни средства и само перорални антидиабетни средства. Представен е mean ± SD.



**Фиг. 15** Серумни нива на супероксиддисмутазата при болните с тип 2 ЗД, лекувани с Insulin, Insulin + перорални антидиабетни средства и само перорални антидиабетни средства. Представен е mean ± SD.





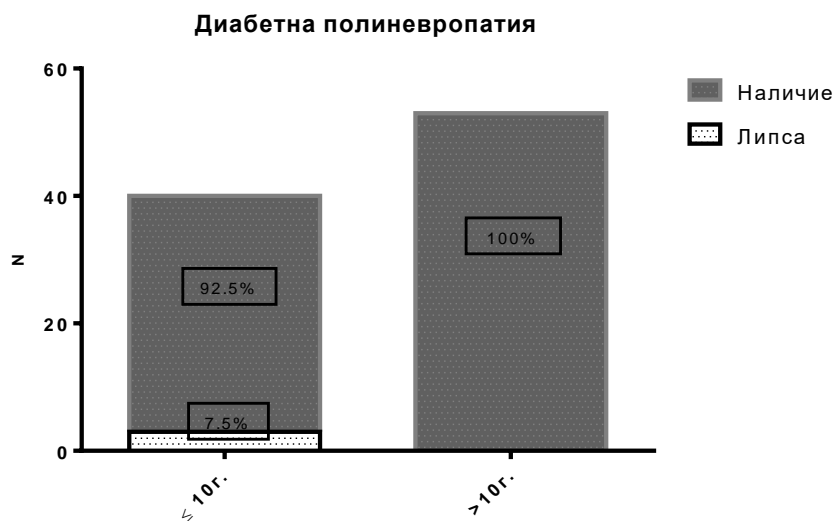
**Фиг. 16** Серумни нива на аскорбата при болните с тип 2 ЗД, лекувани с Insulin, Insulin + перорални антидиабетни средства и само перорални антидиабетни средства. Представен е mean  $\pm$  SD.

***Връзка на болестната продължителност с изявата на диабет-специфични съдови усложнения и други съпътстващи заболявания, асоциирани с тип 2 ЗД***

За да анализираме връзката на изявата на диабет-специфични съдови и други компликации при тип 2 ЗД с нарастването на болестната продължителност, сравнихме наличието/липсата на конкретните болестни прояви при две категории болни – с давност на диабета  $\leq 10$  години и  $> 10$  години.

***Диабетна невропатия***

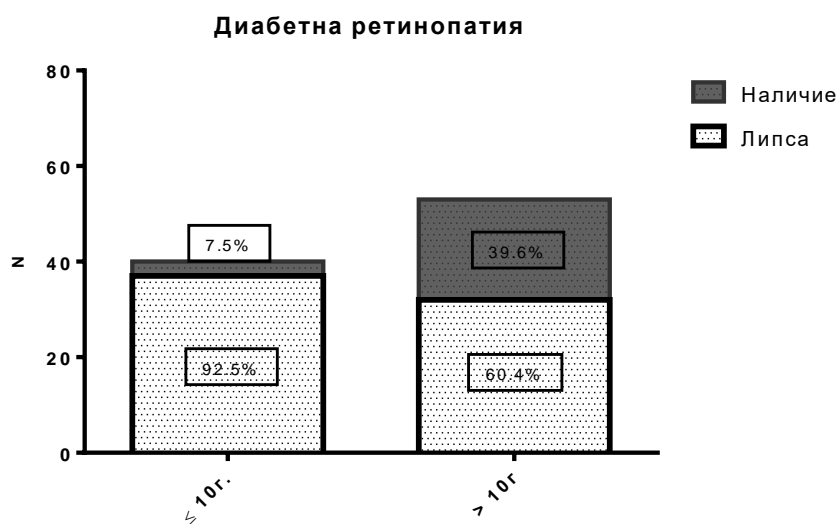
Всички диабетици с болестна продължителност  $> 10$  години имаха диагностицирана диабетна невропатия, без изключение. Делът на страдащите от тип 2 ЗД от по-малко от 10 години, при които липсва такова усложнение, също е много малък - само 7.5%, потвърждаващо освен високата честота на разпространение, също и ранната изява на този тип усложнение като проява на съдово-дегенеративен синдром ( $\chi^2 = 4.11$ ,  $p = 0.023$ ) (фиг. 17).



**Фиг. 17** Процентно съотношение на диабетната невропатия, съобразно давността на болестта ( $\leq 10$  и  $> 10$  години)

#### *Диабетна ретинопатия*

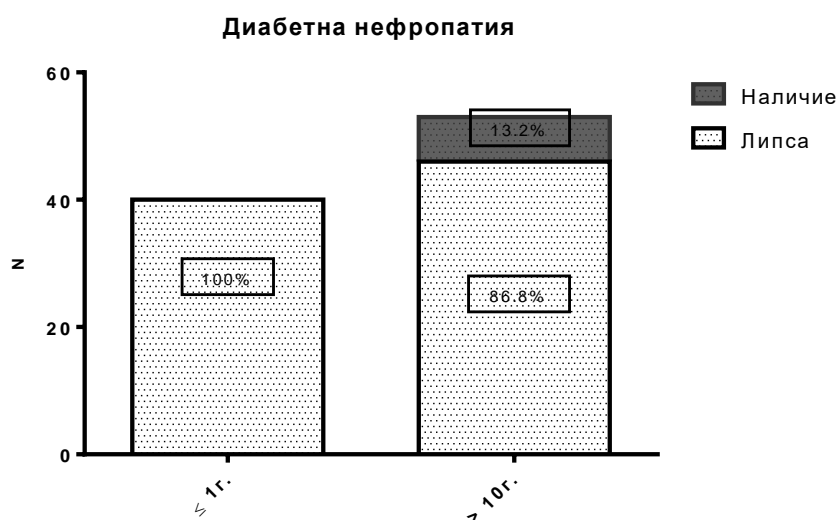
Диабетната ретинопатия беше слабо представена сред диабетиците с давност на болестта  $\leq 10$  години (7.5%), като 87.5% от имащите това усложнение бяха с подълготрайно заболяване. Честотата на срещане на тази съдово-свързана проява при над 10 годишен клиничен ход на заболяването нараства на 39.6%, което е над 5-кратно увеличение ( $\chi^2 = 12.29$ ,  $p < 0.001$ ) (фиг. 18).



**Фиг. 18** Процентно съотношение на диабетната ретинопатия, съобразно давността на болестта ( $\leq 10$  и  $> 10$  години)

#### *Диабетна нефропатия*

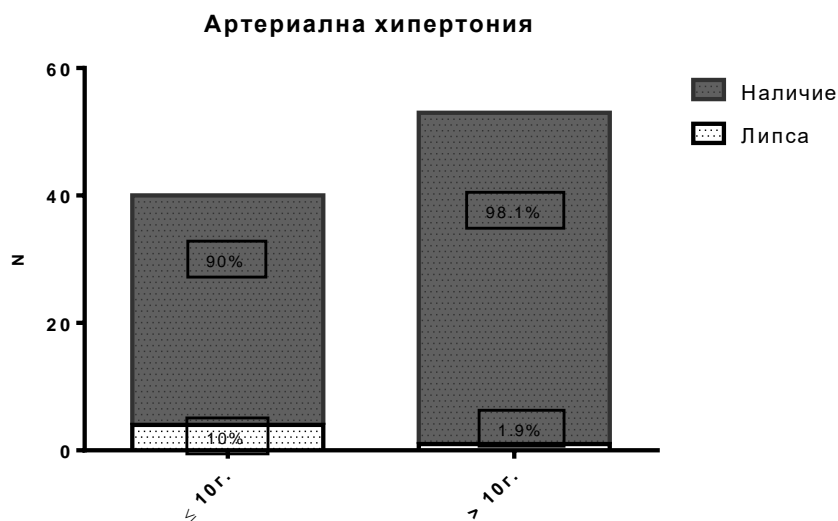
Сред изследваната от нас кохорта диабетици липсваше манифестна нефропатия за по-краткотрайния период от болестна прогресия, дефиниран посредством прагова стойност  $\leq 10$  години. При давност  $> 10$  години, бъбречно ангажиране от болестта наблюдавахме при 13.2% от проучените болни ( $\chi^2 = 5.71$ ,  $p = 0.004$ ) (фиг. 19). Тези резултати бяха констатирани на фона на общо снижение на средните стойности на креатининовия клирънс ( $< 90\text{ml/min}$ ) като мярка за размера на гломерулната филтрация в групата на диабетиците спрямо здравите контроли, които бяха в рамките на лекостепенно увреждане на бъбречната функция ( $67.27 \pm 18.26$  vs.  $98.78 \pm 21.73$ ,  $p < 0.001$ ).



**Фиг. 19** Процентно съотношение на диабетната нефропатия, съобразно давността на болестта ( $\leq 10$  и  $> 10$  години)

#### *Артериална хипертония*

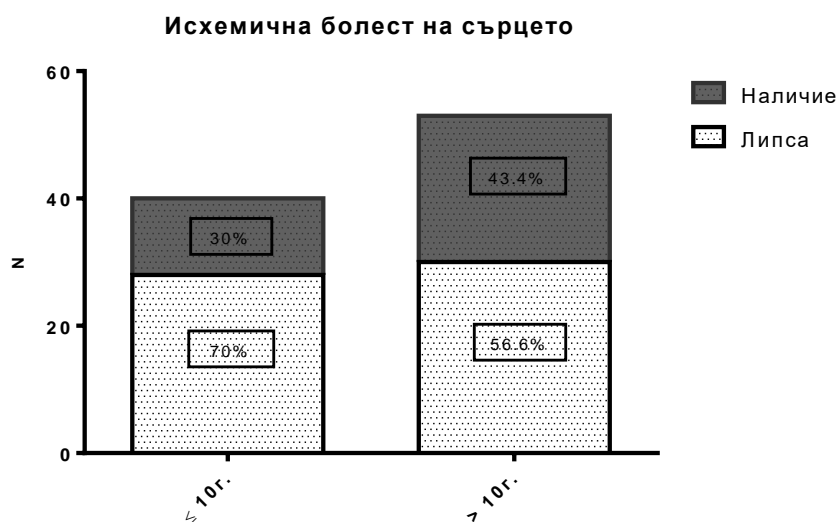
За да изследваме връзката между артериалната хипертония и тип 2 ЗД сравнихме честотното разпределение на това заболяване при различните категории продължителност на диабета. Като цяло, артериалната хипертония беше една от най-честите коморбидности при диабетиците, установена при 94.6% от тях. Сравнителните анализи на пропорционалните разлики в честотата ѝ при дефинираните категории болестна продължителност показват тенденция за повишаване на процентното преобладаване на артериалната хипертония с времето от 90% на 98.1% ( $\chi^2 = 2.950$ ,  $p = 0.082$ ) (фиг. 20).



**Фиг. 20** Процентно съотношение на артериалната хипертония, съобразно давността на болестта ( $\leq 10$  и  $> 10$  години)

#### *Ишемична болест на сърцето*

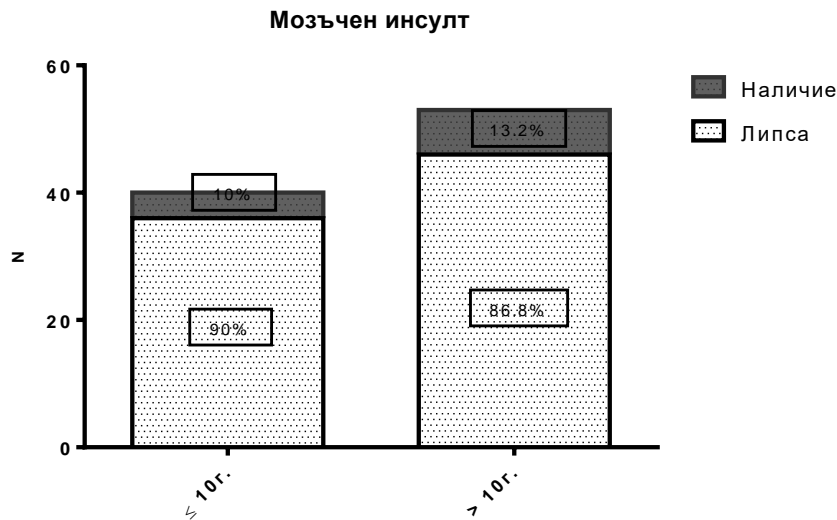
Ишемичната болест на сърцето беше представена сред близо 1/3-та от диабетичите с давност на болестта  $\leq 10$  години (30%), като с нарастването на болестната продължителност се установи числено, но несигнификантно нарастване на честотата на заболяването с 1.5 – пъти и изява при 43.4% от случаите ( $\chi^2 = 1.74$ ,  $p = 0.184$ ) (фиг. 21).



**Фиг. 21** Процентно съотношение на ишемичната болест на сърцето, съобразно давността на болестта ( $\leq 10$  и  $> 10$  години)

#### *Мозъчен инсулт*

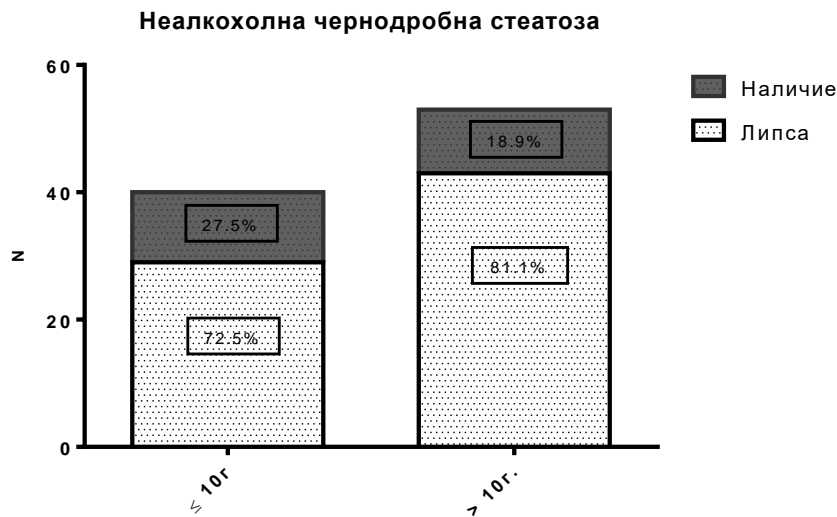
Честотата на срещане на мозъчния инсулт при проучените от нас болни с тип 2 ЗД не се различаваше сигнификантно съобразно болестната продължителност – 10% при давност  $\leq 10$  години и 13.2% при давност  $> 10$  години ( $\chi^2 = 0.225$ ,  $p = 0.633$ ) (фиг. 22). На фона на общия процент случаи от 11.8%, без отчитане на ефекта на времето установяваме, че мозъчно-съдовата болест заема значителен дял дори и в по-ранните етапи на развитие на болестта.



**Фиг. 22** Процентно съотношение на мозъчния инсулт, съобразно давността на болестта ( $\leq 10$  и  $> 10$  години)

#### *Неалкохолна стеатоза на черния дроб*

Стеатоза на черния дроб беше наблюдавана при близо  $\frac{1}{4}$  от включените в проучването пациенти (22.6%). Честотата ѝ не се различава сигнификантно в зависимост от дълготрайността на клиничния ход на диабета и е представена на фиг. 23 ( $\chi^2 = 0.972$ ,  $p = 0.326$ ). С оглед на доказаната асоциацията на чернодробната стеатоза с нарушенията в чернодробния липиден метаболизъм и поради факта, че отклоненията в липидния статус директно или индиректно допринасят за развитието на неалкохолна чернодробна стеатоза, следва да подчертаем абнормно повишените средни серумни нива на триглицеридите при нашата група от болни с тип 2 ЗД (представени в таблица 1), както и установената от нас добра корелация между наличието на стеатоза и триглицеридите в плазмата ( $r = 0.323$ ,  $p = 0.002$ , Biserial correlation coefficient).



**Фиг. 23** Процентно съотношение на неалкохолната чернодробна стеатоза, съобразно давността на болестта ( $\leq 10$  и  $> 10$  години)

*Анализ на независимото влияние на прооксидантите за развитието на диабет-специфичните съдови усложнения и другите съпътстващи заболявания при тип 2 ЗД*

За прогнозиране на отношението на шансовете за изява на конкретните съдови прояви, асоциирани с диабета, както и за таргетните съпътстващи заболявания, които са обект на интерес в нашето проучване, въз основа на стойностите на 5-те прооксиданта, приложихме бинарна логистична регресия. Ефектите на всички предикторни променливи - малондиалдехида, карбонилираните протеини, реактивните кислородни видове, радикалите на азотния оксид и 8-OHdG бяха тествани анблок, за да се оцени тяхната предсказваща способност, при контролиране за възрастта и пола, които бяха включени в модела като ко-вариабилности, не от пряк интерес.

*Диабетна невропатия*

Резултатите от анализа показаха, че никой от прооксидантите не прогнозира вероятността за попадане в категорията на засегнатите от диабетна невропатия (данните не са показани).

*Диабетна ретинопатия*

Установихме, че ROS са рисков фактор за развитието на диабетна ретинопатия. Ефектът на тези биопродукти е близо до сигнификантен и позитивен, като увеличаването на величината им с единица увеличава вероятността за очно ангажиране от болестта с около 1.8 пъти (табл. 9). Моделът класифицира коректно резултата в 76.3% от случаите.

**Табл. 9** Резултати от бинарна логистична регресия за независимото влияние на прооксидантите за изявата на диабетна ретинопатия

Предиктор	$\beta$	$p$	Exp $\beta$
Константа	-4.779	0.136	NA
ROS	0.582	<b>0.088</b>	<b>1.790</b>

$\beta$  - регресионен коефициент,  $p$  - ниво на значимост, Exp  $\beta$  = OR (odds ratio - отношение на шансовете)

#### *Диабетна нефропатия*

Резултатите от бинарната логистична регресия демонстрират, че изследваните прооксиданти не оказват независимо влияние върху диабетната нефропатия (данните не са показани).

#### *Артериална хипертония*

Установихме негативна връзка на радикалите на азотния оксид с артериалната хипертония. OR за  $\bullet$ NO радикали е 0.78, което посочва, че при повишаване на стойността му с единица е 1.3-кратно сигнификантно е по-малко вероятно да предизвика артериална хипертония, дори след отчитане на влиянието на възрастта и пола (табл. 10). Моделът класифицира правилно резултата в 93.5% от случаите.

