



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Втора катедра по вътрешни болести

Секция по гастроентерология

Д-р Димитър Пенчев Терзиев

**БИОМАРКЕРИ НА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС
ПРИ ХРОНИЧНИ ЧЕРНОДРОБНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ,
СВЪРЗАНИ С ИНСУЛИНОВА РЕЗИСТЕНТНОСТ**

Автореферат

*на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор“*

по научна специалност „Гастроентерология“
шифър: 03. 01. 14

Научен ръководител

Доц. д-р Владимир Николов Андонов, дм

Официални рецензенти

Проф. д-р Маргаритка Иванова Бончева, дм

Доц. д-р Боян Иванов Нончев, дм

Пловдив, 2022 год.

Дисертационният труд е написан на 141 страници и е онагледен с 31 таблици, 29 фигури и 5 приложения. Цитирани са 210 литературни източника, от които 8 на кирилица и 202 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита пред Научно жури от разширен катедрен съвет на Втора катедра по вътрешни болести, МУ-Пловдив с протокол № 45 от 01.06.2021 год.

Научно жури:

Вътрешни членове:

Доц. д-р Митко Димитров Митков, дм

Доц. д-р Боян Иванов Нончев, дм

Външни членове:

Доц. д-р Миглена Славчева Стамболийска-Николова, дм

Доц. д-р Мариана Пенкова Радичева, дм

Проф. д-р Маргаритка Иванова Бончева, дм

Резервни членове:

1. Проф. д-р Мария Стоянова Панчовска-Мочева, дм

2. Доц. д-р Мариета Йорданова Симонова-Василевска, дм

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 30.06.2022 г. от 11:00 часа във виртуална среда на платформа ZOOM

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел, МУ-Пловдив, бул. „В. Априлов“ 15А и са публикувани на сайта на Университета.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	5
ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	9
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	10
1. Клиничен материал.....	10
2. Използвани методи.....	13
РЕЗУЛТАТИ.....	16
1. Концентрации на серумен МДА, СОД и плазмена ГПО при пациенти с хроничен хепатит и съпоставка с данните от същите показатели при лица от контролна група.....	16
2. Концентрации на серумен МДА, СОД и плазмена ГПО при пациенти с чернодробна цироза и съпоставка с данните от същите показатели при лица от контролна група.....	18
3. Сравнително проучване на показателите на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит и с чернодробна цироза.....	21
4. Проучване на влиянието на пола върху серумните концентрации на метаболитните показатели и показателите на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит, с чернодробна цироза и при лицата от контролната група.....	22
5. Проучване на взаимовръзките между показателите на оксидативния стрес, както и между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели при пациентите с хроничен хепатит, с чернодробна цироза и при лицата от контролната група.....	27
ОБСЪЖДАНЕ.....	34
1. Избор на подходящи показатели за оценка на активността на оксидативния стрес при пациенти с хронични чернодробни заболявания.....	34
2. Показатели на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит.....	36

3. Показатели на оксидативния стрес при пациентите с чернодробна цироза	39
4. Сравнение на показателите на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит и с чернодробна цироза.....	41
5. Влияние на пола върху метаболитните показатели и показателите на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит, с чернодробна цироза и при контролната група.....	43
6. Анализ на връзката между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели при пациентите с хроничен хепатит, с чернодробна цироза и при контролната група.....	45
ИЗВОДИ.....	49
ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	51
Списък на публикациите и научните съобщения във връзка с дисертационния труд	52

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

I. На кирилица

АСАТ – аспартат аминотрансфераза

АЛАТ – аланин аминотрансфераза

АТФ – аденозинтрифосфат

АФ – алкална фосфатаза

БХ – биохимия

ГГТ – гама-глутамилтрансфераза

ГПО – глутатион пероксидаза

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

КТ – компютърна томография

ЛДЛ-холестерол – холестерол в липопротеините с ниска плътност

МДА – малондиалдехид

ПКК – пълна кръвна картина

РКЧ – реактивни кислородни части

РАЧ – реактивни азотни части

СОД – супероксид дисмутаза

ТГ – триглицериди

ХДЛ-холестерол – холестерол в липопротеините с висока плътност

II. На латиница

Anti HCV – антитела срещу хепатитен вирус С

CV – коефициент на вариация

ELISA – ензимносвързан имуносорбентен анализ

HBsAg – повърхностен антиген на хепатит В вирус

НОМА-IR – хомеостазен модел за оценка на инсулиновата резистентност

Mean – средна аритметична стойност

SD – стандартно отклонение

SEM – стандартна грешка на средната аритметична

ВЪВЕДЕНИЕ

Независимо от подобрените диагностични и терапевтични възможности, и днес хроничното чернодробно заболяване продължава да бъде значим медицински и социално-икономически проблем. От една страна, това вероятно се дължи както на недокрай изяснените етиопатогенетични механизми, така и на нарастващото му разпространение. От друга страна, преходът от остро към хронично чернодробно заболяване може да протече с неспецифични оплаквания или дори без клинични симптоми, което затруднява неговото своевременно откриване.

Смята се, че голяма част от патологичните процеси (макар и не всички), които засягат черния дроб, се съпровождат от различен по сила оксидативен стрес. Небалансираното образуване на реактивни кислородни части в резултат на засилена прооксидантна активност, на потисната антиоксидантна защита или и на двете, може да засегне структурата и функцията на различни клетъчни компоненти. Към настоящия момент, обект на широка дискусия са засилените оксидативни процеси и тяхната взаимовръзка с някои по-чести чернодробни увреждания, водещи до развитие на чернодробна фиброза и цироза. При пациентите с хронично чернодробно заболяване точните механизми, които водят до прогресия на фиброзата все още не са добре изяснени. Допуска се, че при хроничен хепатит тя се подпомага от инсулиновата резистентност и свързаните с нея метаболитни нарушения и повишен риск от развитие на захарен диабет тип 2. В процес на изясняване е съучастието на нарушения липиден метаболизъм с последваща стеатоза на черния дроб и липидна пероксидация.

Във връзка със стремежа на изследователите към по-задълбочено изучаване на ролята и мястото на оксидативния стрес в патогенезата на хроничното чернодробно заболяване се използват разнообразни биомаркери, които могат да се определят в кръв, урина или други биологични течности. Тяхното количествено определяне дава полезна информация за оксидативното засягане на липидите (малондиалдехид и 4-хидроксиноненал), на ДНК (8-оксогуанин), на арахидоновата киселина (изопростани), на аминокиселините в белтъците и на други клетъчни структури. В тази връзка с настоящото научно изследване се стремим да оценим сравнително промените в серумните концентрации на малондиалдехид и супероксид дисмутаза и на плазмената глутатион

пероксидаза като маркери на оксидативния стрес при пациенти с хронични чернодробни заболявания и да анализираме връзката им с някои въглехидратни и липидни показатели. Получените данни биха били полезни както за по-детайлното изясняване на механизмите на оксидативното засягане при хроничното чернодробно заболяване, така и за подобряване и индивидуализиране на терапевтичния подход при засегнатите лица.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел: *Да се проучи ролята на някои биомаркери на оксидативния стрес и връзката им с инсулиновата резистентност при пациенти с хронични чернодробни заболявания.*

За осъществяване на тази цел бяха набелязани за изпълнение следните **задачи:**

1. Да се подберат подходящи показатели за оценка на активността на оксидативния стрес при пациенти с хронични чернодробни заболявания.
2. Да се изследват серумните концентрации на малондиалдехид, супероксид дисмутаза и плазмената глутатион пероксидаза при пациенти с хроничен хепатит и да се съпоставят с данните от същите показатели при контролна група.
3. Да се определи концентрацията на серумен малондиалдехид, супероксид дисмутаза и плазмена глутатион пероксидаза при пациенти с чернодробна цироза и да се съпоставят с данните за тези показатели при контролна група.
4. Да се направи сравнение между показателите на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит и с чернодробна цироза.
5. Да се проучи влиянието на пола върху метаболитните показатели и показателите на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит, с чернодробна цироза и при контролната група.
6. Да се анализира връзката между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели при пациентите с хроничен хепатит, с чернодробна цироза и при контролната група.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Клиничен материал

1.1. Обект на наблюдение са показателите на оксидативния стрес малондиалдехид, глутатион пероксидаза и супероксид дисмутаза и на инсулиновата резистентност при пациенти с хронични чернодробни заболявания.

1.2. Единици на наблюдение

1.2.1. Логически единици на наблюдение

- Пациенти с хронични чернодробни заболявания, хоспитализирани във Второ вътрешно отделение (Отделение по гастроентерология) на МБАЛ „Асеновград“, гр. Асеновград и в Клиника по гастроентерология на УМБАЛ „Каспела“, гр. Пловдив. В проучването са включени две групи пациенти с хронични чернодробни заболявания – едната група е съставена от лица с хроничен хепатит, а другата включва лица с чернодробна цироза.
- Клинично здрави лица в зряла възраст, които са приети като база за сравнение (контролна група).

1.2.2. Технически единици на наблюдение – Отделението по гастроентерология на МБАЛ „Асеновград“, гр. Асеновград и Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ „Каспела“, гр. Пловдив, в които са проведени клиничните изследвания на пациентите. Серумните концентрации на МДА, СОД, инсулин и плазмената концентрация на ГПО-1 са определени в Катедрата по клинична лаборатория, МУ-Пловдив и в ЦКЛ на УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, гр. Пловдив.

1.3. Органи на наблюдението – първичната информация за пациентите с хронични чернодробни заболявания и за лицата от контролната група е събрана за периода от 01.03.2017 г. до 01.02.2018 г. от докторанта.

1.4. Признаци на наблюдението

- Анамнестични – данни от анамнезата за рискови фактори за развитие на хронично чернодробно заболяване (употреба на алкохол, преболедуван остър вирусен хепатит и др.).
- Клинични – данни от клиничното изследване на пациентите, с които се оценява целия възможен спектър от дискретни или изяви

клинични белези на компенсирано или декомпенсирано хронично чернодробно заболяване.

- Клинично-лабораторни – резултати от клинично-лабораторното изследване на показателите МДА, СОД, ГПО-1, глюкоза, инсулин, общ холестерол, ХДЛ-холестерол, триглицериди и др. като проява на оксидативен стрес и инсулинова резистентност при пациенти с хронични чернодробни заболявания.

1.5. Дизайн на проучването – проведено е сравнително проучване върху някои показатели на оксидативния стрес при пациенти с доказано хронично чернодробно заболяване, асоциирано с инсулинова резистентност (хроничен хепатит и чернодробна цироза) и при клинично здрави лица, служещи като контролна група.

1.6. Клиничен материал, критерии за подбор на лицата от проучването – в дисертационната работа са включени общо 84 лица на възраст от 20 до 83 год. От тях 55 лица са с диагностицирани хронични чернодробни заболявания, разпределени в две групи: пациенти с хронични хепатити ($n = 26$) и пациенти с чернодробна цироза и портална хипертония ($n = 29$). Данни за етиологичната структура на двете групи с хронични чернодробни заболявания са представени на табл. 1. Пациентите са подбрани на случаен принцип.