**Табл. 10** Резултати от бинарна логистична регресия за независимото влияние на прооксидантите за изявата на артериална хипертония

Предиктор	$\beta$	$p$	Exp $\beta$
Константа	13.871	0.034	NA
$\bullet$ NO радикали	- 0.248	<b>0.045</b>	<b>0.780</b>

$\beta$  - регресионен коефициент,  $p$  - ниво на значимост, Exp  $\beta$  = OR (odds ratio - отношение на шансовете)

#### *Ишемична болест на сърцето*

Анализът потвърждава, че нарастването на възрастта е статистически високо-сигнификантен рисков фактор за развитие на ишемична болест на сърцето. Моделът класифицира коректно резултата в 71.0% от случаите. Изследваните прооксиданти не оказват независимо влияние върху развитието на това заболяване (табл. 11).

**Табл. 11** Резултати от бинарна логистична регресия за независимото влияние на

възрастта за изявата на исхемична болест на сърцето

Предиктор	$\beta$	$p$	Exp $\beta$
Константа	- 6.964	0.018	NA
Възраст	0.077	<b>0.007</b>	<b>1.080</b>

$\beta$  - регресионен коефициент,  $p$  - ниво на значимост, Exp  $\beta$  = OR (odds ratio - отношение на шансовете)

#### *Мозъчен инсулт*

Констатирахме позитивна връзка на 8-OHdG с мозъчния инсулт в полза на вероятност събитието да се случи. 8-OHdG показва тенденция към повишаване на риска за изява на мозъчен инсулт 1.77 пъти, след контрол за другите предиктори, т. е. за всяко увеличение на стойността на 8-OHdG с единица, шансът за мозъчен инсулт нараства 1.77-кратно (табл. 12). Моделът класифицира коректно резултата в 87.1% от случаите.

**Табл. 12** Резултати от бинарна логистична регресия за независимото влияние на прооксидантите за изявата на мозъчен инсулт

Предиктор	$\beta$	$p$	Exp $\beta$
Константа	- 7.644	0.078	NA
8-OHdG	0.572	<b>0.070</b>	<b>1.772</b>

$\beta$  - регресионен коефициент,  $p$  - ниво на значимост, Exp  $\beta$  = OR (odds ratio - отношение на шансовете)

#### *Чернодробна стеатоза*

Резултатите от бинарната логистична регресия посочват, че ефектът на малондиалдехида е близо до сигнификантен и позитивен, като шанса за чернодробна стеатоза нараства около 1.6-кратно със всяко повишаване на стойностите на MDA с единица. Освен това, чернодробното заболяване е по-малко вероятно да се изяви при по-възрастните в сравнение с по-младата възраст (табл. 13). Моделът класифицира коректно резултата в 80.6% от случаите.

**Табл. 13** Резултати от бинарна логистична регресия за независимото влияние на прооксидантите и възрастта за изявата на чернодробна стеатоза

Предиктор	$\beta$	$p$	Exp $\beta$
-----------	---------	-----	-------------



Константа	2.477	0.408	NA
MDA	0.479	<b>0.083</b>	<b>1.615</b>
Възраст	- 0.072	<b>0.011</b>	<b>0.931</b>

$\beta$  - регресионен коефициент,  $p$  - ниво на значимост,  $\text{Exp } \beta = \text{OR}$  (odds ratio - отношение на шансовете)

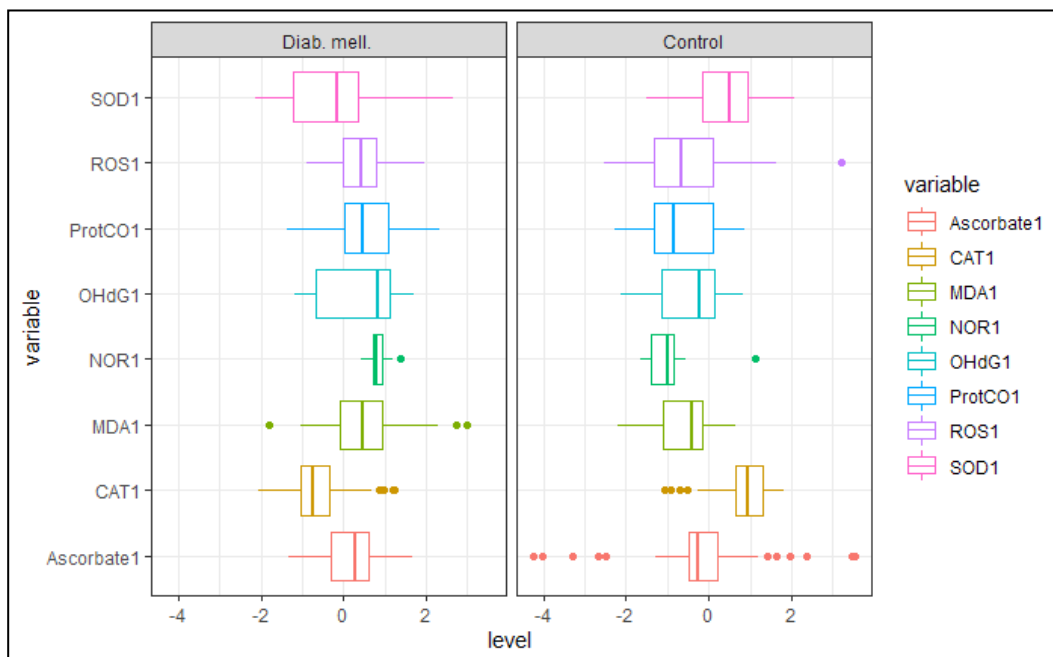
### ***Факторен анализ и визуализации на профилите на оксидативен стрес при болните от ЗД тип 2 и здравите лица***

Проведените анализи в R Studio също обективизираха сигнификантна разлика по отношение на всички прооксиданти и антиоксиданти сред болните с тип 2 ЗД и контролите (тест на Cramer,  $p=0.001$ ). Стойностите на проучваните биомаркери имат неправилно разпределение общо за всички 187 изследвани лица (тест на Shapiro-Wilk), поради което следваща стъпка беше да бъдат реорганизирани и трансформирани в параметрични.

Трансформацията посредством Box-Cox е често използван метод за превръщане на ненормално разпределен набор от данни в по-нормално разпределен. Основната идея на този метод е да се намери някаква стойност за  $\lambda$ , така че трансформираните данни да са възможно най-близки до нормално разпределение, като се използва следната формула:

$$y(\lambda) = (y\lambda - 1) / \lambda, \text{ ако } y > 0$$

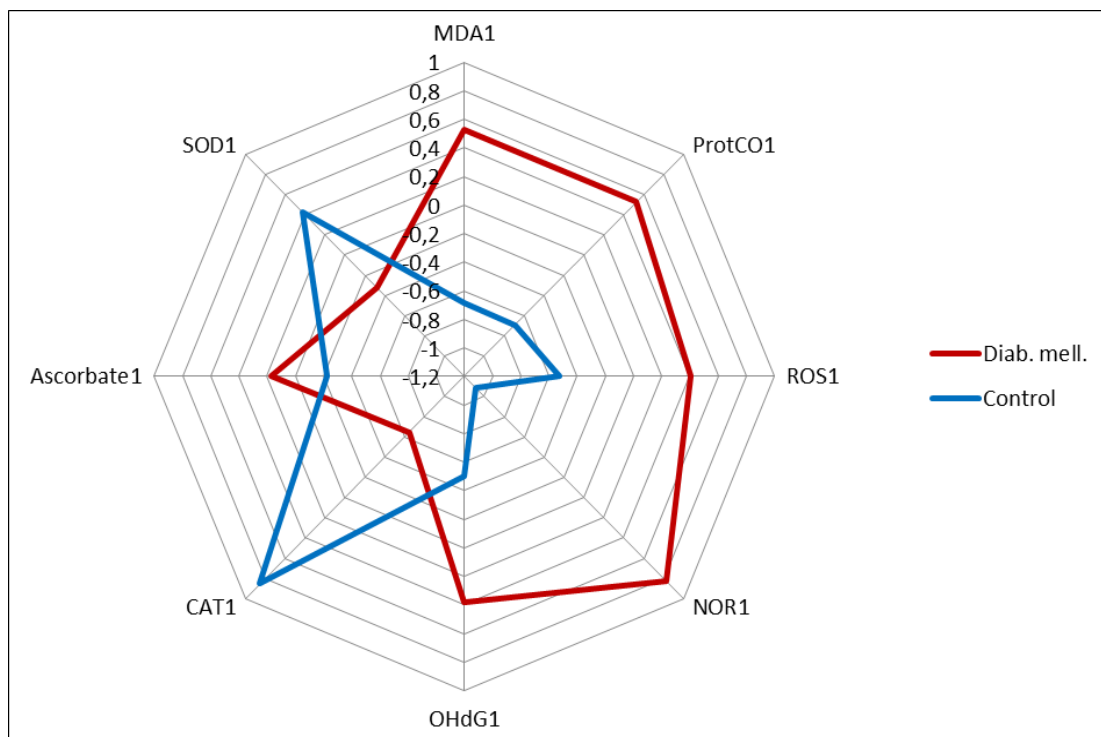
Осъществихме Box-Cox трансформацията, като използвахме функцията *boxcox* от библиотеката "MASS" на R Studio [<https://doi.org/10.2307/2348250>]. Функцията *boxcox*, автоматично изчислява стойността на  $\lambda$ . След извършената трансформация, отново беше проведен тестът на Shapiro-Wilk и проверката показва, че всички трансформирани променливи имат параметрично разпределение ( $p>0.05$ ). На следващ етап данните бяха стандартизирани и означени с 1. Съответната визуализация е представена на фиг. 24.



**Фиг. 24** Бокс плот (box plot), представящ серумните нива на проучваните биомаркери при двете изследвани групи – диабетици и здрави контроли след направените трансформации.

Прорезите се използват за сравняване на групи. В диаграмата с прорези, ако прорезите на две кутии не се припокриват, това е „силно доказателство“, че техните медиани се различават [Chambers et al.; 1983].

Освен това, беше направена радарна диаграма (spider plot), изобразяваща средните нива на биомаркерите на оксидативен стрес при болните със ЗД тип 2 и здравите контроли (фиг. 25).



**Фиг. 25** Радарна диаграма (radar chart, spider chart), изобразяващ средните нива на биомаркерите на оксидативен стрес при болните с тип 2 ЗД и здравите контроли.

Радарната диаграма е графичен метод за показване на многовариантни данни под формата на двуизмерна диаграма от три или повече количествени променливи, представени на оси, започващи от една и съща точка. Относителното положение и ъгълът на осите обикновено не са информативни. Но различни евристики, като алгоритми, които изобразяват данните като максимална обща площ, могат да бъдат приложени за сортиране на променливите (осите) в относителни позиции, които разкриват различни корелации, размени, и множество други сравнителни измервания.

***Анализ на главните компоненти (Principal component analysis [PCA]).  
Функция `dim()` в R езика за програмиране. PCA биплот и корелационен плот.***

Функцията `dim()` в R Language се използва за получаване или задаване на измерението на определената матрица, масив или рамка от данни. Целта е данните да се представят посредством променливи (компоненти), представящи по-голяма част от дисперсията на изходните променливи, правейки възможно визуализирането на резултатите в по-малко измерно пространство. Съгласно проведения анализ, вариацията в данните на осемте изследвани биомаркери можеха да бъдат коректно представени посредством три фактора (Dim 1:3), които имаха собствена стойност

(Eigenvalue) > 1, като те заедно обясняват 70% от дисперсията в изследваните променливи (табл. 14).

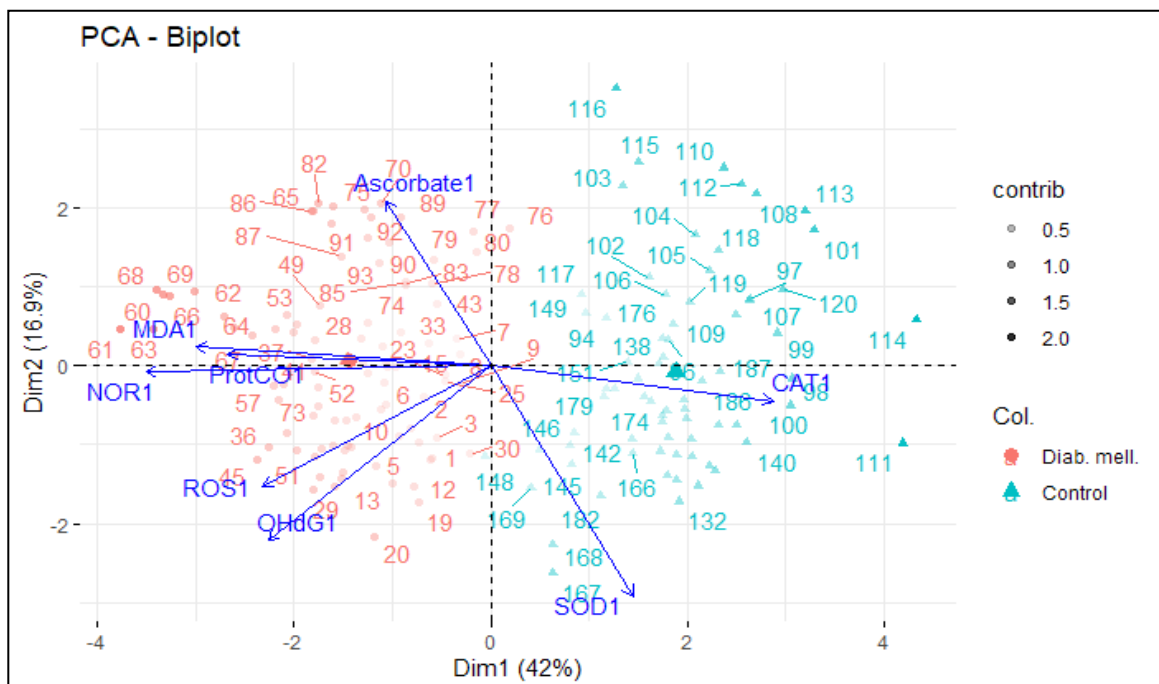
**Табл. 14** Пропорции от общата дисперсия в променливите, обяснявани от трите фактора

	Dim-1	Dim-2	Dim-3
Пропорция на дисперсията (Proportion of Variance)	0.4195	0.1692	0.1185
Кумулативна пропорция (Cumulative Proportion)	0.4195	0.5887	0.7072

В случая имаме множество променливи и факторния анализ е подходящ метод за визуализация и изучаване на структурата на данните. Техниката позволява да обобщим в двуизмерен вид про- и антиоксидантните профили на изследваните лица, въз основа на стойностите на биохимичните маркери.

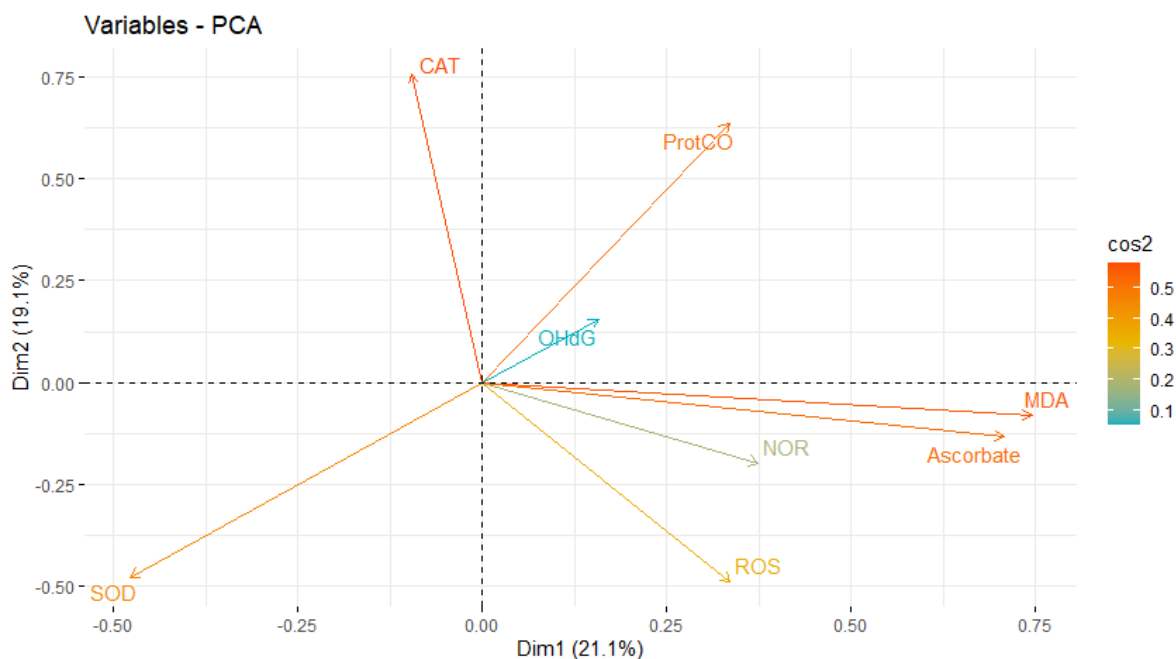
Създадохме Биplot графика, която цели да представи данните и променливите на матрица от многовариантни данни на една и съща графика. Вижда се доброто разделение на профилите в двуизмерното пространство. Разделението на профилите в най-голяма степен се дължи на променливите, които най-силно корелират с фактор 1 (Dim-1): малондиалдехид, карбонилирани протеини, •NO радикали, каталаза.

Този визуален подход демонстрира, че профилите, изградени на базата на всички про- и антиоксиданти се различават съществено между двете групи (болни и контроли).



**Фиг. 26** Стандартизиран биplot на про- и антиоксидантните профили на 187 изследвани лица, представящ разликите между болни и контроли за всички биомаркери съобразно координатите им в двуизмерното пространство

За да представим зависимостите между променливите, изградихме корелационен плот поотделно за групите на диабетците и здравите лица (фиг. 27 и 28).