За сравнение е използвана контролна група от 29 клинично здрави лица. Контролната група е съставена от лица с различни професии – служители от образователната система, лекари и други медицински специалисти, студенти. За преценка на здравословното им състояние е извършен медицински преглед и изследване на рутинни хематологични, клинично-химични и уринни показатели.

Таблица 1. Разпределение на лицата от клиничните групи според етиологията на заболяването

Етиологичен фактор	Пациенти с хроничен хепатит (n = 26)	Пациенти с чернодробна цироза с портална хипертония (n = 29)
Вирусен хепатит В	17	8
Вирусен хепатит С	8	3
Етилична генеза	1	13
Кардиачна генеза	0	1
Метаболитна генеза	0	2
Смесена генеза	0	2

Предварително се определиха следните критерии за подбор на пациентите от двете патологични групи и на здравите контроли:

Критерии за включване:

- Пациенти с хронични хепатити на възраст над 18 години с позитивна серология за HBsAg и/или Anti HCV.
- Пациенти с диагностицирана чернодробна цироза с портална хипертония с различна етиология на базата на проведени биологични, ултрасонографски, клинично-лабораторни и хистологични изследвания.
- Клинично здрави лица на възраст над 18 год. без данни за алкохолна, лекарствена или наркотична зависимост, без остри или хронични хепатобилиарни или панкреатични болести, без доказан до момента захарен диабет и инсулинова резистентност, без тежки сърдечно-съдови, белодробни или гастроинтестинални заболявания, без СПИН.
- Доброволно предварително подписан формуляр за информирано съгласие за участие в проучването.

Критерии за изключване:

- Прием на антиоксидантни лекарствени средства поне две седмици преди изследването.
- Злоупотреба с алкохол поне две седмици преди изследването.
- Ендокринни заболявания – захарен диабет тип 1 или захарен диабет тип 2 на медикаментозно лечение, установени преди чернодробното заболяване, хипо/хипертиреозидизъм, синдром на Кушинг, ПКОС и др.

- Други тежки хронични заболявания – бъбречни, белодробни, сърдечно-съдови, неврологични, СПИН.
- Съпътстващо остро инфекциозно заболяване.
- Хепатоцелуларен карцином.
- Бременност.

За провеждане на клиничното проучване е получено положително становище от Комисията по научна етика към Съвета по научно-изследователска дейност при Медицински университет – Пловдив с протокол № 2/30.03.2017 год. за съответствие на настоящото научно проучване със стандартите и критериите за научност и етичност. Доброволното участие на лицата от проучванията е удостоверено чрез предварително подписано информирано съгласие.

2. Използвани методи

2.1. Клинични методи

Клиничното изследване включва:

- Анамнестични данни за рискови фактори за развитие на хронично чернодробно заболяване – алкохолна употреба, преболедуван остър вирусен хепатит, други хепатотропни вирусни инфекции, рискови манипулации в миналото, хронични жлъчни заболявания, придружаваща патология от различен характер (съдова, метаболитна), системен прием на хепатотоксични медикаменти.
- Диагностични критерии – основават се на комплексната оценка на анамнестичните данни, данните от физикалното изследване и на резултатите от проведените клинично-лабораторните панели – ПКК, БХ, йонограма, урина, вирусологични, имунологични. За оценка на инсулиновата резистентност е изчислен НОМА-IR = глюкоза на гладно (mmol/l) X инсулин на гладно (μ IU/ml) / 22.5.
- Инструментални методи – рутинно е използвана ултразвукова и КТ диагностика, а при необходимост е извършвана чернодробна биопсия с хистологично изследване.

2.2. Клинично-лабораторни методи

- *Имуноензимен метод за количествено определяне на глутатион пероксидаза* – използван е тест-набор Human glutathione peroxidase 1 на фирмата BioVendor – Laboratorni medicina a.s., Czech Republic с кат. № RAG012R.

- *Имуноензимен метод за количествено определяне на супероксид дисмутаза* – използван е тест-набор Human Cu/ZnOD Platinum ELISA на фирмата Affymetrix eBioscience, Austria с кат. № BMS222CE.
- *Имуноензимен метод за количествено определяне на малондиалдехид* – използван е тест-набор на фирмата MyBioSource, USA с кат. № MBS263626.
- *Имуноензимен метод за количествено определяне на инсулин* – използван е тест-набор на фирмата Nova Tec immundiagnostica GmbH, Germany, с кат. № DNOV111.

Принципът за определяне на ГПО, СОД, МДА и инсулин е сандвичев имуноензимен анализ на базата на ELISA техника. Концентрациите на тези показатели са отчетени на анализатор Sirio S microplate reader, SEAC, Italy.

- *Други клинично-лабораторни изследвания, използвани за целта на дисертационния труд:* хематологичните показатели са определени с Medonic (Stockholm, Sweden); клинично-химичните показатели глюкоза, общ белтък, албумин, общ и директен билирубин, общ холестерол, ХДЛ-холестерол, триглицериди, АСАТ, АЛАТ, АФ, ГГТ, електролити, урея, креатинин са определени на анализатор Mindray BS 200e (China) по оригинални програми на производителя на реактиви; показателите за оценка на коагулацията (фибриноген, протромбиново време) са изследвани на коагулометър CoaDATA 4004 (Germany).

2.3. Вирусологични изследвания – извършено е определяне на HBsAg и AntiHCV.