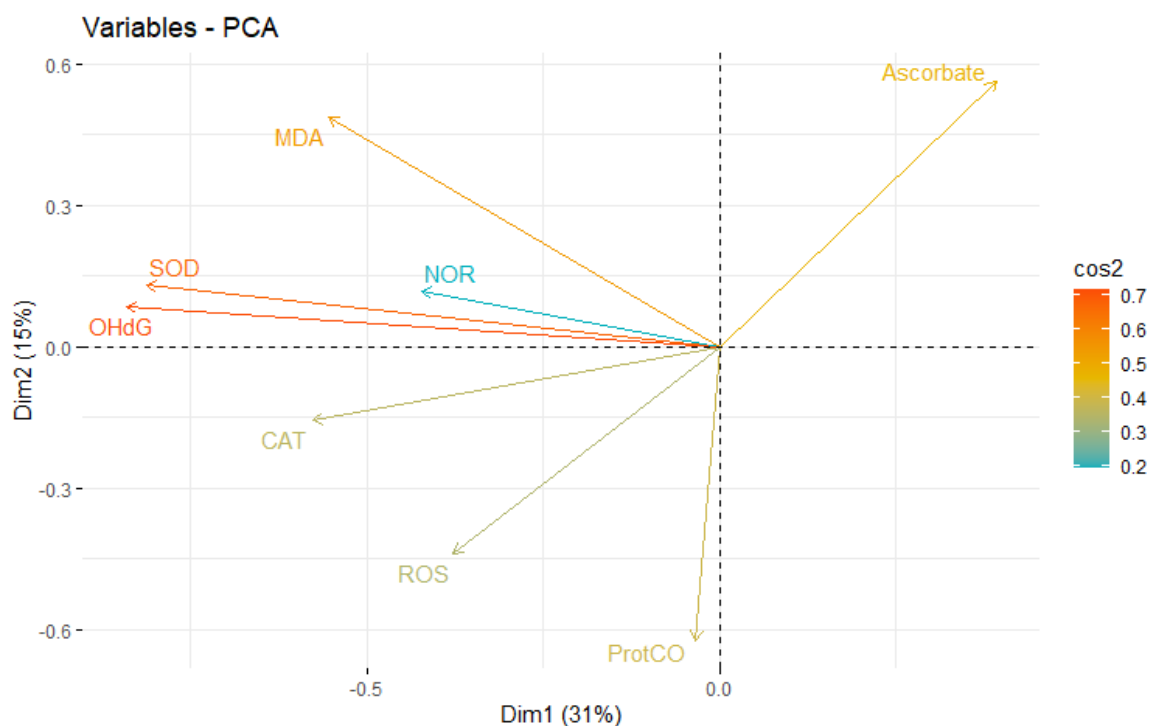


**Фиг. 27** Корелационен плот, представящ корелационната зависимост между отделните биомаркери за оксидативен стрес при болните с тип 2 захарен диабет.

Разстоянието и посоката от центъра на графиката до всяка променлива, означено с цветните еквилистантни линии, показва корелацията на всяка променлива с факторите (фиг. 27). Еквилистантните линии на променливите малондиалдехид и аскорбат са с приблизително еднаква дължина и ориентация, и това е визуализиращ метод, посочващ корелацията между тях. Също така, от графиката може да се определи и отрицателната корелация между групите на малондиалдехид и аскорбат от една страна и супероксид дисмутаза от друга. Тези резултати са потвърждение на получените от корелационните анализи на Pearson и представени в табл. 6. Супероксиддисмутаза обратно корелира с 8-OHdG и протеин - карбонилните групи.

В групата на здравите индивиди се вижда силна корелация между супероксид дисмутаза и 8-OHdG, в унисон с данните от теста на Spearman ( $r = 0.669$ ,  $p < 0.001$ ) и

обратна корелация на аскорбат с ROS (тест на Spearman,  $r = -0.136$ ,  $p = 0.191$ ) и с карбонилираните протеини (тест на Spearman,  $r = -0.159$ ,  $p = 0.132$ ). Има по-слаба позитивна корелация между каталаза и ROS (тест на Spearman,  $r = 0.245$ ,  $p = 0.025$ ). (фиг. 28).



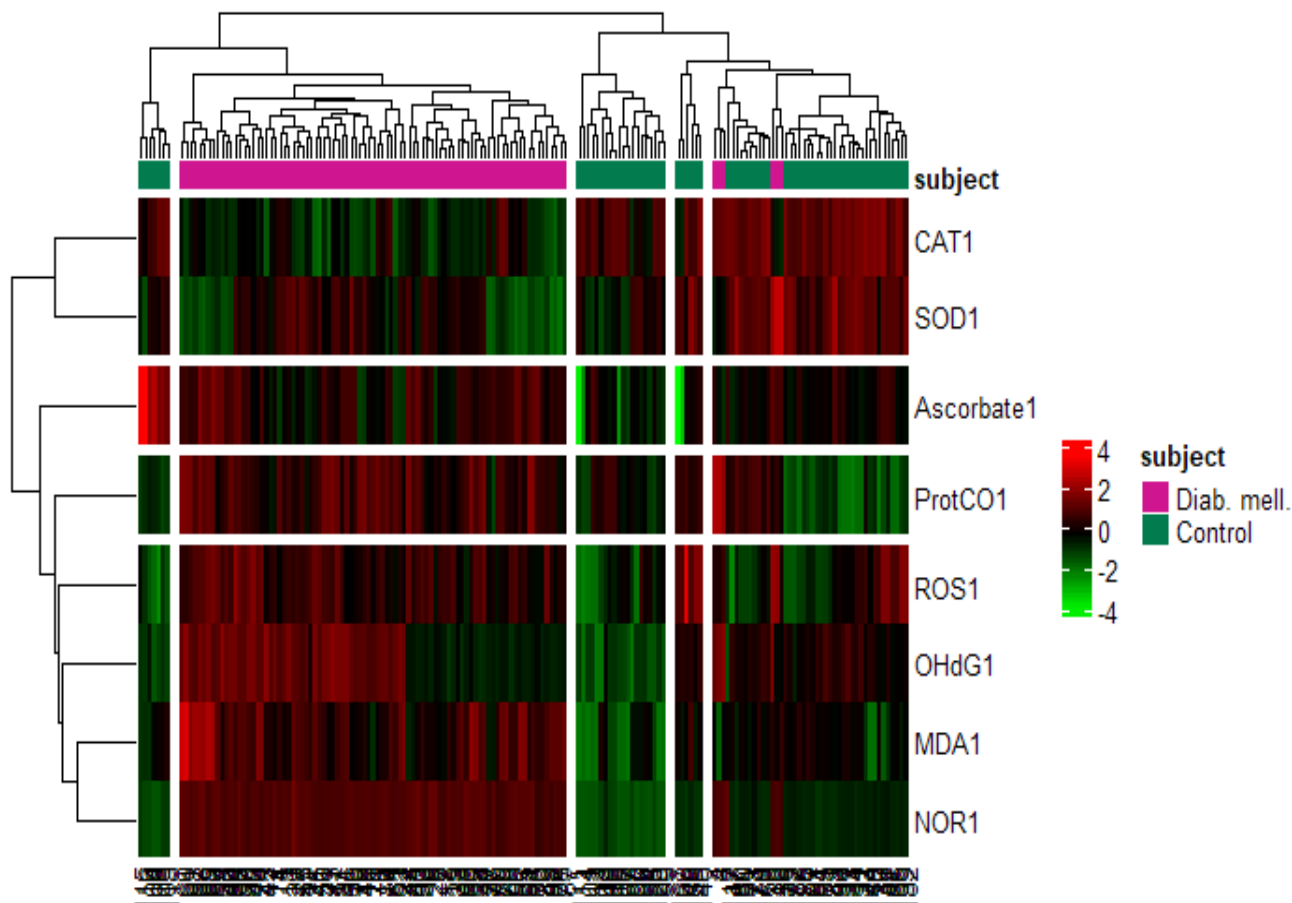
**Фиг. 28** Корелационен плот, представящ корелационната зависимост между отделните биомаркери за оксидативен стрес при здравите контроли.

### Обобщение посредством Heatmap

Подходящ визуализиращ подход, чрез който да представим данните за промяната на изследваните параметри на оксидативен стрес при диабетиците и здравите контроли на индивидуално ниво е heatmap графиката (фиг. 29).

Дендрограмата в горната част на графиката представя резултата от клъстерен анализ, изследващ сходството между изследваните лица. Клъстерният анализ е проведен по метода на Ward, а като мярка за сходство е използван евклидовото разстояние. Дендрограмата в дясната част на графиката представя резултата от клъстерен анализ, изследващ сходството между изследваните променливи. Клъстерният анализ е проведен по метода на Ward, а като мярка за сходство е използван коефициентът на корелация на Spearman. Анотацията в горната част показва дали е изследвано болно лице или контрола. Прави впечатление, че здравите контроли попадат в един клъстер, а диабетно болните в друг, с много малки изключения (5

диабетно болни, чийто профил е по-сходен с този на здравите индивиди, което би могло да е резултат от лечението). Цветовата схема представя и нивата на изследваните биомаркери, като в нюанс на червен цвят са високите стойности, а в зелено – ниските стойности.



**Фиг. 29** Графика тип „хейт мап“, представяща изследваните нива на про- и антиоксидантите в индивидуалните серумни проби при диабетичите и здравите лица.

## ОБСЪЖДАНЕ

Захарният диабет тип 2 е метаболитно заболяване, характеризиращо се с хипергликемия и дислипидемия, дължащи се на дисфункция на  $\beta$ -клетките на панкреаса и инсулинова резистентност. Обичайно инсулиновата резистентност на таргетните тъкани, като черен дроб, мускули и мастни депа, предхожда появата на Т2ЗД с много години, което е свързано с първоначална хиперинсулинемия, последвана от дефицит в инсулиновата секреция от  $\beta$ -клетките на панкреаса. Нарушената секреция на инсулин от клетките на Лангерхансовите острови и нарушеното действие на инсулина, опосредствано от инсулинова резистентност, са отличителните белези на тип 2 захарен диабет [DeFronso RA, 1988]. Хроничната експозиция на повишени глюкозни

концентрации и хиперлипидемията упражняват неблагоприятни ефекти върху редица  $\beta$ -клетъчни функции - процес, известен като  $\beta$ -клетъчна глюкозна токсичност и липотоксичност. Глюкотоксичността и липотоксичността са свързани с диабета феномени, които генерират оксидативен стрес. С течение на времето и двете допринасят за прогресивното влошаване на глюкозната хомеостаза, характерна за тип 2 захарен диабет [Poitout V, 2002]. Болестта е до голяма степен отговорна за макроваскуларните (коронарна болест на сърцето, периферно съдово заболяване и мозъчен инсулт), микроваскуларните (невропатия, ретинопатия и нефропатия) и комбинирани микро- и макроваскуларни (диабетно стъпало) усложнения, които са главната причина за повишената заболяемост и смъртност [Wallace JI, 1999].

Установено е, че оксидативният стрес чрез производството на изобилни количества реактивни кислородни видове (ROS) е замесен в прогресирането на инсулиновата резистентност, дисфункцията на  $\beta$ -клетките на панкреаса и  $\beta$ -клетъчната глюкозна токсичност, както и в процесите на съдова дегенерация и акцелерираната атеросклероза при тип 2 ЗД [Evans JL, 2002; Brownlee M, 2001, Rösen P, 2001]. Метаболитните отклонения при диабета причиняват свръхпродукция на митохондриален супероксид в ендотелните клетки както на големите, така и на малките съдове [Giacco F, 2010]. В съвременето се счита, че не само константната хронична хипергликемия, но също така и флукутиращите концентрации на глюкозата в кръвта [Hirsh IB, 2005; Hirsh, 2005, Wright E Jr, 2006] медиират механизмите на оксидативния стрес при диабетно състояние чрез различни пътища, а именно реакцията на неензимно гликозилиране [Sakurai T, 1988], електронната транспортна верига в митохондриите [Brownlee M, 2001] и мембранно-свързаната NADPH оксидаза/оксидоредуктаза [Harrison D, 2003; Mohazzab HK, 1994]. Веднъж образувани, свободните радикали – реактивни кислородни и азотни видове, които са с кратък полуживот, но в същото време са силно реактивни, задействат увреждане на клетките посредством взаимодействие с широк спектър от клетъчни компоненти и биологични молекули като липиди [Bilinski T, 1989], протеини [Cabiscol E, 2000] и нуклеинови киселини [Yakes FM, 1997] и по този начин се включват в патогенезата на специфичните за болестта патологични процеси. При нормални физиологични условия тези химични субстанции се балансират от клетъчните антиоксиданти, каквито са супероксиддисмутазите, каталазите и глутатион пероксидазите [Fridovich I, 1999, Gutteridge JM, 1992]. Състоянието на дисбаланс между прооксидантите и антиоксидантите в полза на първите е известно като „оксидативен стрес“ [Siems H, 1997].

С горепосоченото подчертаваме, че прооксидантите, генерирани в резултат на



хроничната експозиция на висока глюкозна концентрация или повишената гликемична вариабилност и другите метаболитни нарушения, са от съществена важност за развитието на захарния диабет посредством модифициране на биомолекули и клетъчно увреждане на островните клетки на панкреаса. Също така, повишеното генериране на свободни радикали и последващият оксидативен стрес са замесени и като основна причина за формирането на дългосрочните макроваскуларни и микросъдови усложнения на диабета [Pham-Huy L.A., 2008; Rösen P, 2001]. Поради това в настоящото проучване **си поставихме за цел да оценим ролята на оксидативния стрес за Т2ЗД с манифестни диабетни съдови усложнения, като тестваме кои от неговите параметри са с най-голяма предиктивна стойност и биха подобрили идентифицирането на болестта, като изследваме клиничните асоциации на оксидативните маркери и потенциала им за предсказване на риска от прогресиране и поява на диабетни съдови и други усложнения.** Тъй като съдовото увреждане може да започне да се развива преди поставянето на диагнозата и голяма част от пациентите с тип 2 ЗД вече имат съдово заболяване в момента на диагностициране на диабета, основният фокус на нашето изследване се отнася до тази таргетна популация от пациенти. За целите на сравнителния анализ включихме и ограничен брой лица с новодиагностициран диабет и липсващи доказателства за настъпили съдови увреждания. Насочихме вниманието си към популация от болни с различна продължителност на болестта, базирайки се на преимуществото, че по този начин се обхваща обширното влияние на разликите в давността на заболяването. Така резултатите могат да се генерализират за пациентите с ранно и дълготрайно заболяване и да представят цялата съвкупност от заболявания.

Като предмет на биохимичния анализ подбрахме да тестваме системните нива на голям панел от прооксиданти (ROS, •NO радикали, MDA, протеин-карбонилните групи и 8-OhdG) и антиоксиданти (каталаза, супероксиддисмутаза, аскорбат). Изборът ни е базиран на доказаната роля на тези реактивни молекули и продукти на биомолекулна модификация като ключови маркери в оксидативното увреждане по принцип, както и на съображението за приложението на някои от тях като биомаркери при диагностицирането на диабета [Chao-Qiang L, 2008].

Като цяло, има дефицит на информация относно оксидативните профили, касаещи паралелното измерване на множество различни биомаркери. Те биха могли да бъдат по-информативни, отколкото индивидуалните анализи сами по себе си. Фокусът върху изследванията в тази насока би допринесъл за увеличаване на познанията относно характеристиките на патологичните процеси и механизмите на

прооксидантното участие в тях и би допринесъл до напредък в познанията ни за патогенезата на захарния диабет. Освен това, изследванията в насока изучаване на ролята на оксидативния стрес разкриват нови стратегии за лечение, което е важна тенденция в съвременната медицина. Представяме обобщена съвременна информация от прегледа на литературата в тази област на научните изследвания и с нашите наблюдения подкрепяме твърдението за ключовата роля на оксидативния стрес в развитието на болестта, с нарушена регулация между про- и антиоксиданти.

## **Прооксиданти**

### **Реактивните кислородни видове (ROS)**

Най-важните оксиданти произхождат от кислорода (реактивни кислородни видове, ROS) и азота (реактивни азотни видове, RNS). Реактивните кислородни видове (ROS) са химически реактивни молекули, силни окислителни, които чрез трансфер на свободния им несдвоен електрон предизвикват окисление на клетъчните макромолекули – полиненаситените мастни киселини (PUFAs) в липидите, аминокиселините в протеините, въглехидратите и ДНК, водещо до увреждане на клетъчните структури, с реципрочен на това функционално нарушение или клетъчна смърт [Halliwell B, 1996]. Счита се, че обратимите модификации са от значение за физиологичните процеси и представляват сигнални механизми при подходящи условия („редокс-сигнализиране“), докато необратимите модификации могат да допринесат за патологични ситуации и някои заболявания [Spickett, C.M, 2012]. При тези обстоятелства, реактивните видове са в състояние да причинят увреждане на всички клетъчни компоненти в резултат на продукцията им в по-големи количества и нарушената регулация на отстраняването им от клетъчните защитни системи.

Съществуват доказателства в научната литература, че хипергликемията увеличава ROS [Inoguchi T, 2000; Kaneto H, 2010]. Хипергликемията активира конкретен метаболитен път, който включва диацилглицерол – протеин киназа C – и NADPH-оксидаза – кулминараща в продукцията на ROS, определян в миналото като „опасен метаболитен път при диабет“ [Nogueira-Machado JA, 2008]. В съвременното е прието, че ROS се индуцират от хипергликемия при пациенти с диабет по комплексни механизми, включващи ензими на митохондриалната дихателна верига, ксантин оксидази, липоксигенази, циклооксигенази, синтази на азотен оксид и пероксидази [Balaban RS, 2005; Harrison R, 2004; Pritchard KA, 2001; Shiba T, 1993]. От своя страна, хроничната хипергликемия и последващото производство на ROS са способни да отключат абнормни сигнални пътища, включващи различни сигнални медиатори, като

транскрипционни фактори, проинфламаторни цитокини, хемокини и вазоактивни вещества [Kehm R, 2021].

При диабет ROS се продуцират в по-големи количества в различните тъкани и участват в прогресирането на атеросклерозата, която често се наблюдава като макроангиопатия при това заболяване. В своя експериментална постановка Inoguchi T. и съавтори установяват, че експозицията на култури от аортни гладкомускулни клетки и ендотелни клетки на високо ниво на глюкоза сигнификантно увеличава производството на свободни радикали в сравнение с излагането на ниско глюкозно ниво. Резултатите от анализите им разкриват, че високото ниво на глюкоза стимулира производството на ROS чрез активиране на NAD(P)H оксидазата в двата вида съдови клетки и това е свързано с прекомерното ускоряване на атеросклерозата при пациенти с диабет и синдром на инсулинова резистентност [Inoguchi T, 2000].

В съответствие с горепосочените данни, проведените от нас анализи разкриха забележително повишени серумни нива на ROS при болните със ЗД тип 2 в сравнение със здравите контроли, с числен превес на покачването сред диабетиците с изявиени съдови усложнения и отчетливо нарастване при неадекватен гликемичен контрол. Представен като числено съотношение, този прооксидант, произхождащ от кислорода, показва 1.7-кратно увеличение в циркулацията на страдащите от болестта спрямо здравите лица. Това е доказателство за участието му в специфичната патофизиология на това заболяване и промените в оксидативния статус. Установихме също, че генерираните от високата глюкоза ROS са каузално свързани с 8-OHdG, някои антиоксиданти и диабетната ретинопатия и системните им нива не се влияят от провежданата терапия и пола. Проведеният по-нататък многофакторен анализ разкри, че единствено ROS от всички изследвани от нас биохимични маркери, са независим предиктор за очно засягане и увеличават риска от него около 1.8 пъти, въпреки наблюдаваната корелационна връзка на очното увреждане от диабета и с 8-OHdG.

Диабетната ретинопатия е едно от най-честите микросъдови усложнения при пациенти със ЗД и една от основните причини за придобитата слепота в света. Прогресирането на диабета до ретинопатия се случва с течение на времето, така че диабетната ретинопатия е зависимо от времето усложнение, което се развива поетапно. По данни на някои автори, честотата ѝ нараства до 50% на 10-та година след диагностицирането на диабета и достига до 90% на 25-та година [Calderon GD, 2017]. Осъщественият от нас субгрупов анализ, базиран на болестната продължителност, предоставя допълнителни доказателства в подкрепа на наклоняването на дебюта на

диабетната ретинопатия към по-дълготрайния клиничен курс с 5-кратно увеличение на честотата ѝ при над 10-годишна давност на болестта.

Редица предшестващи проучвания потвърждават, че прекомерното натрупване на ROS предизвиква митохондриално увреждане, клетъчна апоптоза, възпаление, липидна пероксидация и структурни и функционални промени в ретината. Широко се дискутира въпросът относно механизмите на участие на ROS в патогнезата на диабетната ретинопатия. Очертава се ролята на набор от метаболитни аномалии, инициирани от хипергликемията, включващи участието на полиоловия път, образуването на крайни продукти на напреднало гликиране, протеинкиназа С и хексозаминови пътища, увеличаващи генерирането на ROS и впоследствие улесняващи оксидативния стрес в ретината. Оксидативният стрес от своя страна потенцира аномалиите на тези метаболитни пътища, като съответно образува порочен кръг, който причинява клетъчни митохондриални увреждания, апоптоза на клетките на ретината, липидна пероксидация, неправилна епигенетична модификация на гените на антиоксидантната защитна система и структурни и функционални увреждания в ретината [Kang Q, 2020; Cecilia OM, 2019].

#### **Малондиалдехид (MDA)**

Реакциите на ROS с полиненаситени мастни киселини (PUFA) от мембрания липиден компонент водят до производството на няколко алдехидни образувания, включително MDA. Малондиалдехидът е продукт на разграждане на мембранните липиди, който се използва като маркер за липидна пероксидация при ЗД тип 2.

Липидите в клетъчната мембрана са сред най-податливите на окислително увреждане макромолекули поради наличието на множество връзки [Butterfield DA, 1998]. Атаката на PUFAs от свободните радикали, по-специално реакцията на кислорода с ненаситени липиди чрез ензимни и/или неензимни механизми, е позната като липидна пероксидация. Липидите се считат за един от основните таргети на ROS. Малондиалдехидът (MDA) е един от крайните продукти на липидната пероксидация, генериран от разграждането на арахидонова киселина и по-големи PUFAs, с две или повече двойни връзки по механизъм, включващ образуването на простагландини като ендопероксиди [Pandey KB, 2011]. Той е силно реактивен и повишените му нива, от своя страна, могат да променят целостта и структурата на клетъчната мембрана, да предизвикат увреждане на клетките и да доведат до освобождаване на провъзпалителни медиатори [Erdogan, HM, 2008; Forbes, JM, 2013]. Това се дължи на факта, че MDA е способен да модифицира или денатурира някои функционални групи протеини и ДНК,

което съвпада с началните етапи на възпаление, медирано от оксидативен стрес [Frohnert BI, 2013; Guo L, 2012]. Сега съществуват доказателства, които внушават, че заедно с първичната дислипидемия, оксидативното увреждане и необратимото химическо модифициране на липопротеини, причиняващо производството на окислени липопротеини с ниска плътност (oxLDL), е въввлячено в ускорения темп на атеросклероза при ЗД тип 2 [Steinberg D, 1989; Heinecke JW, 1997; Esterbauer H, 1992; Palinski W, 1994; Jenkins AJ, 2004]. Освен това, този алдехид (MDA) е също силно токсична и потенциално мутагенна молекула, която реализира тези си способности чрез високата си реактивност с протеини и ДНК [Esterbauer H, 1990; Del Rio D, 2005]. Той е удобен биомаркер, посредством който бихме могли да съдим за липидната пероксидация и един от най-често използваните в клиничните проучвания лабораторен параметър за медирано от свободните радикали увреждане на липидите и оксидативен стрес [Giera M, 2012; Shodehinde SA, 2013].

Съобщени са значителни промени в липидния метаболизъм при диабет, особено при пациенти със съдови усложнения, със значително нарастване на концентрацията на MDA в плазмата, серума и много други тъкани [Fowler MJ, 2008; Moussa SA, 2008; Bandeira S de M, 2012]. Повишената липидна пероксидация показва тясна връзка с високите гликемични нива при захарен диабет, измерени с глюкозната концентрация на гладно и HbA1c в проучване на Bandeira S de M [Bandeira S de M, 2012; Salgueiro A C F, 2013]. Тези сведения за увеличаването на липидната пероксидация са също индикация за спад в защитните механизми на ензимните и неензимните антиоксиданти [Saddala RR, 2013]. Повишеното ниво на MDA при диабетици предполага, че пероксидативното увреждане е включено в развитието на диабетни усложнения. Дори по-стари епидемиологични проучвания сочат, че нивото на липидните пероксиди в човешката плазма е в по-голяма степен свързано с хипертриглицеридемията и самото съдово заболяване, отколкото директно с диабета [Stringer MD, 1989]. През 1991 г. Baynes [Baynes JW, 1991], а впоследствие и Ramesh и съавтори през 2012 г. [Ramesh B, 2012] съобщават, че липидната пероксидация при диабет предизвиква много вторични хронични усложнения, включително атеросклероза и нервни разстройства. MDA са открити в депозитите в атеросклеротични плаки, предизвикани от диабета [Kume S, 1995].

В крайна сметка, липидната пероксидация на клетъчните структури играе ключова роля при атеросклерозата. В контекста на това е потвърдена тезата, че като маркер за липидното перокирение, MDA демонстрира засиленото окисление на кръвните липиди (вкл. LDL-холестерола) в състояние на хиперлипидемия при ЗД, както

и на мембранните фосфолипиди и арахидоновата киселина, получени под действието на активираната от "хипергликемичната псевдохипоксия" протеинкиназа С и фосфолипаза А2. Увеличената активност на фосфолипазите стимулира синтеза на вазоактивни простагландини и простаноиди (истинска тъканна хипоксия) и освен това може да активира редица нуклеарни фактори за синтеза на цитокини и растежни фактори.

В състояние на персистираща хипергликемия количеството на гликираните протеини нараства, а НvA1c характеризира този процес за предходните 2-3 месеца. Те са податливи в по-голяма степен на окисление, възприемат се от фагоцитите като "чужди", поемат се от тях и се елиминират чрез "респираторен взрив", който сам по себе си е източник на супероксидни радикали. Последните спонтанно или под действие на супероксид дисмутазата се превръщат във водороден пероксид. По голямата част от водородния пероксид се обезврежда от глутатионпероксидазата и каталазата, но известно количество от него може да се превърне в хидроксилен радикал при наличие на желязни йони. Хидроксилният радикал е най-мощният от всички известни окислителни и активно участва в липидното перокисление.

В изследваната от нас кохорта болни със ЗД бяха измерени сигнификантно по-високи (1.5 пъти) средни серумни нива на MDA в сравнение със здравите индивиди, със значимо по-високи стойности във фазата на формиране съдови усложнения спрямо случаите без манифестно съдово увреждане, което е в съгласие с резултатите от посочените предшествващи проучвания. В проучване на Sunita R и съавтори, лицата със Т2ЗД са имали дори риск от 6.77-кратно увеличение на нивата на MDA в сравнение с недиабетици [Sunita Raden, 2020]. Правдоподобно обяснение за повишената индукция на MDA в нашата група болни е, че още в началото на заболяването е налице повишено производство и активност на ROS, които с напредване на времето водят до изява на различни свободно-радикалови увреждания и позитивиране на отклонения в останалите показатели на оксидативен стрес. Както вече беше споменато, окислените от ROS липидни компоненти могат да повишат производството на малондиалдехид, така че **оценката на MDA може да се използва като маркер, който да опише индиректно ефектите на силно реактивните ROS съединения.** С нашето проучване внасяме и допълнителен нюанс с констатацията, че пропорцията на пациентите с екстремно повишени стойности на MDA, над 95-тия перцентил, е значима и 15-кратно по-висока спрямо здравите индивиди. Съобразно нашите резултати, циркулиращите нива на MDA бяха съизмерно повишени, независимо от статуса на гликемичен контрол и показана много близки концентрации при подгрупите болни, лекувани с инсулин, инсулин в

комбинация с перорални антидиабетни средства и само с перорални медикаменти. Те бяха асоциирани с различни локализации на микроваскуларна увреда (полиневро- и нефропатия), отразяващи тежестта на заболяването, и с някои антиоксиданти, с разнопосочна ориентация. Калкулираните корелации са слаби, но сигнификантни. По-нататък, резултатите от бинарната логистична регресия разкриха, че **повишаването на MDA увеличава 1.6-кратно вероятността от изява на чернодробна стеатоза**, наблюдавана при близо  $\frac{1}{4}$  от всички пациенти, включени в нашето проучване, независимо от продължителността на болестта. Това подчертава плейотропните функции на алдехида и важната му роля в задействането и прогресирането както на макроваскуларните, така и на микроваскуларните увреди и други свързани с диабета усложнения, които вървят паралелно с нарастващите му нива.

Интересен беше фактът, че това беше единствения прооксидант, който демонстрира характерен модел на полови различия в концентрацията си с повишена експресия при мъжкия пол като цяло, която беше изявена както в подгрупите на болните, така и на здравите индивиди. При преглед на литературата проучванията на половите различия в оксидантните профили при ЗД са много оскъдни. Авторски колектив, анализирал зависимостта на продуктите на оксидативен стрес от пола и възрастта в общата популация установява, че MDA като биомаркер на ОС е по-висок и относително независим от възрастта при мъжете, но не и при жените, където концентрацията му е значително по-ниска и показва възрастова зависимост, проявяваща се поетапно. Зависимият от възрастта наклон на концентрацията при женския пол е максимален в диапазона между 50 и 55 години, което авторите свързват с промяната на метаболизма в пост-менопаузата [Pinchuk Ilya, 2019].

Изследването на ролята на липидната пероксидация при диабета и неговите усложнения е възпрепятствано от сложността на образуваните продукти [Esterbauer H, 1987] и ограниченията, обусловени от различията в анализите за измерване на състоянието и продуктите на липидната пероксидация [Gutteridge JMC, 1990]. Освен това, въпреки че има многобройни съобщения за повишена пероксидация на липиди в плазмените липопротеини, в протеините на еритроцитната мембрана и в различни тъкани при диабет, относителното значение на ензимните спрямо неензимните източници на липидна пероксидация при диабет не е изяснено [Godin GV, 1988; Lyons TJ, 1991]. Повишените липидни пероксиди в плазмата може да са резултат от ензимни процеси, активирани от генерализирано съдово възпаление, което води до повишени нива на простагландини и липоксигеназни продукти. Алтернативно, липидните пероксиди могат да се образуват чрез неензимни реакции на ненаситени липиди със



супероксиден радикал, водороден пероксид и случайни метални йони в циркулацията или извън съдовото пространство, или на повърхността на ендотелните и фагоцитните клетки [Baynes JW, 1991].

### **Карбонилирани протеини**

Окислителната модификация на протеините е друго събитие на оксидативен стрес. Това окислително увреждане често води до загуба на специфичната протеинова функция и по този начин би могло да играе значителна роля в етиологията на заболяванията. Натрупване и увеличаване на карбонилирани протеини е наблюдавано при някои човешки патологии, включително захарен диабет. Понастоящем измерването на протеинови СО-групи след тяхното дериватизиране с 2,4-динитрофенилхидразин (DNPH) е най-широко използваният тест за окисляване на протеини [Berlett BS, 1997; Chevion M, 2000; Shacter E, 2000; Beal MF, 2002]. Приложението на карбонилираните протеинови групи (алдехиди и кетони) като биомаркери на оксидативен стрес има някои предимства, в сравнение с измерването на други продукти на окисление, поради относително ранното образуване и относителната химическа стабилност на карбонилираните протеини в рамките на часове и дни [Grune T, 1995; Grune T, 1996], докато продуктите на липидната пероксидация се подлагат на детоксикация в рамките на минути [Siems WG, 1997].

ROS са не само част от сигнални пътища, които се задействат директно от хипергликемията и имат основна роля при диабетните усложнения сами по себе си, но също така водят до карбонилиране на определени странични вериги на аминокиселини чрез директно окисление, катализирано от метал. В допълнение, карбонилните групи могат да бъдат внедрени в протеините индиректно чрез неокислителна ковалентна аддукция на реактивни карбонилни видове, генерирани от окисляването на липиди или въглеводороди. Както директните, така и индиректните механизми на карбонилиране могат да повлияят върху протеиновата конформация, активност и функция [Hecker M, 2018].

В проучване на Odetti P. и съавтори върху 43 болни със ЗД тип 2 е установено, че съдържанието на карбонил в плазмените протеини е леко, но не сигнификантно по-високо в групата на диабетиците в сравнение със съответстващи по възраст здрави контроли (n=20) и гликираният хемоглобин, маркер за гликемичен контрол, е асоцииран с протеиновите карбонилни групи при тях. Авторите заключават, че нарушеният гликемичен контрол е свързан с окисляването на протеините и че каскадата на гликиране освобождава също и свободни радикали, като става отговорна за по-нататъшни окислителни атаки [Odetti P, 1999]. Някои открития също така



предполагат, че промените в протеините са важни за развитието на очни усложнения от диабета [Stefek M., 2005]. Въпреки че има много доклади за ключовата роля на натрупването на крайни продукти на напредналото гликиране по време на иницирането и прогресирането на ретиналното увреждане при пациенти с диабет [Chen M, 2013], има и малко доклади, описващи връзката между оксидативния стрес, мембранните карбонилни протеини и клиничната тежест на диабетната ретинопатия, както и такива, които описват повишеното протеиново карбонилиране на мембраната на червените кръвни клетки при пациенти със ЗД тип 2 [Margetis PI, 2009]. Това откритие е потвърдено от Loukovaara и съавтори [Loukovaara S, 2014], които намират, че нивата на карбонил-протеиновото съдържание и индуцируемия транскрипционен фактор от хипоксия (HIF)-1 $\alpha$ , са значително повишени в течността на стъкловидното тяло на пациенти с диабетна ретинопатия, лекувани хирургично.

В нашето проучване **установяваме 2.5 -кратно по-високи системни нива на карбонилираните протеини при ЗД тип 2 в сравнение с контролите, с което според степенната разлика между болни и здрави те се нареждат на второ място след радикалите на азотния оксид.** Около 40% от диабетниците с васкуларни увреждания имаха стойности на този прооксидант по-високи от 95-тия перцентил на средните стойности при здравите субекти. Карбонил-протеиновото съдържание показва и сигнификантност на повишението при фенотипно по-агресивната и тежка форма на заболяването с изявени съдови усложнения спрямо липсата на такива, което потвърждава, че прекомерното производство на карбонилирани протеини при болестта води до по-изразени увреждащи ефекти. В подкрепа на твърдението за стимулиращия производството на прооксиданти ефект на хипергликемията, системните концентрации на този продукт на необратима протеинова модификация бяха значимо по-високи сред пациентите с лош гликемичен контрол, спрямо тези с добра метаболитна компенсация. Въпреки това, в регресионния модел, карбонилираните протеини не доказаха диференцирана роля върху HbA1c като важен индикатор за дългосрочен гликемичен контрол, притежаващ способността да отразява кумулативната гликемична история от предходните два до три месеца. Това предполага съществуването на по-сложна връзка и биологични ефекти на карбонилираните протеини върху биохимичните процеси, свързани с хемоглобиновото гликиране. Никой от двата пола не беше асоцииран с ексцесивна експресия на карбонилирани протеини, както и липсваше влияние на терапията върху циркулаторните им нива. Въпреки откритията на Margetis [Margetis PI, 2009] за повишено протеиново карбонилиране на мембраната на червените кръвни клетки при диабетна ретинопатия и на Loukovaara [Loukovaara S, 2014] за повишение в

течността на стъкловидното тяло на карбонилираните протеини при диабетна ретинопатия, нашите анализи за независимо влияние не доказаха сигнификантен ефект на този оксидантен продукт върху очното засягане.

### **8-хидрокси-2'-деоксигуанозин (8-OHdG)**

Съществуват доказателства в подкрепа на ролята на оксидативното увреждане на ДНК, засягащо функцията и интегритета на тъканите, като често срещан патогенетичен фактор при диабет, както и за появата и прогресирането на диабетните усложнения [Ayepola OR, 2014; Wu LL, 2004]. 8-хидрокси-2'-деоксигуанозин (8-OHdG), окислен нуклеозид на ядрената и митохондриалната ДНК, е чувствителен и полезен биомаркер за увреждане на ДНК от клетъчния оксидативен стрес. Важността на тази модификация произтича от факта, че изобилства от ДНК и е мутагенна [Le Page F, 1995]. Различни патологии водят до промяна в нивото на 8-OHdG, но се счита, че той е измерим рисков фактор за карцином, атеросклероза и диабет [Wu LL, 2004], така че използването му като биомаркер при диагностицирането на диабет е обсъдено от някои автори [Chao-Qiang L, 2008].

Резултатите от проучване на Al-Aubaidy Hayder A и Jelinek Herbert F показват, че серумният 8-OHdG, като резултат от модификация на ДНК база, произведена от окисляването на деоксигуанозин, се повишава още при преддиабетно състояние, което предполага наличието на окислително увреждане на ДНК още при незначително повишаване на нивата на кръвната глюкоза. Въз основа на статистически значимата положителна корелация между серумния 8-OHdG и индекса на телесна маса в групата изследвани лица с диабет, авторите заключават, че затлъстяването има адитивен ефект към повишените глюкозни нива, допринасяйки за окислително увреждане на ДНК [Al-Aubaidy Hayder A, 2011]. В тази връзка, от съществено значение е възстановяването на клетъчното увреждане, предизвикано от свободните радикали, както и увреждането на митохондриалната и ядрената ДНК. Все пак, с увеличаването на кръвно-захарните нива и затлъстяването, често срещано състояние при Т2ЗД, антиоксидантната система е претоварена, което води до повишена активност на свободните радикали и по-нататъшно увреждане на тъканите [Evans M, 2004].

В предшествващи проучвания е описан също увеличен брой 8-OHdG-позитивни островни клетки в човешкия панкреас от пациенти с диабет тип 2 [Sakauraba H, 2002]. Лечението с инсулин бързо нормализира тези повишени нива на 8-OHdG, което предполага участието на хипергликемията в окислителното увреждане на ДНК [Simone S, 2008]. Освен това, данни от литературата показват, че 8-OHdG - модификациите, присъстващи в ДНК по време на клетъчната репликация, водят до соматична мутация,

която може да допринесе за пролиферацията на гладката мускулатура, наблюдавана в патогенезата на атеросклеротичните плаки [Andreassi M, 2003]. Yan Lu и съавтори, от своя страна, публикуват резултати за независима връзка на серумния 8-OHdG с удебеляването на интима-медия на каротидната артерия при пациенти с Т2ЗД, отразяващо повишения риск от кардио-васкуларно заболяване [Lu Yan, 2012].