2.4. Статистически методи

Статистическата обработка на резултатите е извършена с помощта на програмния продукт SPSS v. 19.0. За ниво на значимост на нулевата хипотеза е прието $P < 0.05$. Използвани са следните *параметрични методи*: вариационен и алтернативен анализ, t-критерий за тестване на хипотези за наличие на статистически значимо различие между изследваните показатели в отделните групи, еднофакторен дисперсионен анализ (One-way ANOVA) при съпоставка на повече от две неизвестни нормално разпределени количествени променливи, приложена е корекция на Bonferroni при съпоставка по двойки, корелационен анализ (Pearson correlation coefficient, r) за оценка на големината и силата на връзката между

нормално разпределени количествени величини. Използвани са и *непараметрични методи*: тест на Kolmogorov-Smirnov за проверка на вида на разпределението на количествени показатели и критерий за съгласие на Pearson – χ^2 , тест на Mann-Whitney за съпоставка на количествени величини при две независими извадки с разпределение, различно от нормалното, тест на Kruskal-Wallis за съпоставка на повече от две независими извадки с разпределение, различно от нормалното, непараметричен корелационен анализ на Spearman (ρ).

За нагледно представяне на резултатите са използвани *графични методи*.

РЕЗУЛТАТИ

Концентрации на серумен МДА, СОД и плазмена ГПО при пациенти с хроничен хепатит и съпоставка с данните от същите показатели при лица от контролна група

В проучването са включени 26 пациенти с хроничен хепатит и 29 клинично здрави лица (контроли). В двете групи относителният дял на жените е по-голям: при пациентите с хроничен хепатит жените са 57.7% (n = 15), а при контролите са 72.4% (n = 21). Средната възраст (mean \pm SEM) на пациентите с хроничен хепатит е 49.46 ± 3.07 год., а на контролите – 35.62 ± 2.42 год. (разликата е статистически значима, $t = 3.57$, $P = 0.001$). Данни за метаболитните показатели на лицата от двете групи са представени на табл. 2.

Таблица 2. Средни стойности на метаболитните показатели при пациентите с хроничен хепатит и при контролите

Показател \ Група	Хроничен хепатит (mean \pm SEM)	Контроли (mean \pm SEM)
Общ хол. (mmol/l)	4.84 ± 0.30	4.79 ± 0.14
ХДЛ-хол. (mmol/l)	1.24 ± 0.05	1.54 ± 0.06
ЛДЛ-хол. (mmol/l)	2.93 ± 0.22	2.83 ± 0.13
ТГ (mmol/l)	1.44 ± 0.21	0.92 ± 0.10
Глюкоза (mmol/l)	5.17 ± 0.19	4.90 ± 0.13
Инсулин (μ IU/ml)	16.50 ± 3.81	3.99 ± 0.60
НОМА-IR	4.32 ± 1.15	0.90 ± 0.14

В сравнение с контролите, пациентите с хроничен хепатит имат статистически значимо по-нисък серумен ХДЛ-холестерол ($P < 0.0001$) и по-високи ТГ ($P = 0.029$), инсулин ($P = 0.001$) и НОМА-IR ($P = 0.001$). Двете групи не се различават по средната концентрация на глюкозата, общия холестерол и ЛДЛ-холестерола ($P > 0.05$).

1. Серумният МДА като показател на липидната пероксидация при пациентите с хроничен хепатит

Средните стойности на МДА на пациентите с хроничен хепатит и на контролите са представени на табл. 3. Статистически анализ на данните е извършен с теста на Mann-Whitney. Установихме, че пациентите с хроничен хепатит имат сигнификантно по-висока средна концентрация на серумния МДА в сравнение с тази на лицата от контролната група. Средната разлика

на МДА между двете групи (mean difference \pm SE difference) е 92.03 ± 13.02 nmol/ml.

Таблица 3. Съпоставка на серумния МДА при пациентите с хроничен хепатит и при контролната група

Група	Брой (n)	Mean (nmol/ml)	SD (nmol/ml)	SEM (nmol/ml)	Mann-Whitney U	P
Хроничен хепатит	26	157.88	52.57	10.31	7.00	< 0.0001
Контролна група	29	65.85	17.31	3.22		

2. Концентрация на плазмената ГПО и на серумната СОД при пациентите с хроничен хепатит

На табл. 4 и табл. 5 са представени данни от сравнителния анализ на плазмената ГПО и на серумната СОД при пациентите с хроничен хепатит и при контролната група. За съпоставка на групите е използван теста на Mann-Whitney.

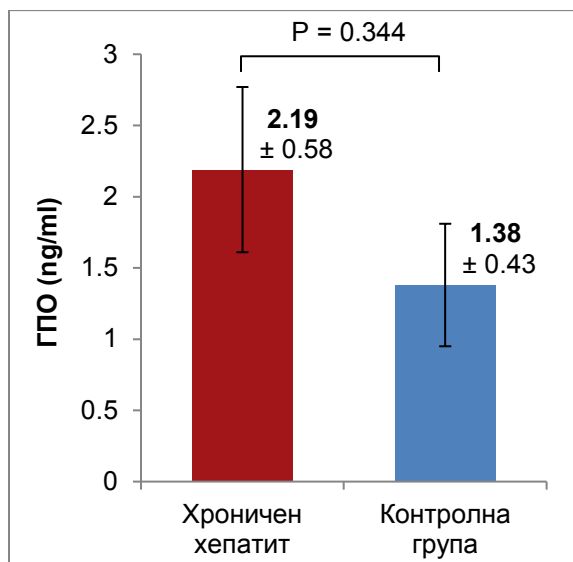
Таблица 4. ГПО при пациентите с хроничен хепатит и при контролната група

Група	Брой (n)	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	SEM (ng/ml)	Mann-Whitney U	P
Хроничен хепатит	26	2.19	2.98	0.58	321.00	0.344
Контролна група	29	1.38	2.30	0.43		