В Бразилско проучване, анализирайки гликемията на гладно и HbA1c, авторите установяват, че диабетиците с лош гликемичен контрол показват значително увеличение на производството на реактивни кислородни видове и последващо увреждане на ДНК в сравнение с пациентите със ЗД тип 2 с добър гликемичен контрол [da Silva Larissa Carlos, 2018].

Нашите настоящи констатации са в съответствие с по-ранните съобщени проучвания. Установихме сигнификантно и 1.9 -кратно по-високи серумни нива на 8-OHdG при болните със ЗД в сравнение със здравите субекти, с числено по-високи стойности при наличие на манифестни васкуларни увреди и значителни вариации в индивидуалните стойности, с превес към по-високите циркулаторни нива при близо 60% от болните. Посочените данни потвърждават потенциалното функционално значение на този прооксидант при заболяването и че 8-OHdG медира ефекторните биологични действия, свързани с патологията на диабетните усложнения. В нашата кохорта не бяха намерени полово-специфични различия в системните нива на 8-OHdG, показващо липса на различаваща се съобразно пола продукция на прооксиданта. Подобно на Бразилското проучване, състоянието на лош гликемичен контрол, дефинирано въз основа на гликемията на гладно и гликирания хемоглобин, беше представено със сигнификантно по-високи концентрации на 8-OHdG. Нещо повече, множествената регресия разкри **линейна връзка между HbA1c и 8-OHdG, който беше единственият фактор от всички прооксиданти, способен да прогнозира резултата за HbA1c като параметър за гликемичния контрол.** Това е доказателство, че съществува връзка между окислителното увреждане на ДНК и гликирането на протеини и че 8-OHdG е важно звено в прооксидантните пътища и активен участник в пълното разгръщане на процесите на декомпенсация на ЗД. Като цяло тези данни очертават значението на стабилния контрол на глюкозата и потенциалното участие на оксидативния и нитрозативен стрес в патогенезата на усложненията, дължащи се на лошо контролиран диабет.

В корелационният анализ с клиничните и лабораторните параметри, наблюдавахме слаба положителна корелационна зависимост на 8-OHdG с реактивните кислородни видове (като основни молекули, атакуващи гуаниновите бази в ДНК) и

продуктите на белтъчна модификация, както и с диабетната ретинопатия и преживяния мозъчен инсулт и добра негативна корелация с диабетната полиневропатия. Това е в подкрепа на твърдението, че системното производство на 8-OHdG е свързано с нарушена регулация на биохимичните процеси, кулминиращи във вторични увреждащи ефекти върху малките и големите съдове.

Анализирайки въздействието на всички прооксиданти като множество независими променливи, представени едновременно, за да се предскаже вероятността за развитие на дълготрайните диабетни усложнения, установихме, че **8-OHdG е важен рисков фактор за мозъчен инсулт, повишаващ възможността за изявата му близо двукратно**. Тези данни добавят тежест в полза на вероятната роля на 8-OHdG за развитието на атеросклероза, където този прооксидант действа като централен играч, както беше посочено в цитираните по-горе проучвания. Интересен беше факта, че серумните нива на този биомаркер бяха сигнификантно по-ниски при пациентите, лекувани с перорални антидиабетни средства отколкото при лекуваните с Insulin като монотерапия или в комбинация с перорални антидиабетни средства. Правдоподобно обяснение на това е, че подобрения гликемичния контрол води до рязко намаляване на нивата на увреждане на ДНК при пациенти с тип 2 захарен диабет, въпреки че те не достигат до тези при здравите контролни лица и остават малко по-високи.

#### **Азотен оксид ( $\bullet$ NO)**

Друг прооксидант, тясно свързан с оксидативния стрес, е азотният оксид ( $\bullet$ NO). NO се синтезира като вторичен продукт от превръщането на неговия физиологичен предшественик L-аргинин в L-цитрулин от фамилията на NO-синтазите (NOS). Тези ензими се състоят от три различни изоформи, кодирани от три различни гена: невронална (nNOS, кодирана от NOS-1), индуцируема (iNOS/NOS-2) и ендотелна (eNOS/NOS-3) форми [Dellamea BS, 2014; Bredt DS, 1994]. Въпреки че на изходно ниво основният източник на плазмен NO е свързан с eNOS, при някои клинични състояния, като възпаление, се активира iNOS [Caimi G, 2012].

Азотният оксид е газообразен липофилен свободен радикал, който играе важна роля в съдовата физиология и е известен като ендотелен релаксиращ фактор. Съдовият ендотел би могъл да се разглежда като динамична разделяща повърхност между артериалната стена и циркулиращите клетки. Биоактивността на NO като паракринен фактор се изразява в контролиране на съдовия тонус, инхибиране на функцията на тромбоцитите, предотвратяване адхезията на левкоцитите и намаляване на пролиферацията на интимата (антиатеросклеротичен механизъм). Тъй като ендотелът е основният източник на NO във васкулатурата, загубата на нормална клетъчна функция

може да доведе до променен синтез на NO. Намалването на производството, освобождаването на NO или намалената му бионаличност в ендотела води до дисфункция на ендотелните клетки с невъзможност за релаксация в отговор на ендотел-зависимите вазорелаксанти (напр. ацетилхолин, брадикинин и др.) [Liao JK, 1998; Avogaro A, 2006]. Ендотелната дисфункция, от своя страна, играе важна роля в ранните етапи на развитие на атеросклерозата, която често се наблюдава като макроангиопатично събитие при ЗД тип 2 [Cai H, 2000]. В този смисъл, **серумният азотен оксид се очертава като основен сигнал, свързан с ендотелната дисфункция при Т2ЗД**. Като представител на реактивните азотни видове, подобно на реактивните кислородни видове, азотният оксид може също така да реагира с множество клетъчни компоненти (протеини, липиди, нуклеинови киселини) и да генерира обратими или необратими оксидативни модификации в техните молекули.

Както беше споменато, изследванията в насока изучаване на ролята на азотния оксид разкриват, че ендотелът осигурява конститутивна доставка на NO от изходния субстрат L-аргинин посредством ендотелната изоформа на NO-синтаза (eNOS). В състояние на оксидативен стрес производството на ROS надвишава наличните антиоксидантни защитни системи. Доминиращият механизъм за намаляване на бионаличността на съдовия NO е свързан с неговото бързо окислително инактивиране от ROS. В допълнение, има доказателства, че персистиращият оксидативен стрес прави eNOS дисфункционална, така че тя вече не произвежда NO, а вместо това супероксиден анион. Следователно, регулирането на NOS е централно звено в развитието и прогресията на атеросклерозата [Pitocco D, 2010].

Прегледът на научната литература предоставя разнопосочни и противоречиви данни относно циркулаторните нива на NO при Т2ЗД и тяхното съотнасяне. Проучване, проведено в Турция, демонстрира както повишени нива на серумния NO при пациенти с Т2ЗД в сравнение с недиабетици, така и връзка между NO и тежестта на диабетната ретинопатия [Ozden S, 2003]. Японско проучване също показва, че плазмените нива на NO са значимо по-високи при диабетиците, отколкото при контролите [Izumi N, 2006]. В Иранско проучване са установени по-високи концентрации на NO при пациенти с тип 2 захарен диабет в подкрепа на съществуващата хипотеза, че свръхпроизводството на NO влияе върху метаболитните действия на инсулина [Zahedi Asl S, 2008]. Поради честото съчетание на захарен диабет и артериална хипертония Shahid SM и Mahboob T изследват корелацията между гликирания хемоглобин и NO при 100 диабетици с тип 2 диабет, разделени на подгрупи - нормотензивни и хипертензивни пациенти - и същия брой съответстващи по възраст и пол здрави лица. Авторите установяват, че серумното

ниво на NO е значително по-ниско при нормотензивните и хипертензивните диабетици в сравнение с контролите, както и значима отрицателна корелация на серумният азотен оксид със серумната глюкоза нагладно и нивата на HbA1c при двете групи пациенти с диабет. Тези резултати предполагат, че констелацията от нарушен гликемичен контрол и образуването на напреднали крайни продукти на гликозилиране, като HbA1c, критично допринасят за аномалии в метаболизма на NO, или обратно, и това би могло да обясни честото клинично съчетание на диабет и артериална хипертония [Shahid SM, 2009].

За да изяснят връзката между стadiите на диабетната ретинопатия и NO, Tsai DC и други изследователи от Тайван измерват концентрациите на NO в камерната вода и плазмените проби от 45 пациенти с диабет и 19 контроли с недиабетна катаракта, получени по време на очна хирургична интервенция. Намират повишени нива на NO в камерната вода в групата с пролиферативна диабетна ретинопатия, в сравнение с диабетниците без ретинопатия и липса на разлика в плазмените нива на този биохимичен показател сред диабетниците с различни стadiи на очно ангажиране. Това им дава основание да заключат, че NO, присъстващ в очните тъкани, играе важна роля в прогресирането на очното увреждане от диабета [Tsai DC, 2003].

Брюкселско проучване е проведено с цел корелиране на серумното ниво на NO при пациенти с остри коронарни синдроми във връзка с наличието или липсата на захарен диабет, като преди всяка терапевтична интервенция са били взети проби от артериална кръв, за изследване на нивото на серумните NO метаболити чрез реакцията на Griess. В сравнение с контролната група, пациентите с остри исхемични синдроми са имали значително по-ниско ниво на серумни NO метаболити, без значителна разлика между лица с диабет и без диабет [Rizk A, 2004]. Подобно на това, в Индийско проучване серумният NO е бил сигнификантно по-нисък при болните с T23Д, в сравнение с контролите. Като ограничения на проучването и обобщаемостта на резултатите авторите изтъкват малкия размер на извадката, отворения дизайн и отклоненията при подбора на пациентите [Ghosh A, 2011].

През 2016г. бразилски автори публикуват систематичен преглед на литературата и мета-анализ относно нивата на азотния оксид при ЗД, включващ 30 проучвания за различни популации (8 проучвания за пациенти с тип 1 ЗД и 22 проучвания за тип 2 ЗД). За оценка на концентрациите на NO е използвано измерване на нитрати и нитрити (NOx - стабилните продукти на NO), тъй като те тясно отразяват бионаличността на NO. Този мета-анализ открива значително увеличение на нивата на NOx при пациенти с T13Д в Европа (никаква друга етническа принадлежност не е оценена в проучванията с

тип 1 ЗД), както и при пациенти с Т2ЗД в Европа и Азия, но не и при тези от Латинска Америка, в сравнение с контролите. Авторите заключават, че са необходими допълнителни проучвания при други етноси, за потвърждение тези данни [Assmann TS, 2016].

Следователно литературата не е еднозначна, освен това липсват лонгитудинални данни, очевидно съществуват и популационни различия. Друг проблем е, че лабораторното измерване на NO е изключително трудно поради биохимичната нестабилност, краткия полуживот и понякога много ниската му концентрация в биологичните течности.

Важен резултат от проведения от нас анализ представя забележително повишени серумни нива на NO при страдащите от болестта, в сравнение със здравите контроли, със сигнификантно по-високи стойности сред диабетиците със съдово засягане, където всички пациенти без изключение имаха екстремно високи стойности на този прооксидант (над 95-тия персентил от средните стойности при здравите контроли) спрямо 5% от здравите индивиди. Нашите данни потвърждават, че радикалите на NO са от съществена важност в оксидативните пътища при заболяването и имат подчертана централна роля при съдовите увреждания, независимо от гликемичния контрол. Възможно е този факт да стои в основата на фенотипно по-агресивното и тежко протичане на заболяването при формирани васкуларни компликации. Нещо повече, численото съотношение на средните концентрации на NO в серума на болните спрямо здравите показва най-високи стойности на този индекс, в сравнение с останалите изследвани прооксиданти – 7.3 - кратна разлика между болни и здрави. Азотният оксид явно присъства изобилно в циркулацията в условията на този тип патология, което го прави значим таргет за лечение. Нивата на този прооксидант сред жените от групата на случаите бяха еквивалентни на тези при мъжете, за разлика от контролната група, където NO беше сигнификантно по-висок при здравите мъже - подчертаващо, че при наличие на заболяване не се наблюдават полови различия в продукцията на прооксиданта в периферната кръв, която е еднотипно повишена.

Съобразно нашите резултати, циркулиращите нива на азотния оксид не демонстрираха значима корелация с другите изследвани прооксиданти и редуцанти, което ни навежда на мисълта, че диабет-индуцираните промени в свързаните с азота метаболити изглежда не са свързани с капацитета за освобождаване на антиоксиданти.

В съответствие с доказаната роля на азотния оксид като фактор, опосредстващ съдовата релаксация, проведената от нас логистична регресия потвърди, че NO е



предиктор за прогнозиране на вероятността за развитието на артериална хипертония с отрицателна прогнозна стойност, поради което можем да твърдим, че шансовете за изява на хипертония намаляват 1.3 –кратно при всяко повишаване на стойността на този прооксидант с единица.

Най-общо, NO действа като плейотропен втреклетъчен фактор, упражнявайки различни биологични действия както при физиологични, така и при патологични състояния [Bredt DS, 1994]. Докато ниските нива на NO са полезни за някои физиологични и клетъчни функции, поддържайки добре балансирания съдов тонус, коагулация и възпаление, високите нива на NO могат да причинят вредни ефекти [Zou MH, 2004; Pacher P, 2007]. Настоящите резултати са в съгласие с предишни експериментални проучвания, показващи, че хипергликемията може да засили производството на NO [Adela R, 2015; Yang P, 2010; Zhang X, 2014] или да намали неговата биоактивност, което води до повишено образуване на супероксид [Cai S, 2005].

**Обобщавайки накратко, резултатите от нашия анализ показват значителна свръхпродукция на 5-те изследвани оксидативни маркера при пациенти с тип 2 ЗД, по-отчетливо при наличие на свързани с диабета съдови прояви. Тези резултати са в съгласие с болшинството от публикациите, които демонстрират значително повишение на оксидативното увреждане при състояние на диабет [Evans JL, 2002; Riesen P, 2001; Nakhjavani M, 2010; Bollineni RC, 2014; Pan HZ, 2008]. По-специално, нашите пациенти с тип 2 ЗД със съдово засягане показаха сигнификантно, приблизително 7-кратно повишени нива на •NO в сравнение със здравите контроли, за разлика от другите биохимични маркери, които бяха увеличени само с 1.5 до 2.5 пъти, което предполага, че свръхпроизводството на свободни радикали на •NO може да се счита за решаващо при развитието на диабет и съдови заболявания. Статусът на гликемичния контрол е сигнификантно свързан с нивото на окисление на липидите, протеините и ДНК (MDA, карбонилно съдържание и 8-OHdG), което потвърждава влиянието на повишената кръвна глюкоза върху увреждането на всички видове биологични молекули. Най-силните степени на корелация наблюдавахме за оксидирания гуанин на ДНК, което показва, че хипергликемията спомага за окислението на ДНК. ROS и 8-OHdG, генерирани от високата глюкоза, са причинно свързани с диабетната ретинопатия. Съответно, установена беше положителна корелация на системното съдържание на 8-OHdG с мозъчния инсулт, макросъдова проява, дължаща се на диабет. Въпреки това, модификацията на базата на дезоксирибонуклеиновата киселина, получена от**



окисляването на дезоксигуанозина, беше в обратна корелация с диабетната невропатия. **MDA беше асоцииран с различни локализации на микроваскуларното увреждане (невро- и нефропатия) с различна ориентация на връзката.** Освен това демонстрираме липсата на разлика в системния оксидативен стрес при диабетици със затлъстяване и без затлъстяване, въпреки противоположните констатации на други автори за повишение на оксидативния стрес в натрупаната мастна тъкан при затлъстяване [Furukawa S, 2004].

### **Диагностична стойност на изследваните прооксиданти за детекция на захарен диабет тип 2 със съдови усложнения**

Като част от нашата работа беше провеждането на ROC-анализи. ROC-кривите се използват в клиничната биохимия, за да се избере най-подходящата **прагова стойност на теста.** Най-добрата прагова стойност има най-високия истински положителен процент, паралелно с най-нисък фалшиво положителен процент при диагностицирането на заболяването. Получената от нас праговата стойност за малондиалдехида е 2.49  $\mu\text{mol/l}$ , за карбонилираните протеини е 5.29 nmol/mg, за реактивните кислородни видове е 1.33 arbitrary units, за азотния оксид е 17.68 arbitrary units и за 8-хидрокси-2'-деоксигуанозин е 1.44 ng/mL. Тъй като площта под крива на ROC е мярка за полезността на даден тест като цяло, по-голямата площ означава по-полезен тест. Площите под ROC кривите в конкретния случай използвахме за сравняване на диагностичната стойност на тестваните от нас 5 прооксиданти за Т2ЗД.

ROC-анализите разкриват, че **азотния оксид** в циркулацията разграничава наличието на тип 2 ЗД с диабет-специфични съдови усложнения по-добре от другите параметри на оксидативен стрес, с отлична специфичност и чувствителност. **8-OHdG** показва най-ниска чувствителност (59.1%) и специфичност (63.0%) в сравнение с другите биомаркери, а също така и редуцирана площ под кривата, докато **азотния оксид дава най-добри резултати за откриването на диабет с индуцирана васкуларна увреда.** Най-общо, тестваните характеристики „положителна и отрицателна предиктивна стойност“ са в полза на азот-оксидните радикали (98.9% и 100%, респективно), докато положителната предиктивна стойност на 8-OHdG е ниска (само 64.7%). Като цяло, положителната предиктивна стойност (значима характеристика в клиничната практика) за малондиалдехид, карбонилираните протеини и реактивните кислородни видове са приемливи в сходна степен.

### **Антиоксиданти (редуктанти)**

Защитата срещу реактивните оксиданти, образувани по време на аеробния метаболизъм е сложен процес и се осигурява от система от ензими и други не-ензимни

антиоксидантни съединения, способни да предотвратят излишното производство на радикали, да неутрализират свободните радикали и да възстановят причинените от тях увреждания. Тези молекули действат колективно срещу свободните радикали, за да устоят на вредното им въздействие върху жизненоважните биомолекули и в крайна сметка върху телесните тъкани. Регулирането на антиоксидантната система трябва да осигури достатъчно количество, точно позиционирани антиоксидантни съединения и ензими. Доказано е, че увреждането на тази система играе роля при различни заболявания.

Вътреклетъчната антиоксидантна защита се осигурява основно от антиоксидантни ензими, които катализират разграждането на оксидативните токсични междинни продукти. За оптималната си каталитична активност, тези ензими се нуждаят от кофактори като селен, желязо, мед, цинк и манган. Трите основни антиоксидантни ензима: супероксид дисмутаза (SOD), глутатион пероксидаза (Gpx) и каталаза (CAT) се различават един от друг по структурата си, разпределението си в тъканите и необходимост от съответен кофактор [Szaleczky E, 1999].

Въз основа на техния отговор към общата инвазия на свободните радикали, антиоксидантите могат да бъдат категоризирани в първа, втора, трета и дори четвърта линия защитни антиоксиданти. Защитните антиоксиданти от първа линия основно включват именно супероксид дисмутазата (SOD), каталазата (CAT) и глутатион пероксидазата (GPX) и тяхната роля и ефективност е фундаментална и незаменима в цялостната защитна стратегия/мрежа на антиоксидантите, особено по отношение на супероксидния анион радикал ( $\text{*O}_2$ ), който постоянно се генерира при нормалния телесен метаболизъм, главно посредством пътя на производство на енергия в митохондриите. Представяват сбор от антиоксиданти, които действат за потискане или предотвратяване на образуването на свободни радикали или реактивни видове в клетките. Те са много бързи в неутрализирането на всяка молекула с потенциал за развитие в свободен радикал или всеки свободен радикал, способен да индуцира производството на други радикали [Ighodaro OM, 2018].

### **Каталаза**

Човешкият ензим каталаза е един от най-важните антиоксидантни ензими, който контрабалансира оксидативния стрес в значителна степен посредством катализиране на разграждането или редукция на клетъчния водородния пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) до кислород и вода. Ензимът използва желязо или манган като кофактор. Ниската концентрация на водороден пероксид играе важна роля в сигнализирането, докато високата му концентрация е токсична [Veal E, 2011]. CAT е високоефективен, той може да

разгражда милиони молекули на водороден пероксид за една секунда и е обичаен антиоксидантен ензим, представен в почти всички живи тъкани, които използват кислород. Намира се предимно в пероксизомите, но липсва в митохондриите на клетките на бозайници. [Ighodaro OM, 2018]. Човешките тъкани и клетки, специално еритроцити и черен дроб, имат най-високи концентрации на каталаза, като повече от 99% от кръвната каталаза произхожда от еритроцитите. Намалената активност на каталазата може да доведе до повишаване на концентрацията на водороден пероксид, което би могло да допринесе за проявата на различни заболявания, включително захарен диабет [Góth L, 2013]. Patel H. и съавтори демонстрират, че хипергликемията понижава регулацията на генната експресия на ROS-неутрализиращите ензими CAT и SOD и увеличава производството на водороден пероксид [Patel H, 2013].

В наскоро публикувано проучване през 2021г., Bokhary K. и съавтори анализират статуса на антиоксидантните ензими супероксид дисмутаза и каталаза в различните етапи на тежест на диабетна ретинопатия при болни с T1 и T23Д. Авторите установяват по-ниски нива на SOD и CAT при пациентите с диабет, отколкото при контролите, както и значителни вариации в техните концентрации според тежестта на диабетната ретинопатия. Освен това съобщават, че нивата на SOD и CAT намаляват значително при наличие на диабетна ретинопатия в сравнение с диабетниците без очно засягане [Bokhary K, 2021].

В обзор, базиран на няколко кохортни проучвания, Góth L и съавтори обсъждат връзката на кръвната каталаза и захарния диабет при пациенти с диабет от Унгария. Обобщавайки резултатите от тях, авторите заключават, че активността на кръвната каталаза е значително намалена при T23Д и гестационен диабет и е без промяна при тип 1 захарен диабет [Góth L, 2016]. В една от кохортите се съобщава за намаляване на кръвната каталаза с възрастта при T23Д, с най-висока активност между 20 и 40 години и най-ниска за пациенти в напреднала възраст между 61 и 80 години [Tarnai I, 2007].

Същият автор Góth L докладва за връзка между дефицита на каталаза и тип 2 захарен диабет, правейки заключението, че повишените концентрации на водороден пероксид през целия живот, дължащи се на мутации на каталазния ген, могат да бъдат рисков фактор за диабет тип 2. Този риск може да се дължи на пероксидно увреждане на обичайно бедните на каталаза  $\beta$ -клетки на панкреаса. Началото на диабета при пациенти с дефицит на каталаза се появява над 10 години по-рано, отколкото при пациенти с нормокаталаземия. При пациенти с диабет тип 2 без известни мутации на каталазния ген, кръвната каталаза явно е с понижена регулация. Едно възможно обяснение за този феномен, авторът отдава на повишените нива на водороден пероксид

в мускулните клетки поради намалена каталаза в кръвта, благоприятстващи инсулиновата сигнализация чрез инактивиране на чувствителните към окисление тирозин-фосфатази, които не могат да дефосфорилират инсулиновите рецептори [Góth László 2008].

За разлика от горепосочените авторски колективи, Sözmen B и съавтори съобщават за по-висока каталазна активност при ЗД тип 2 спрямо контролите като цяло. Намират също значително повишение на каталазната активност при пациенти с високи нива на HbA1c (>7.0%) в сравнение с пациенти с ниски нива на HbA1c (<7.0%) и положителна корелация между каталазната активност и нивата на глюкоза на гладно и концентрацията на HbA1c при пациенти с хипертония, асоциирана със ЗД тип 2. Авторите заключават, че неконтролираният метаболизъм на глюкозата е причина за промени в антиоксидантните ензими и сред тях каталазата корелира най-добре с лошия гликемичен контрол [Sözmen B, 1999].

Анализът на нашите данни подкрепя аргументите в полза на променената антиоксидантна защитна система при ЗД тип 2 и сочи понижено около 5 пъти в концентрацията на ензима каталаза, съотнесено към групата на контролите, с подчертано по-ниски средни нива при по-тежкия болестен фенотип с вторично съдово заболяване. При тази подгрупа понижената активност на САТ спрямо неусложнения Т2ЗД, който демонстрира високи серумни концентрации, вероятно се дължи на инхибиране на ензима в състояние на изразен оксидативен стрес. Повишената активност на САТ при новодиагностицирания диабет от своя страна може да е последица от: 1) активирането на SOD (и съответното увеличено образуване на водороден пероксид); 2) намалената активност на глутатионпероксидазата в условията на "недостиг" на НАДФН (образуващ се главно в пентозофосфатния цикъл, а при ЗД метаболизма на глюкозата е насочен към синтеза на сорбитол и фруктоза); 3) намалено ниво на редуцирания глутатион.

Изследвахме и различията в кръвната каталаза между половете и намерихме еднотипно понижени стойности при мъжете и жените с диабет, за разлика от здравите лица, където мъжете демонстрираха конвергенция към по-високите средни серумни нива в сравнение със здравите жени. Също така, намаляването на този биомаркер не показва характерен модел на взаимозависимост от провежданата антидиабетна терапия. Каталазата не показва явна корелационна зависимост с величините на другите два антиоксиданта в нашата кохорта диабетици.

### **Супероксид дисмутаза**

Супероксид дисмутазиите (SODs) са група металоензими, които съставляват много съществена антиоксидантна защита срещу оксидативния стрес в организма и действат като посредник срещу заболяванията, медиранни от реактивните кислородни видове, включително захарния диабет. Те формират предната линия на защита срещу увреждания, опосредствани от реактивни кислородни видове (ROS) [Kangralkar VA, 2010]. Тези протеини катализират дисмутацията и конверсията на супероксидния свободен радикал ( $O_2^-$ ) в молекулярен кислород и водороден пероксид ( $H_2O_2$ ) и намаляват нивото на  $O_2^-$ , което при прекомерна концентрация има увреждащ ефект върху клетките [Yasui K, 2006]. С други думи, SOD дисмутират супероксида до други съединения, които са по-малко токсични [Tiwari B.K, 2013]. Тази реакция е придружена от алтернативно окисляване-редукция на метални йони, присъстващи в активния център на супероксид дисмутазиите [McCord JM, 1969; Tainer JA, 1983]. Въз основа на металните кофактори, намиращи се в активните центрове на ензима, SOD могат да бъдат класифицирани в четири отделни групи, локализиращи в различни субклетъчни компартменти: съдържащи мед-цинк, желязо, манган или никел [Miller AF, 2001; Youn HD, 1996].

При хипергликемични състояния ендотелните клетки произвеждат повишени нива на  $O_2^-$  [Graier WF, 1999]. Свърхпродукцията на  $O_2^-$  инхибира глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназата, която е важен ензим от гликолитичния път [Du X, 2003]. Това води до натрупване на глюкоза и други междинни метаболити от този път и до изместване към други алтернативни пътища на глюкозния метаболизъм, включващи повишена продукция на напреднали крайни продукти на гликиране. Тези данни обосновават ключовата роля на супероксид дисмутазиите.

В научната литература се дискутират разнопосочни данни относно този антиоксидантен ензим при захарен диабет. В проучване на Rahbani-Nobar ME, изследващо промените в статуса на антиоксидантните ензими супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза в еритроцитни проби, получени от 125 пациенти с диабет (тип I и II) и 120 съответстващи по пол и възраст здрави лица, активността на двата антиоксидантни ензима в еритроцитите на пациенти, страдащи от тип 1 и 2 захарен диабет е измерена значително по-ниска от тази на контролната група. Най-ниска активност е забелязана при пациенти с лош метаболтен контрол [Rahbani-Nobar ME, 1999]. Тези констатации са в съответствие с някои проучвания [Yu BJ, 1993] и не са съвместими с други [Kajanochumpal S, 1997; Tavares AM, 2019]. Резултатите на Tavares AM и съавтори недвусмислено показват, че плазмената активност на SOD е по-висока при пациенти с тип 2 ЗД в сравнение с контролите и корелира позитивно с нивата на

HbA1c [Tavares AM, 2019]. Rahbani-Nobar ME намират предполагаемо обяснение за намалената активност на SOD при техните пациенти в акумулирането на водороден пероксид. Ниската активност на SOD в тяхното проучване и при двата типа диабет внушава, че с по-дългата болестна продължителност индукцията на SOD - и следователно нейната активност - прогресивно намаляват, тъй като неензимното гликиране, другата причина за производството на водороден пероксид, преобладава в по-късните фази и допълнително инхибира Cu/Zn SOD.

Основната каталитична клетъчна защита, която протектира клетките и тъканите срещу потенциално разрушителните реакции на супероксидните радикали и техните производни, е Cu/Zn-SOD. Наблюдавана е бърза индукция на SOD при някои условия, когато клетките или организмите са изложени на оксидативен стрес [Michiels C, 1994]. Докладвана е най-високата активност на SOD в червените кръвни клетки в началото на диабета и последващо намаляване на неговата активност в хода на болестта [Domingues C, 1998]. При болни от диабет автоокислението на глюкозата води до образуването на водороден пероксид, който инактивира SOD [Fajans S, 1995].

В нашето проучване установихме **1.4-кратно понижена регулация на SOD на системно ниво при ЗД с дълготрайни усложнения и повишена активност на този ензим в ранните фази на болестта**, аналогично на публикуваните резултати. Нашето тълкувание е, че тази повишена активност е израз на **приспособяване на организма към образуваните в повече свободни радикали, по-конкретно супероксиден радикал**, както и в резултат от увеличените количества на водороден пероксид. Но при прекомерното нарастване на ROS ензимът може да бъде увреден и активността му да намалее, което явно се случва в по-късните етапи на болестта. С тази констатация ние подкрепяме изложената хипотеза за компенсаторно повишаване на антиоксидантната продукция и активност (супероксиддисмутаза и каталаза) при възникването на болестта и значителния спад на тези ензими при **крайния болестен фенотип**, както е съобщено от Domingues C, както и обяснението за това, дадено от Rahbani-Nobar ME и съавтори. Именно разликите в **болестната продължителност** при диабетичите в различните проучвания биха могли да обяснят публикуваните спорни резултати относно нивата на този редуктант в цитираната литература.

В нашето проучване, състоянието на контрол на заболяването, независимо от провежданата антидиабетна терапия, показва асоциация със системната продукция на SOD със сигнификантно повишаване на нивата в условията на недобра компенсация и трайна хипергликемия, вероятно като опит за детоксикиране на реактивните междинни

продукти или за възстановяване на резултиращите увреди. Когато анализирахме разликите в серумната концентрация на SOD между половете, забелязахме по-изразеното му понижение при болните мъже спрямо здравите мъже, но в крайна сметка концентрациите в кръвта на този ензим не показаха сигнификантни полови различия сред засегнатите от болестта в контраст със здравите лица, където мъжкият пол се отличаваше с видимо по-високи средни нива. SOD показва слаба обратна корелация с аскорбата в кръвта.

### **Аскорбат**

Витамин С (аскорбинова киселина или L-аскорбат) е донор на електрони и следователно - редуциращ агент и това свойство обяснява всичките му известни физиологични и биохимични действия, и следователно - функции. Една от жизненоважните роли на аскорбиновата киселина (аскорбат) като донор на електрони при хората е да действа като мощен водоразтворим антиоксидант с изчистващ ефект върху ексцесивните свободни радикали, както и за защита на клетъчните компоненти от техния увреждащ ефект. Аскорбиновата киселина отдава два електрона от двойната връзка, намираща се между втория и третия въглерод на 6-въглеродната му молекула, като по този начин предотвратява окисляването на други съединения. Поради естеството на тази реакция самият витамин С се окислява [Padayatty SJ, 2003].

Забележителен е фактът, че когато витамин С отдава електрони, те се губят последователно. Видът, образуван след загуба на един електрон, е свободен радикал - семихидро-аскорбинова киселина или аскорбилов радикал. В сравнение с другите свободни радикали (видове с несдвоен електрон), аскорбиловият радикал е относително стабилен, с полуживот от  $10^{-5}$  секунди, и е сравнително нереактивен. Това свойство обяснява защо аскорбатът е предпочитан антиоксидант. Накратко казано, реактивен и евентуално вреден свободен радикал може да взаимодейства с аскорбата. Реактивният свободен радикал се редуцира, а образуваният на негово място аскорбилов радикал е по-малко реактивен. Намаляването на реактивния свободен радикал посредством образуването на по-малко реактивно съединение понякога се нарича "очистване" или "погасяване" на свободните радикали. Затова, поради своите химични свойства, **аскорбатът е добър "чистач" на свободните радикали** [Buettner GR, 1993; Bielski ВН, 1975]. Аскорбиловият радикал с неговия несдвоен електрон не е дълго-живеещо съединение. При загуба на втори електрон образуваното съединение е дехидроаскорбинова киселина. Образуването както на аскорбилов радикал, така и на дехидроаскорбинова киселина се медира от голямо разнообразие от оксиданти в биологичните системи, включително молекулен кислород, супероксид, хидроксидов



радикал, хипохлорна киселина, реактивни азотни видове и следи от металите желязо и мед [Padayatty SJ, 2003].

По принцип човешката популация не е в състояние да произвежда собствена аскорбинова киселина и следователно тя трябва да се набавя стриктно от хранителни източници [Drouin G, 2011]. Поради това следва да се има пред вид, че плазмената концентрация на витамин С е силно свързана с транзиторната консумация на храни като плодове, зеленчуци и добавки [Omaye ST, 1987]. В експериментално проучване на Malo C и Wilson JX са оценени възможните взаимодействия между транспорта на глюкоза и витамин С в тънкото черво у човека. Авторите установяват, че в условията на повишен оксидативен стрес, който причинява възпаление и дисгликемия, настъпва конкурентно инхибиране на чревната абсорбция на аскорбиновата киселина от повишената концентрация на глюкозата [Malo C, 2000].

В научната литература има множество публикации, касаещи статуса на витамин С при лица с диабет. Някои проучвания демонстрират, че плазменото ниво на витамин С не се различава от това на контролите – при тип 2 ЗД [Hiroshi Yamada, 2004; Firoozrai M, 2006] и при диабет тип 1 и тип 2 със и без усложнения [Merzouk S, 2003].

Има и други сведения. В индийско проучване са сравнени 50 пациенти с Т2ЗД, които са били на лечение с перорални хипогликемични лекарства и са приемали достатъчно витамин С в диетата, с 50 здрави контроли, равностойно съпоставени по възраст, пол (между 40 и 70 години) и диетичен прием на витамин С. Авторите установяват значимо по-ниски нива на аскорбат в плазмата сред пациентите с Т2ЗД, дори при спазване на препоръчителния адекватен диетичен прием на витамин С, което показва дефицит на витамин С, повишени нужди и респективно наложителност от диетични съвети на пациенти с диабет за консумация на храни, богати на витамин С в по-големи от препоръчителните дневни дози [Bansal A, 2021]. Подобно на тези резултати друго проучване заключава, че ниското ниво на аскорбат при диабет е следствие от самото заболяване, а не поради неадекватния прием на витамин С с храната [Varma V, 2014].

Счита се, че витамин С предпазва органите от увреждане при диабет посредством следните механизми: **функционира като антиоксидант, инхибира вътреклетъчното натрупване на сорбитол и намалява гликозилирането на протеини** [Pearson JF, 2017]. Някои проучвания установяват, че добавката на аскорбинова киселина може да подобри функцията на островните клетки при пациенти с Т2ЗД, да намали кръвната захар, да увеличи синтеза и секрецията на инсулин, да подобри инсулиновата резистентност и да намали появата и развитието на усложнения



на тип 2 захарен диабет, което може да се използва за **ранната профилактика** на диабета и по-късното лечение на усложненията [Paolisso G, 1995; Chambial S, 2013; Gillani SW, 2017; Ashor AW, 2017]. В наскоро проведено проучване (2020г.) Praveen D и съавтори също изтъкват необходимостта от увеличаване на приема на витамин С при пациенти със захарен диабет, тъй като това е от полза за управление на гликемичния контрол и предотвратяване на по-нататъшни усложнения. Тези автори анализират голяма кохорта от 1200 пациенти с установен Т2ЗД относно дефицит на витамин С и корелацията между различните променливи на захарния диабет със серумните нива на витамин С. Намират преобладаващо разпространение на дефицит на витамин С при пациенти с тип 2 захарен диабет (в 55.13%), обратна връзка между нивата на кръвната захар на гладно, индекса на телесна маса и нивата на витамин С и значителна отрицателна корелация между нивата на гликирания хемоглобин със серумните нива на витамин С. Техните анализи демонстрират, че **индексът на телесна маса, гликираният хемоглобин и нивата на кръвната захар на гладно са важни предиктори за дефицит на витамин С** [Praveen D, 2020].