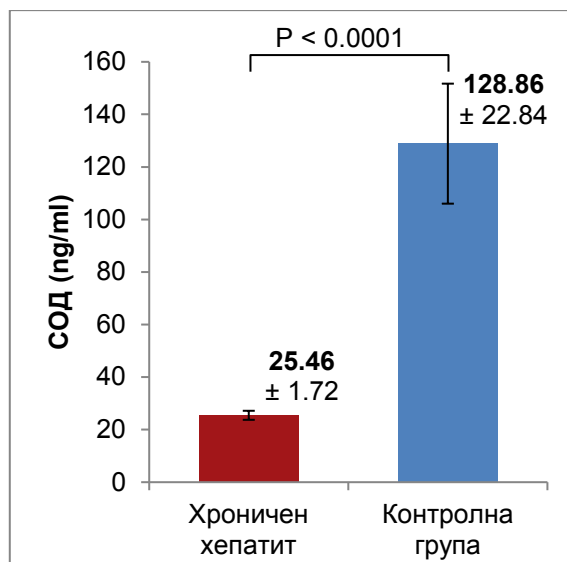
Таблица 5. СОД при пациентите с хроничен хепатит и при контролната група

Група	Брой (n)	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	SEM (ng/ml)	Mann-Whitney U	P
Хроничен хепатит	26	25.46	8.78	1.72	53.00	< 0.0001
Контролна група	29	128.86	123.00	22.84		

Установихме, че пациентите с хроничен хепатит не се различават статистически значимо от контролите по средната концентрация на ГПО (фиг. 1). Получената средна разлика на ГПО при лицата от двете групи е 0.81 ± 0.72 ng/ml. Двете групи се различават статистически значимо по концентрацията на СОД. Пациентите с хроничен хепатит имат статистически значимо по-ниска средна концентрация на СОД в сравнение с тази на лицата на контролната група (фиг. 2). Средната разлика на СОД между двете групи (mean difference \pm SE difference) е 103.40 ± 22.91 ng/ml.



Фигура 1. Средни стойности на ГПО (mean ± SEM) при пациентите с хроничен хепатит и при контролите



Фигура 2. Средни стойности на СОД (mean ± SEM) при пациентите с хроничен хепатит и при контролите

Концентрации на серумен МДА, СОД и плазмена ГПО при пациенти с чернодробна цироза и съпоставка с данните от същите показатели при лица от контролна група

В проучването са включени 29 пациенти с чернодробна цироза и 29 контроли. Двете групи се различават по относителния дял на жените и мъжете: при пациентите с цироза мъжете са 79.3% (n = 23), а при контролите мъжете са 27.6% (n = 8). Средната възраст на пациентите с чернодробна цироза е статистически значимо по-висока от тази на контролите (64.45 ± 1.98 год. спрямо 35.62 ± 2.42 год., $t = 9.22$, $P < 0.0001$). Данни за метаболитните показатели на лицата от двете групи са представени на табл. 6.

Таблица 6. Средни стойности на метаболитните показатели при пациентите с чернодробна цироза и при контролите

Показател	Група	Чернодробна цироза (mean ± SEM)	Контроли (mean ± SEM)
Общ хол. (mmol/l)		3.32 ± 0.16	4.79 ± 0.14
ХДЛ-хол. (mmol/l)		0.82 ± 0.06	1.54 ± 0.06
ЛДЛ-хол. (mmol/l)		2.00 ± 0.11	2.83 ± 0.13
ТГ (mmol/l)		1.09 ± 0.06	0.92 ± 0.10
Глюкоза (mmol/l)		6.11 ± 0.40	4.90 ± 0.13
Инсулин (μIU/ml)		30.55 ± 4.89	3.99 ± 0.60
НОМА-IR		8.54 ± 1.69	0.90 ± 0.14

В сравнение с контролите, пациентите с чернодробна цироза имат статистически значимо по-нисък серумен общ холестерол ($P < 0.0001$), ХДЛ-холестерол ($P < 0.0001$) и ЛДЛ-холестерол ($P < 0.0001$) и по-високи ТГ ($P < 0.009$), глюкоза ($P < 0.004$), инсулин ($P < 0.0001$) и НОМА-IR ($P < 0.0001$).

1. Серумният МДА като показател на липидната пероксидация при пациентите с чернодробна цироза

На табл. 7 са представени средните стойности на МДА на пациентите с чернодробна цироза и на контролите. При съпоставката на резултатите се установи, че двете групи се различават статистически значимо по средната концентрация на серумния МДА. Пациентите с чернодробна цироза имат сигнификантно по-висока средна концентрация на МДА в сравнение с тази на лицата от контролната група ($P < 0.0001$). Средната разлика на МДА между двете групи (mean difference \pm SEM) е 127.89 ± 12.66 nmol/ml.

Таблица 7. Серумен МДА при пациентите с чернодробна цироза и при лицата от контролната група

Група	Брой (n)	Mean (nmol/ml)	SD (nmol/ml)	SEM (nmol/ml)	Mann-Whitney U	P
Чернодробна цироза	29	193.74	62.93	11.69	435.00	< 0.0001
Контролна група	29	65.85	17.31	3.22		

2. Концентрация на плазмената ГПО и на серумната СОД при пациентите с чернодробна цироза

На табл. 8 и табл. 9 са представени данни от сравнителния анализ на плазмената ГПО и на серумната СОД при пациентите с чернодробна цироза и при контролната група.

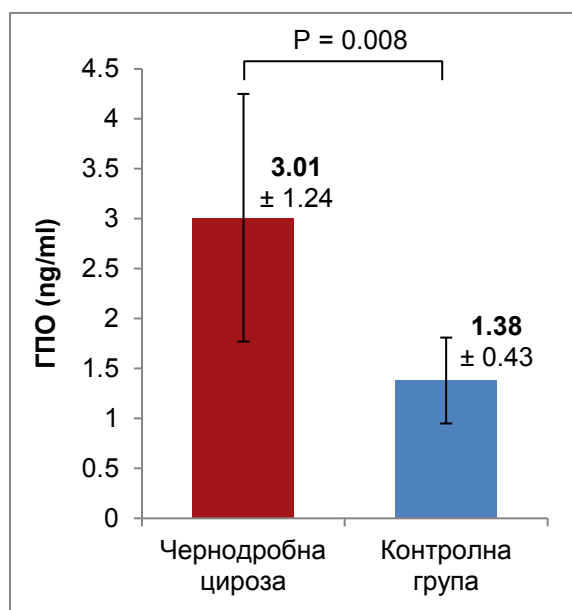
Таблица 8. ГПО при пациентите с чернодробна цироза и при контролната група

Група	Брой (n)	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	SEM (ng/ml)	Mann-Whitney U	P
Чернодробна цироза	29	3.01	6.67	1.24	250.50	0.008
Контролна група	29	1.38	2.30	0.43		

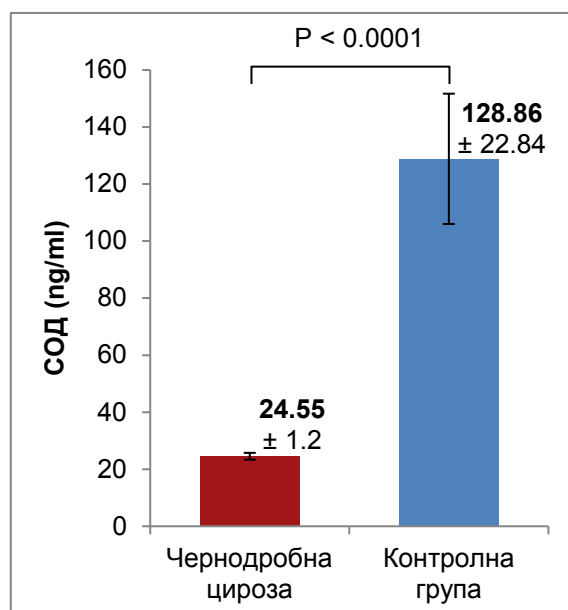
Таблица 9. СОД при пациентите с чернодробна цироза и при лицата от контролната група

Група	Брой (n)	Mean (ng/ml)	SD (ng/ml)	SEM (ng/ml)	Mann-Whitney U	P
Чернодробна цироза	29	24.55	6.46	1.20	62.00	< 0.0001
Контролна група	29	128.86	123.00	22.84		

Установихме, че пациентите с чернодробна цироза се различават статистически значимо от контролната група по плазмената ГПО и по серумната СОД. При пациентите с чернодробна цироза средната концентрация на ГПО е статистически значимо по-висока от тази на лицата от контролната група (фиг. 3). Средната разлика на ГПО (mean difference \pm SE difference) между двете групи е 1.63 ± 1.31 ng/ml. Пациентите с чернодробна цироза имат сигнификантно по-ниска средна стойност на СОД в сравнение с тази на лицата на контролната група (фиг. 4). Средната разлика на СОД (mean difference \pm SE difference) между двете групи е 104.31 ± 22.87 ng/ml.



Фигура 3. Средни стойности на ГПО (mean \pm SEM) при пациентите с чернодробна цироза и при контролите



Фигура 4. Средни стойности на СОД (mean \pm SEM) при пациентите с чернодробна цироза и при контролите

Сравнително проучване на показателите на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит и с чернодробна цироза

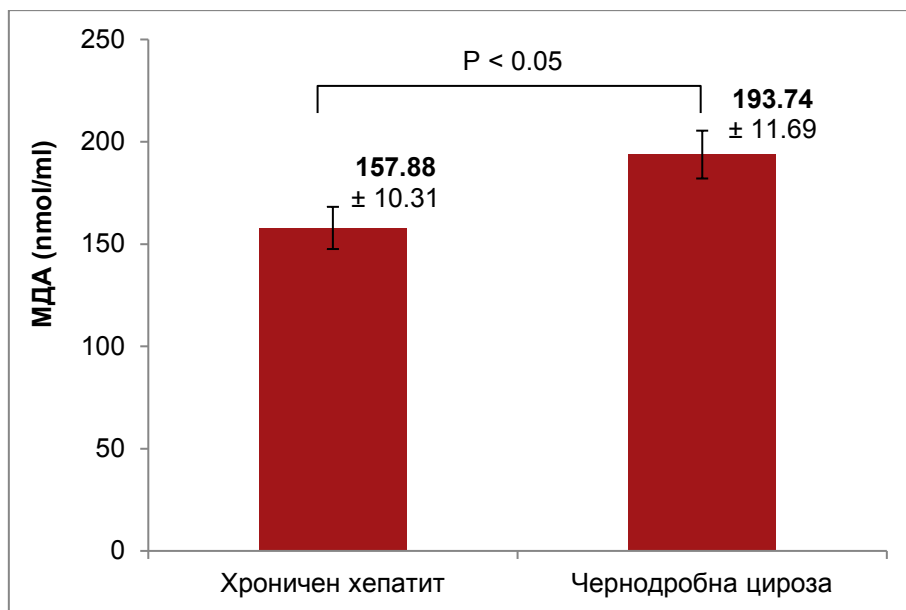
В проучването са включени общо 55 лица, от които 26 пациенти с хроничен хепатит и 29 пациенти с чернодробна цироза. Двете групи се различават по относителния дял на жените и мъжете: при пациентите с хроничен хепатит мъжете са 42.3%, а при пациентите с чернодробна цироза мъжете са 79.3%. Средната възраст (mean \pm SEM) на пациентите с хроничен хепатит е 49.46 ± 3.07 г., а на пациентите с чернодробна цироза е 64.45 ± 1.98 г. (разликата е статистически значима, $t = 4.19$, $P < 0.0001$).