Интересни данни представят Brian A. Mullan и съавтори относно хемодинамичните ефекти на ежедневната добавка през устата на 500мг витамин С при диабетици (тип 2). Авторите констатират, че след 1 месец пероралната аскорбинова киселина понижава артериалното кръвно налягане и повлиява ригидността на артериалната стена. Изказват становището, че тъй като стриктният контрол на кръвното налягане намалява сърдечно-съдовия риск при диабет, добавянето на аскорбинова киселина е потенциална полезна и евтина допълнителна терапия, но е необходимо потвърждение от по-големи и по-продължителни проучвания [Mullan Brian A., 2002].

На базата на рандомизирано кръстосано проучване, включващо 4 месеца прием на добавки перорална аскорбинова киселина ( $2 \times 500$  mg/d) или плацебо при лица с тип 2 диабет, Mason SA и съавтори изказват твърдението, че антиоксидантните свойства на витамин С могат да помогнат за противодействие на високите нива на свободни радикали при хора с диабет и е окуражаващо да се види, че те са от полза за редица често срещани съпътстващи заболявания, като високото кръвно налягане [Mason SA, 2019].

По аналогия с болшинството от цитираните литературни данни, в нашето проучване установяваме **1.4 -кратно по-ниски системни нива на аскорбат при Т2ЗД със съдови усложнения в сравнение с контролите**. Допълнително представяме резултати за много близки средни концентрации на антиоксиданта сред страдащите от болестта от двата пола и липса на промяна в нивата му според състоянието на

компенсация на заболяването. От корелационните анализи в SPSS и корелационния плот от графичния потребителски интерфейс за R представяме данни за корелацията между малондиалдехид и аскорбат при изследваната група диабетици, а също и негативна корелация между малондиалдехид и аскорбат от една страна и супероксид дисмутазата от друга, което е от полза при установяване на връзките между конкретните про- и антиоксиданти.

### **Полови различия в циркулаторните нива на оксидативните маркери**

Идентифицирането на молекулярните различия между мъжете и жените би могло да даде ценна основа за изучаване на състоянията, различно засегнати от пола. Важно е изследванията върху връзката между пола и оксидативния стрес да бъдат задълбочени, тъй като оксидативният стрес е от решаващо значение при много заболявания, които засягат по различен начин мъжете и жените, включително Т2ЗД и по-специално атеросклерозата. В този контекст проучване, включващо 52 мъже и 51 жени на сходна възраст, демонстрира по-голям оксидативен стрес при здрави млади мъже в сравнение с пременопаузалните жени [Ide T, 2002]. Подобно на това, наблюдавана е по-висока продукция на ROS в съдовите клетки на мъжете в сравнение с тези на жените [Matarrese P, 2011]. В допълнение, клиничните и експерименталните данни също внушават по-голям антиоксидантен потенциал при жените в сравнение с мъжете [Bhatia K, 2012]. Тези проучвания показват, че при физиологични условия има очевидна връзка между пола и оксидативния стрес, където жените явно са по-малко податливи на оксидативно въздействие. Това може да се дължи на антиоксидантните свойства на естрогените, половите различия в активността на NADPH-оксидазата или други механизми, които все още не са установени.

В повечето части на света диабетът е по-разпространен при мъжете, отколкото при жените, особено сред популациите на средна възраст [Rich-Edwards JW, 2018]. Проучванията, фокусирани върху половите разлики на молекулярно ниво, включващи оксидативен стрес и антиоксидантен статус при диабет, досега са ограничени. Първото съобщено проучване в тази насока е от Италия и включва 56 пациенти с Т2ЗД (36 мъже и 20 жени) без анамнеза за коронарна болест на сърцето, пролиферативна диабетна ретинопатия, клинично изявена диабетна невропатия и хронична бъбречна недостатъчност и 41 здрави доброволци (24 мъже и 17 жени) без сърдечно-съдови заболявания и анамнеза за друго значимо заболяване като контроли. Пациентите и здравите субекти не са приемали никакви хранителни добавки през предходните 6 месеца. Авторите не са наблюдавали сигнификантна разлика в концентрацията на MDA

и маркерите на антиоксидантния капацитет (каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион и вит. Е) както при пациенти със ЗД, така и при здравите индивиди [Chilelli Nino Cristiano, 2018]. Contreras-Zentella ML и Hernández-Muñoz R откриват значителни разлики в еритроцитния метаболизъм на азотните съединения при жени и мъже с тип 2 захарен диабет, който е по-активен при мъжете с диабет. Промените в съдовата активност на NO допринасят за промените в сърдечносъдовия риск, асоцииран главно с мъжете [Contreras-Zentella ML, 2021].

В нашата кохорта **не бяха намерени полово-специфични различия** в системните нива на всички изследвани прооксиданти, с изключение на малондиалдехида, показващо че мъжете и жените привидно са подложени на еднакъв оксидативен стрес. Не излязоха наяве специфични за пола разлики между мъжете и жените в популацията на болните и по отношение на маркерите на антиоксидантния капацитет по подобие на италианското проучване. Необходими са бъдещи изследвания, за да се установят свързани с пола промени в оксидативните биомаркери при диабет с цел да се предложат специфични интервенции, насочени към подобряване на антиоксидантния капацитет при тези пациенти.

## **Съдови усложнения и други съпътстващи заболявания, асоциирани с тип 2 захарен диабет**

### **Диабетната невропатия**

Диабетната невропатия е вид увреждане на нервите по цялото тяло, което може да наруши автономните двигателни и сензорни функции [Abdollahi A, 2009]. Диабетната периферна невропатия е най-честата форма на диабетна невропатия, която засяга периферните нерви на крайниците и предизвиква нарушение в сензорната функция, необичайни усещания и прогресивно изтръпване, като увеличава риска от улцерации на стъпалото, ампутация, когнитивна дисфункция и икономически загуби [Sothornwit J, 2018; Ni W, 2021]. Някои автори я описват като най-честото микросъдово диабетно усложнение, което като цяло се появява рано в хода на болестта [Yovera-Aldana M, 2021; Wani FA, 2018; Dyck PJ, 1993]. Среща се при приблизително 10% от новодиагностицираните пациенти с Т2ЗД [Raman R, 2012]. Съвсем наскоро публикувано скринингово тестване в Обединеното кралство представя разпространение на диабетната периферна невропатия сред новодиагностицираните диабетици тип 2 в още по-голям размер от 26.6% [Dinh Le T, 2022]. Предишни проучвания показват, че разпространението на диабетната периферна невропатия сред пациентите с тип 2 диабет възлиза на 2.0 – 78.8% в зависимост от държавата, давността на диабета и

използвания диагностичния метод [Yovera-Aldana M, 2021; Kostev K, 2014; Ko S-H, 2012; Román-Pintos LM, 2016]. В посочените проучвания обичайно честотата нараства с възрастта и продължителността на диабета. Според Román-Pintos LM основните процеси, обуславящи патологичните промени на диабетната полиневропатия, са възпаление, оксидативен стрес и митохондриална дисфункция [Román-Pintos LM, 2016].

Нашите резултати представят забележително висока честота на диабетната периферна невропатия, особено при страдащите от болестта за продължителен период от време - над 10 години, където липсват диабетици, пощадени от това усложнение. Това подчертава, че усложнението остава кардинално в късните фази на болестта и налага специално внимание в насока ранно откриване и подходящи терапевтични интервенции.

### **Диабетна ретинопатия**

Захарният диабет е глобален проблем и диабетната ретинопатия е често усложнение на това системно заболяване с общо разпространение в световен мащаб от 34.6% (диапазон 17.99% – 51.2%). По-дългата продължителност на диабета и лошият гликемичен контрол, както и този на кръвното налягане, са силно асоциирани с диабетната ретинопатия [Yau JW, 2012]. Както беше споменато в предходен раздел, разглеждащ увреждащия ефект на реактивните кислородни видове върху ретината при диабетици, диабетната ретинопатия може да причини слепота, ако не се диагностицира и не се лекува своевременно. Въпреки това обичайно са необходими няколко години, докато диабетната ретинопатия достигне етап, в който може да застраши зрението. В проучване, проведено в Пакистан, диабетна ретинопатия е открита при 23.9% от диабетиците с тип 2 ЗД и е асоциирана с продължителността на заболяването, възрастта при представяне, мъжкия пол, високия общ холестерол, високия LDL и микроалбуминурията. Средната продължителност на захарния диабет, при която е налице ретинопатия в тяхното изследване, е  $16.05 \pm 0.903$  години в сравнение с  $4.39 \pm 0.197$  години, при която пациентите все още не са развили ретинопатия [Hussain S, 2013]. Ретроспективен кохортен анализ на лица с новодиагностициран тип 2 диабет, проведен от Центъра за изследване и наблюдение на Кралския колеж на общопрактикуващите лекари в Обединеното кралство между 2005 и 2009г. и включващ 11 399 лица, разкрива изходно разпространение на ретинопатията от 18%, което е по-ниска стойност спрямо 37% по данни от предшестващо Проспективно изследване на диабета в Обединеното кралство (UKPDS-1998). На 7-мата година 11.6% от пациентите

с изходна ретинопатия са имали прогресиране на ретинопатията, докато тези без изходна ретинопатия развиват ретинопатия в 46.4% от случаите за този срок [Shah S, 2021].

Нашите резултати показват сравнително нисък дял на ретиналното увреждане в по-ранните фази на болестта от 7.5%, но след 10-годишен срок на еволюция, честотата на срещане на тази съдово-свързана проява нараства над 5 –кратно и обхваща близо 40% от диабетниците.

### **Диабетна нефропатия**

Диабетната нефропатия е една от основните причини за терминална бъбречна недостатъчност, чиято честота бележи тенденция за увеличаване, въпреки че все повече доказателства сочат, че тя е предотвратима, поне принципно, чрез навременна намеса [Raine AE, 1993; Ritz E, 1999].

В миналото битуваше схващането, че бъбречната прогноза при тип 2 захарен диабет е значително по-добра, отколкото при тип 1 захарен диабет и че само незначителна част от пациентите с Т2ЗД (<5%) завършват с краен стадий на бъбречна недостатъчност, рискът от която е само малко по-висок, отколкото в общата популация [Palumbo PJ, 1976]. Това схващане доведе до погрешното разбиране, че Т2ЗД, особено при възрастните хора, е относително доброкачествено състояние що се отнася до бъбречните последици. В съвременното тази гледна точка е ревизирана напълно. Hasslacher и съавтори отбелязват, че кумулативният риск от протеинурия е сравним при пациенти с тип 2 и тип 1 захарен диабет, както и рискът от бъбречна недостатъчност при изявена протеинурия при двата типа диабет [Hasslacher C, 1989]. Освен това, степента на понижаване на размера на гломерулната филтрация при напреднала нефропатия в резултат на Т2ЗД е сравнима с тази на болните с Т1ЗД, както е документирано от Biesenbach и съавтори [Biesenbach G, 1994]. Тези констатации междуременно са потвърдени и в други проучвания. Едно от тях е проведено в Швеция и цели да оцени появата на ранно бъбречно засягане в национална популационна кохорта от млади диабетници на възраст от 15-34 години. По време на периода на проследяване с медиана 9 години (диапазон 6-12) 6.6% от диабетниците са били диагностицирани с начална или явна диабетна нефропатия (т.е. микро- или макроалбуминурия), 5.6% в кохортата с тип 1 и 16% в тази с диабет тип 2. Освен това, микроалбуминурия и макроалбуминурия са наблюдавани главно при пациенти с тип 2 диабет. Високата средна стойност на HbA1c по време на периода на проследяване и високото кръвно налягане са идентифицирани като фактори, повишаващи риска от развитие на признаци на нефропатия. В сравнение с пациентите с тип 1 диабет, тези с

тип 2 диабет са проявили склонност към повишен риск от бъбречно засягане след корекция съобразно пола, тютюнопушенето, гликемичния контрол и кръвното налягане. Авторите изказват становището, че въпреки съвременното лечение и редовния контрол на кръвната захар, болните от диабет все още не са защитени от развитието на бъбречно засягане през първите 10 години от дебюта на болестта [Svensson M, 2003].

В проспективно проучване върху диабетици с тип 2 ЗД в Обединеното кралство честотата на разпространение на нефропатията е изчислена от порядъка на 30.8% [Adler AI, 2003]. Наскоро проведено проучване в Йордания показва, че приблизително половината от пациентите с Т2ЗД имат бъбречно ангажиране от диабета [Farah RI, 2021]. Данни от KORA Augsburg Diabetes Family Study, проведено в Германия и обхващащо 581 болни с Т2ЗД, посочват микроалбинурия в 27.2% от случаите и макроалбинурия при 9.0% от общо 581 включени диабетици. Изследователите идентифицират HbA<sub>1c</sub>, продължителността на диабета, систолното кръвно налягане, серумния креатинин, тютюнопушенето и обиколката на талията като независими рискови фактори, свързани с албинурията (микро- или макроалбинурия) [Meisinger C, 2008].

Ravid M и съавтори също изследват основните рискови фактори за нефропатия при захарен диабет тип 2 и заключават, че прогресирането на бъбречното увреждане е многофакторен процес. Рисковите фактори в низходящ ред на значимост включват повишени нива на плазмения общ холестерол, малки повишения на средното кръвно налягане, хипергликемия, висок ИТМ, ниски нива на HDL, високи нива на липопротеини с ниска плътност, тютюнопушене, ниско социално-икономическо ниво и мъжки пол. Тези автори установяват и поразително сходство с рисковите фактори за атеросклероза, тъй като пациентите с висок риск от микроалбинурия също са имали 15 пъти по-висок риск от артериосклеротично сърдечно-съдово заболяване [Ravid M, 1998].

Анализът на нашите резултати разкрива липса на манифестна нефропатия за краткотрайния период на болестна прогресия и бъбречно ангажиране от диабета при давност над 10 години в 13.2% от случаите. Акцентирайки върху ролята на прооксидантите, в регресионните модели, контролирани за ефектите на възрастта и пола, не установихме независимо влияние на конкретен биомаркер върху развитието на диабетна нефропатия.

### **Кардио-васкуларни заболявания**

## Артериална хипертония

Артериалната хипертония често се асоциира със захарния диабет и разпространението ѝ е двукратно по-високо при диабетиците в сравнение с общата популация [Barrett-Connor E, 1981; Teuscher A, 1989]. Това превалиране е свързано с повишената ригидност на големите артерии, предхождащо често макроваскуларните инциденти [Lehmann ED, 1992; Benetos A, 1997]. Паралелното съществуване на тези заболявания ускорява микроваскуларните и макроваскуларните усложнения и значително увеличава сърдечно-съдовия риск, риска от инсулт и краен стадий на бъбречно заболяване [Cockcroft JR, 2000]. Сърдечно-съдовите събития са повече от двукратно по-вероятни при пациенти с диабет и хипертония, отколкото при тези с което и да е заболяване поотделно [Stamler J, 1993].

При пациенти с тип 2 захарен диабет инсулиновата резистентност и хиперинсулинемията играят основна роля в патогенезата на хипертонията [Sowers JR, 2013]. В момента, когато се диагностицира Т2ЗД, абнормен профил на кръвното налягане се открива при приблизително 80% от случаите. При установена диабетна нефропатия хипертонията е най-важният фактор, който акцелерира прогресирането ѝ [Ritz E, 1999].

В изучаването на конвергиращите пътища за съвместното съществуване на ЗД и хипертонията е установено, че двете заболявания споделят някои общи патофизиологични механизми, включително: несъответстващо активиране на ренин ангиотензин алдостероновата система, оксидативен стрес в резултат на прекомерно производство на реактивни кислородни видове (ROS), възпаление, нарушена инсулин-медирана вазодилатация, повишено активиране на симпатиковата нервна система, дисфункция на вродените и придобитите имунни отговори и абнормна бъбречна реабсорбция на натрий [Sowers JR, 2011; Sowers JR, 2013]. Обезитетът и висцералното затлъстяване също са ключови патогенни фактори за съвместното съществуване на ЗД и хипертонията [Sowers JR, 2013].

Анализът на нашите данни е в съответствие с посочените предшестващи наблюдения на авторите, изследвали този въпрос, и представя значителна степен на припокриване между двете болести още в ранните фази на ЗД с честота на срещане на артериалната хипертония в 90% при продължителност на диабета до 10 години. При над 10 годишна давност на ЗД артериална хипертония беше представена при болшинството от случаите и липсваше в по-малко от 2% от диабетиците, включени в нашето проучване, което е силно доказателство в полза на конкордантността между



двете болести.

### **Ишемична болест на сърцето и мозъчен инсулт**

Като цяло, в сравнение с лицата без диабет болните от тип 2 захарен диабет имат значително по-висок риск от сърдечно-съдова заболеваемост и смъртност и са непропорционално засегнати от сърдечно-съдови заболявания [Gu K, 1999]. Преобладаващата част от този ексцесивен риск е свързана с повишената честота на добре известните рискови фактори при диабетиците като хипертония, дислипидемия и затлъстяване, но и други нетрадиционни рискови фактори, като инсулиновата резистентност и хиперинсулинемията, постпрандиалната хипергликемия, глюкозната вариабилност, микроалбуминурията, хематологични и тромбогенни фактори, възпалителния С-реактивен протеин, хомоцистеин и витамини, генетични и епигенетични фактори, могат да бъдат от съществена важност. Така че увеличаването на сърдечно-съдовите заболявания при пациенти с тип 2 захарен диабет се дължи на сложна комбинация от различни традиционни и нетрадиционни рискови фактори, които имат важна роля при инициацията и прогресирането на атеросклерозата през дългата ѝ естествена еволюция от ендотелна дисфункция до клинични инциденти [Fonseca VA, 2000; Martín-Timón I, 2014].

Диабетното съдово заболяване е отговорно за двукратно увеличение на случаите на коронарна болест на сърцето и инсулт и два до осем пъти повишение на риска от сърдечна недостатъчност [Diabetes Drafting Group. Diabetologia, 1985]. По-късно, в системен литературен обзор, анализирайки данни от 57 статии с общо 4 549 481 лица с тип 2 ЗД, Einarson TR и съавтори установяват, че в световен мащаб от ССЗ са засегнати 32.2% от диабетиците, 29.1% са имали атеросклероза, 21.2% ИБС, 14.9% сърдечна недостатъчност, 14.6% стенокардия, 10.0% инфаркт на миокарда и 7.6% инсулт. ССЗ са били основна причина за смъртност сред пациентите с Т2ЗД, което представлява приблизително половината от всички смъртни случаи през десетгодишния периода на изследването, като коронарната болест на сърцето и инсулта са имали основен принос за това [Einarson TR, 2018]. Неслучайно в изявление за здравни специалисти на Американската сърдечна асоциация през 1999г. е изказано твърдението, че от гледна точка на сърдечно-съдовата медицина е уместно да се каже, че „диабетът е сърдечно-съдово заболяване“ [Grundy SM, 1999].