Средните стойности на МДА (nmol/ml), на ГПО (ng/ml) и на СОД (ng/ml) при пациентите с хроничен хепатит и с чернодробна цироза са представени на табл. 10. Сравненията по двойки са извършени с теста на Mann-Whitney.

Таблица 10. МДА, ГПО и СОД при пациенти с хроничен хепатит и с чернодробна цироза

Група	Брой (n)	Mean \pm SEM	Mann-Whitney U	P
МДА хроничен хепатит	26	157.88 ± 10.31	251.00	0.034
МДА чернодробна цироза	29	193.74 ± 11.69		
ГПО хроничен хепатит	26	2.19 ± 0.58	323.00	0.361
ГПО чернодробна цироза	29	3.01 ± 1.24		
СОД хроничен хепатит	26	25.46 ± 1.72	367.00	0.866
СОД чернодробна цироза	29	24.55 ± 1.20		

Установи се статистически значима разлика единствено при съпоставката на МДА при двете проучвани групи. Пациентите с чернодробна цироза имат статистически значимо по-висока средна концентрация на МДА в сравнение с тази на пациентите с хроничен хепатит (фиг. 5). Средната разлика в концентрацията на МДА между тези две групи пациенти (mean difference \pm SE difference) е 35.85 ± 15.74 nmol/ml.



Фигура 5. Средни стойности на МДА при пациенти с хроничен хепатит и с чернодробна цирроза. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната.

Проучване на влиянието на пола върху серумните концентрации на метаболитните показатели и показателите на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит, с чернодробна цирроза и при лицата от контролната група

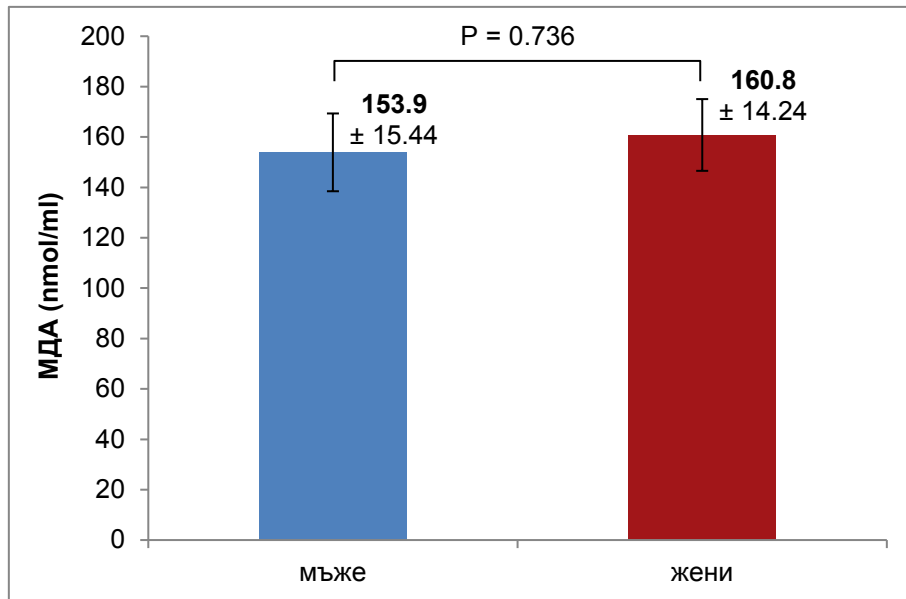
При изследваната група лица като цяло ($n = 84/100\%$) разпределението по пол е еднакво: 50% са мъжете ($n = 42$) и 50% са жените ($n = 42$). В отделните групи обаче, разпределението на лицата от проучването по пол не е еднакво ($\chi^2 = 16.408$, $P = 0.0001$). Данни за вътрегруповото разпределение на лицата от трите групи, включени в проучването по пол, е представено на табл. 11.