В изследваната от нас кохорта установихме ИБС в различните ѝ форми при 30% от болните с давност на диабета до 10г. и 1.5-кратно нарастване на честотата ѝ до 43.4% при по-голяма болестна продължителност. **Мозъчният инсулт в хода на**



заболяването наблюдавахме при 10 до 13.2% от случаите, като сред прооксидантите отчетохме съществена роля на 8-OHdG като рисков фактор за изявата му.

### Неалкохолна чернодробна стеатоза

Неалкохолната стеатозна чернодробна болест често се съчетава с тип 2 захарен диабет, тъй като се причислява към проявите на метаболитния синдром. Наднорменото тегло/затлъстяването и инсулиновата резистентност са силно асоциирани с този тип чернодробното увреждане. Разпространението ѝ е в 59.67% сред случаите с тип 2 ЗД, което я прави значим обществен здравен проблем и налага щателно изследване на диабетиците в тази насока. [Anstee QM, 2011]. В други проучвания се съобщава дори по-висока честота до 75% при диабетици с тип 2 ЗД [Angulo P, 2002]. Спектърът на патологичните състояния при неалкохолната стеатозна чернодробна болест варира от обикновена стеатоза през неалкохолен стеатохепатит и цироза [Hazlehurst JM, 2016]. Нещо повече, неалкохолната чернодробна стеатоза се счита за независима детерминанта за сърдечно-съдови заболявания [Targher G, 2010], която се наслоява допълнително към и без друго множеството сърдечно-съдови рискови фактори, водещи до нежелани резултати при тази популация пациенти. Следователно неалкохолната стеатозна чернодробна болест е комплексен проблем с последици, проявяващи се далеч извън пределите на черния дроб [Richard J, 2011].

В модела, лансиращ тезата за „два удара“ в патогенезата на неалкохолната стеатозна чернодробна болест, описан за първи път от Day и James, натрупването на масти в черния дроб е „първият удар“, необходим за развитието на чернодробно увреждане [Day CP, 1998]. След това омазненият черен дроб става уязвим за „втори удар“, което води до увреждане на хепатоцитите, възпаление и фиброза. Чернодробната стеатоза, дефинирана като ектопично натрупване на триглицериди в хепатоцитите се развива, когато поглъщането и синтеза на свободни мастни киселини в черния дроб надвиши окисляването и екскрецията им в кръвния поток. Този дисбаланс може да възникне при следните обстоятелства: излишък на свободни мастни киселини, произведени от мастната тъкан или приети чрез диетата; повишена чернодробна липогенеза; нарушено чернодробно елиминиране на свободните мастни киселини [De Bruyne RM, 2010].

Проучванията показват, че неалкохолната стеатозна чернодробна болест от своя страна е предиктор за изявата на диабет, независимо от традиционните рискови фактори, включително затлъстяване, периферна инсулинова резистентност и

метаболически синдром, което предполага, че тя има пряк причинно-следствен ефект върху развитието на ЗД вероятно чрез **повишаване на чернодробната инсулинова резистентност** [Cusi K, 2010]. Неконтролираният диабет също засилва или влошава чернодробната стеатоза, като по този начин създава порочен цикъл, който свързва тясно двете състояния едно с друго [Richard J, 2011].

В нашата кохорта диабетици установихме чернодробна стеатоза в 18.9 – 27.5% от случаите в зависимост от болестната продължителност, със средна честота около 22.6% за цялата група диабетно болни, което е около  $\frac{1}{4}$  от включените пациенти. В унисон с казаното по-горе, намерихме добра корелация между наличието на стеатоза и плазмените концентрации на триглицеридите. Освен това, бинарната логистична регресия разкри ролята на малондиалдехида като рисков фактор за чернодробна стеатоза. Това не е изненадващо имайки пред вид, че MDA е продукт от липидната пероксидация на полиненаситени мастни киселини и отразява увреждащия ефект на хронично повишените нива на липидните метаболити върху неадипозните тъкани, в случая върху черен дроб, процес, известен като липотоксичност.

#### **Заключителни бележки**

В този научен труд ние очертаваме биохимичната основа на T23Д и описваме настоящите хипотези за ролята на оксидативния стрес в патогенезата на заболяването. Изследвали сме серумните профили на голям панел от прооксиданти и антиоксиданти, дискутирайки ролята им в контекста на болестните характеристики и провежданата терапия, като представяме обобщена съвременна информация от прегледа на литературата по темата. Оценихме нивата в циркулацията на прооксидантите като диагностични тестове при T23Д в сравнение със здрави индивиди, което е от полза за определяне на приложимостта им в клиничната практика.

Освен традиционната статистика за пълнота приложихме и статистически методи, базирани на информатиката. Тези компютърни статистически методи са особено полезни в случаите с много голям размер на извадката и нехомогенни набори от данни. В тази връзка беше използван графичен потребителски интерфейс за R.

С цел изследване и обобщаване на корелациите между прооксидантите и антиоксидантите в групите болни с T23Д и здравите контроли проведохме факторен анализ в програмата R Studio и конструирахме биплот- и корелационен плот-графики. Факторният анализ е техника за мултивариантен анализ, базирана на идеята за намаляване на броя на променливите с цел улесняване на визуализацията и разбирането на структурата на данните. От друга страна допълнителното предимство е, че

намаляването на данните в по-малък набор от характеристики е без голяма загуба на информация. Този анализ води до създаване на нови променливи, наречени фактори, които същевременно отразяват максимално добре вариациите (дисперсията) в изследваните биомаркери и запазват структурата на данните, т. е. създадените от анализа фактори са обобщаващи за повече от една взаимно-корелиращи променливи. Факторният анализ е полезен при класифицирането на настоящите характеристики във фактори, представляващи скрити характеристики, които не са измерени директно.

Радарната диаграма е полезен начин за показване на многовариантни наблюдения с произволен брой променливи. Тя е вид диаграма, която се състои от поредица от равноъгълни спици, наречени радиуси, като всяка спица представлява една от променливите. Дължината на данните на спицата е пропорционална на големината на променливата спрямо максималната величина на променливата. Начертава се линия, свързваща стойностите на данните за всяка спица. Звездният изглед може да се използва за отговор на следните въпроси: Кои резултати са най-сходни, т.е. има ли клъстери от наблюдавани резултати? Има ли отклонения в наблюдаваните данни? Хийтмап графиката показва относителното разпределение на интензитета на прооксидантите в групите на ЗД и здравите контроли. Всички тези визуализиращи методи потвърждават че има очевидна разлика между двете изследвани групи на диабетиците и здравите контроли, в полза на твърдението, че прооксидантният модел е променен при болестта.

Важно е да се отбележи, че в нашето проучване прооксидантите и антиоксидантите и болестните характеристики са оценени във фиксирана точка от времето. Проспективното проследяване на вариациите в серумните концентрации на оксидативните маркери в хода на заболяването би могло да разкрие още по-ценни данни относно степенните промени на оксидативния стрес в различните фази на болестния процес. От друга страна следва да подчертаем, че пациентите с диабет, включени в проучването, са лекувани с различни фармакологични агенти, включително инсулин.

Като отправна точка в нашето изследване се насочихме към болни с установен T23Д. Болшинството от проучванията в достъпната научна литература са фокусирани върху дефинитивното заболяване, а не върху ранните стадии, поради което относителното значение на различните оксидативни пътища за иницирането и прогресирането на заболяването все още не е напълно изяснено. Ранното диагностициране и лечение на хипергликемията очевидно трябва да се извършва

години преди развитието на тип 2 захарен диабет (предиабетни пациенти), а оксидативният стрес и възпалението по време на преддиабет биха могли да бъдат полезни маркери за клиницистите с оглед предотвратяване на прогресията му до тип 2 диабет. В тази връзка таргетните имунотерапии и антихипергликемичните лекарства придобиват важна роля за подобряване на възпалителното състояние при пациенти с диабет.

Доброто познаване на механизмите на оксидативен стрес при тип 2 захарен диабет и предизвиканите от него увреждания позволява научно обоснован терапевтичен протокол в комбинация с контролирана антиоксидантна терапия. Ето защо усилията ще бъдат насочени към търсене на нов подход в лечението на диабета, при който освен стабилизиране на въглехидратната обмяна да се повлияе и антиоксидантната защита на организма с цел нормализиране на антиоксидантния статус и намаляване на оксидативните увреждания за постигане на оптимални резултати при минимален риск от ROS и други увреждащи реактивни молекули.

## **ИЗВОДИ**

1. Хроничният излишък на въглехидрати при ЗД тип 2 и лошият метаболитен контрол генерират изобилие от реактивни междинни продукти, водещо до увеличаване на химическата модификация на протеини, липиди и дезоксирибонуклеинови киселини.
2. Нивата на оксидативен стрес в циркулацията са значително по-високи при тип 2 ЗД, особено при наличие на микро- и макроваскуларни усложнения, подкрепящо твърдението, че оксидативният стрес засяга съдовата функция и в крайна сметка допринася за съдово заболяване.
3. Лошият гликемичен контрол е асоцииран с повишени серумни концентрации на някои прооксиданти, като най-силно независимо влияние върху нивата на гликирания хемоглобин (HbA1c), отразяващ гликемичния статус на пациента ретроспективно, има 8-OHdG.
4. Липсват полови различия в системните нива на прооксидантите и антиоксидантите сред болните от тип 2 ЗД от българската популация, с изключение на MDA, който е с по-високи серумни концентрации при мъжете в сравнение с жените, независимо от наличието или липсата на заболяване и предимно при мъжете със ЗД.

5. Серумните MDA, карбонилираните протеини и 8-OHdG показват връзка с параметрите на гликемичния контрол. MDA, ROS и 8-OHdG корелират най-вече с микроваскуларните усложнения.
6. Праговите стойности за изследваните оксидационни биомаркери, получени от ROC анализите, биха могли да служат като референтен индикатор, в допълнение към клиничната информация, за откриване на ЗД с асоциирани съдови усложнения. Най-ефективният индикатор, с висока положителна предиктивна стойност е •NO, който може да има значителна добавъчна стойност при отчитане на заболяването и да засили точността на клиничната диагноза.
7. Лечението с Insulin като монотерапия или в комбинация с перорални антидиабетни средства и само с перорални медикаменти не променя съществено нивата на биомаркерите на оксидативен стрес в циркулацията.
8. Диабетната полиневропатия е с висока честота на срещане, ранна изява сред диабетиците и задължително наличие след 10 годишна болестна давност и нейното развитие не показва независимо влияние от конкретен параметър на оксидативен стрес.
9. Преобладаващият процент (87.5%) от случаите с диабетна ретинопатия е при над 10 годишен клиничен ход на заболяването, когато делът на това микроваскуларно увреждане нараства петкратно. Близко до сигнификантен и позитивен независим предиктор за очно ангажиране от диабета са ROS.
10. Бъбречното ангажиране от болестта е по-характерно за по-голямата болестна продължителност. Изследваните прооксиданти не оказват независимо влияние върху развитието на диабетна нефропатия.
11. Артериалната хипертония е една от най-честите коморбидности при диабетиците, срещаща се в 95%, с тенденция за повишаване на дела на хипертониците с времето. Нарастването на серумните нива на азотния оксид не е рисков фактор за нейното развитие.
12. ИБС е представена сред близо 1/3-та от болните със захарен диабет и честотат ѝ се увеличава числено, но несигнификантно в хода на болестта. Нарастването на възрастта е статистически високо-сигнификантен рисков фактор за развитие на ИБС, без значим независим ефект на прооксидантите.
13. Мозъчно-съдовата болест засяга около 12% от диабетиците, със сходна честота независимо от етапа на развитие на болестта. 8-OHdG показва тенденция към 1.8 –кратно повишаване на риска от мозъчен инсулт с всяко нарастване на концентрацията му в системната циркулация.

14. Неалкохолна чернодробна стеатоза се наблюдава при близо  $\frac{1}{4}$  от диабетичите и е тясно свързана с отклоненията в липидния статус и нарушенията в чернодробния липиден метаболизъм. По-вероятно е нейната изява да настъпи в по-младата възраст и при диабетичи с по-високи циркулаторни нива на MDA.
15. Изследванията в насока изучаване на ролята на про- и антиоксидантните системи при ЗД тип 2 разкриват нови стратегии за лечение и са важна тенденция в съвременната медицина.

## **ПРИНОСИ**

### ***Методични***

1. За първи път в ендокринологичната практика у нас е осъществена комплексна оценка на състоянието на оксидативен стрес при диабетичи със ЗД тип 2, посредством тестване на серумните нива на множество про- и антиоксидантни агенти и е направено сравнение с това на здрави контроли.

### ***Научно - приложни***

1. Определена е ползата от изследването на маркерите на оксидативен стрес в серума при ЗД тип 2 в ежедневната клинична практика.
2. Определена е специфичността, сензитивността, положителната и отрицателната предиктивна стойност на прооксидантните биомаркери като диагностичен тест за откриването на захарен диабет тип 2 със съдови усложнения, както и степента на релативния принос на всеки един от тях за болестния процес.
3. Оценено е влиянието на циркулиращите прооксиданти върху гликемичния контрол при тип 2 ЗД.
4. Доказана е връзката на серумните оксидативни биомаркери с болестните характеристики при тип 2 захарен диабет.
5. Установена е промяната в системните нива на биомаркерите на оксидативен стрес съобразно провежданата терапия.
6. Еднозначно е доказана връзката между ОС и хроничните усложнения при диабета. Това ще даде възможност чрез прилагане на антиоксидантна терапия да се предотвратят или поне забавят съдовите усложнения при заболяването.

### ***Научно - теоретични***

1. Изследван е голям панел от прооксиданти и антиоксиданти, за да се определи ролята на оксидативния стрес за развитието на тип 2 захарен диабет със съдови

усложнения. Паралелното измерване на множество различни биомаркери има по-голяма информативна стойност в сравнение с индивидуалните анализи сами по себе си.

2. Изследвани са половите различия в серумните нива на прооксидантите и антиоксидантите при болни с тип 2 ЗД от българската популация.
3. Идентифицирани са предикторите, повлияващи вероятността за развитие на диабет-специфичните съдови усложнения и другите ко-морбидности при тип 2 ЗД. Резултатите от регресионните модели могат да се използват за прогнозиране.

### ***Приноси с потвърдителен характер***

1. Потвърдена е важната роля на оксидативния стрес в метаболитните нарушения, заложи в патогенезата на ЗД тип 2 със съдови усложнения, като е посочена ползата от изследването на реактивните молекули, съдържащи свободни радикали за реалната клинична практика.

### **ПУБЛИКАЦИИ:**

1. **Goycheva, P.**, Nikolova, G., Ivanova, M., Kundurdzhiev, T., & Gadjeva, V. (2019). Predictive value of some pro-oxidants in type 2 diabetes mellitus with vascular complications. *BioScience Trends*, 13(2), 168-175.(IF2019:1.58).
2. **Goycheva, P.**, Gadjeva, V., & Popov, B. (2006). Mini-review Oxidative Stress And Its Complications In Diabetes. *Trakia Journal of Sciences*, 4(1), 1-8.

### **УЧАСТИЯ:**

1. Protein carbonyl content as oxidative stress marker in diabetes mellitus patients with vascular complications - V. Pilicheva, G.Nikolova, **P.Goycheva**, A. Zheleva, V. Gadjeva; XIV International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria 7-10 May, 2015 – устно представяне
2. Научен семинар „Научната дейност в Тракийски университет – международни измерения и предизвикателство за бизнеса“ - **P.Goycheva**, G.Nikolova, D.Ivanova, A.Zheleva,V.Gadjeva. Influence of the glycemic control on some Real time biomarkers of free radical formation in Type 2 Diabetes patients: An Electron Paramagnetic Resonance Study – устно представяне
4. **Гойчева П.**, Геренова Ж, Николова Г, Гаджева В. Протеин-карбонилно съдържание (protein carbonyl content, PCC) и малондиалдехид (malondialdehyde, MDA) като биомаркери на оксидативен стрес при тип 2 захарен диабет. Юбилеен Национален

Конгрес по Ендокринология 8 – 11 октомври 2015, Пловдив, България – постерна сесия, устно представяне.

## ABSTRACT

### ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN TYPE 2 DIABETES AND ITS VASCULAR COMPLICATIONS

**The aim** of present study was:

To analyze the oxidative profile in relation to the disease characteristics in patients with type 2 diabetes mellitus with vascular complications from the Bulgarian population, in order to assess the role of oxidative stress in the development of the disease and the prognostic significance of some of its markers.

The **Review section** describes that oxidative stress is a factor playing an important role in the pathogenesis and progression of many diseases. In modern times, convincing evidence has accumulated supporting the role of oxidative stress as one of the main causes of the development of type 2 diabetes mellitus and its long-term vascular complications. The dysregulated production and function of prooxidants, creating the pathogenetic basis of the disease, makes them promising candidate biomarkers that could serve as an indicator for the diagnosis of type 2 diabetes mellitus, as well as as predictors of the development of diabetes-specific complications.

The **Methods section** describes the applied analytical and instrumental methods: clinical, biochemical, spectrophotometric, immuno-enzymatic, EPR.

The **Results** are described in 12 subsections:

- 1 Serum levels of the studied prooxidants and antioxidants in DM patients and healthy subjects
- 2 Comparison of the studied prooxidants and antioxidants according to the compensation of diabetes mellitus
- 3 Factors associated with DM compensation status as measured by serum glycated hemoglobin (HbA1c) levels
- 4 Gender differences in the serum concentration of the studied oxidative markers in DM patients and healthy individuals
- 5 Relationship of the serum concentration of the studied oxidative markers with the disease characteristics in type 2 DM with vascular complications
- 6 Correlation analysis (Pearson Correlation) of serum concentrations of prooxidants and antioxidants



- 7 Predictive value of investigated prooxidants in diabetes mellitus. Receiver operating characteristic curves with threshold values of prooxidants for detection of type 2 diabetes associated with vascular complications.
- 8 Comparative analysis of mean serum concentrations of prooxidants and antioxidants among type 2 DM patients with micro-/macrovascular complications in relation to type of treatment
- 9 Relationship of disease duration with the appearance of diabetes-specific vascular complications and other comorbidities associated with type 2 DM
- 10 Factor analysis and visualizations of oxidative stress profiles in type 2 DM patients and healthy subjects
- 11 Principal component analysis (PCA) dim() function in the R programming language. PCA biplot and correlation plot
- 12 Summary via Heatmap

**In conclusion**, the chronic excess of carbohydrates present in T2DM and poor metabolic control result in creation of an abundance of reactive intermediates, leading to increase chemical modification of proteins, lipids and DNAs. Oxidative stress affects vascular function and ultimately contributes to vascular disease. The cutoff value for the studied oxidative biomarkers obtained from plotted ROC curves may serve as an indicator of clinical reference for detecting T2DM with associated vascular complications. The most efficient indicator is •NO, which may have the added ability to account for the disease and may strengthen the accuracy of clinical diagnosis.

The **Contributions section** is given at the end of thesis.