Таблица 11. Разпределение на лицата от трите групи по пол

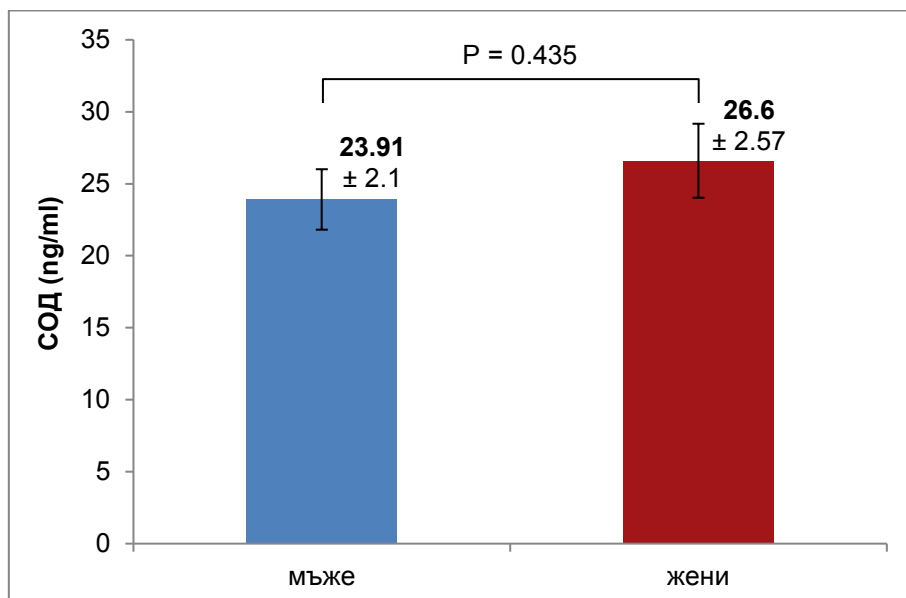
Група	Пол	Брой	% в групата	Общ брой /%
Хроничен хепатит	мъже	11	42.3	26/100
	жени	15	57.7	
Чернодробна цирроза	мъже	23	79.3	29/100
	жени	6	20.7	
Контролна група	мъже	8	27.6	29/100
	жени	21	72.4	

В групата с *хроничен хепатит* мъжете и жените не се различават статистически значимо по възраст (45.18 ± 4.74 г. спрямо 52.60 ± 3.95 г., $t =$

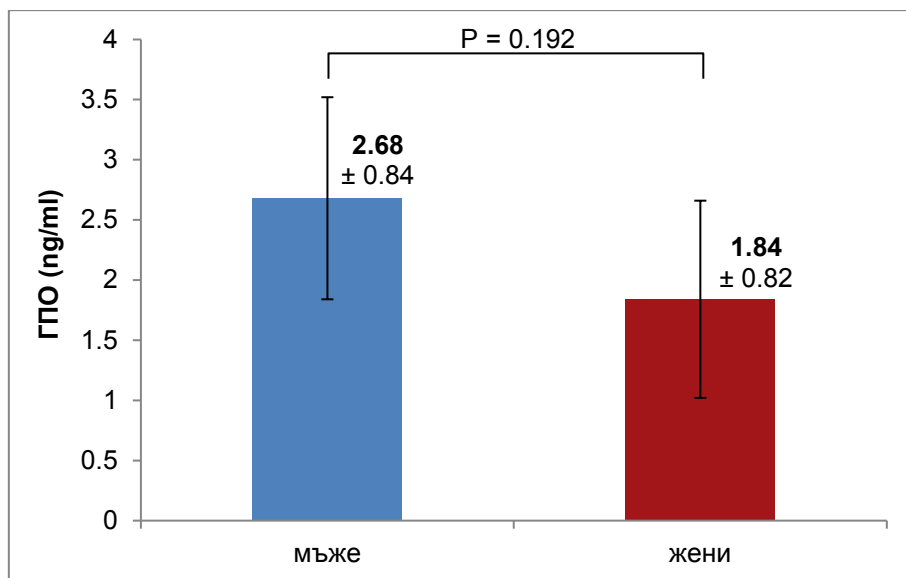
1.20, $P = 0.243$). Чрез t-теста на Student-Fisher (за общ холестерол, ХДЛ-холестерол, ЛДЛ-холестерол) и теста на Mann-Whitney (за ТГ, глюкоза, инсулин, НОМА-IR, МДА, СОД, ГПО) не установихме статистически значима полово-обусловена разлика както по отношение на метаболитните показатели, така и на МДА, СОД и ГПО ($P > 0.05$). Данни за концентрацията на МДА, СОД и ГПО при мъже и при жени с хроничен хепатит са представени на фиг. 6, фиг. 7 и фиг. 8.



Фигура 6. Средни стойности на МДА (mean ± SEM) при мъже (n = 11) и при жени (n = 15) с хроничен хепатит

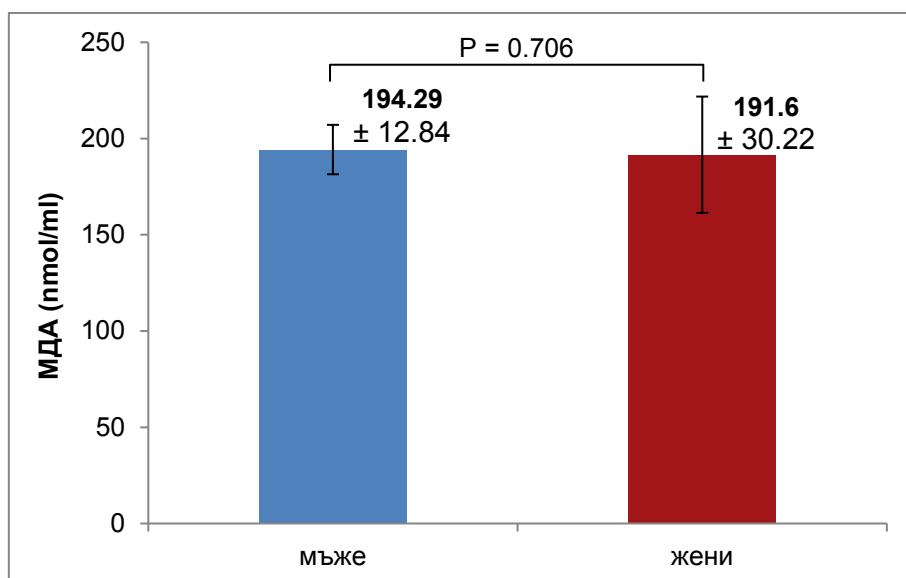


Фигура 7. Средни стойности на СОД (mean ± SEM) при мъже (n = 11) и при жени (n = 15) с хроничен хепатит

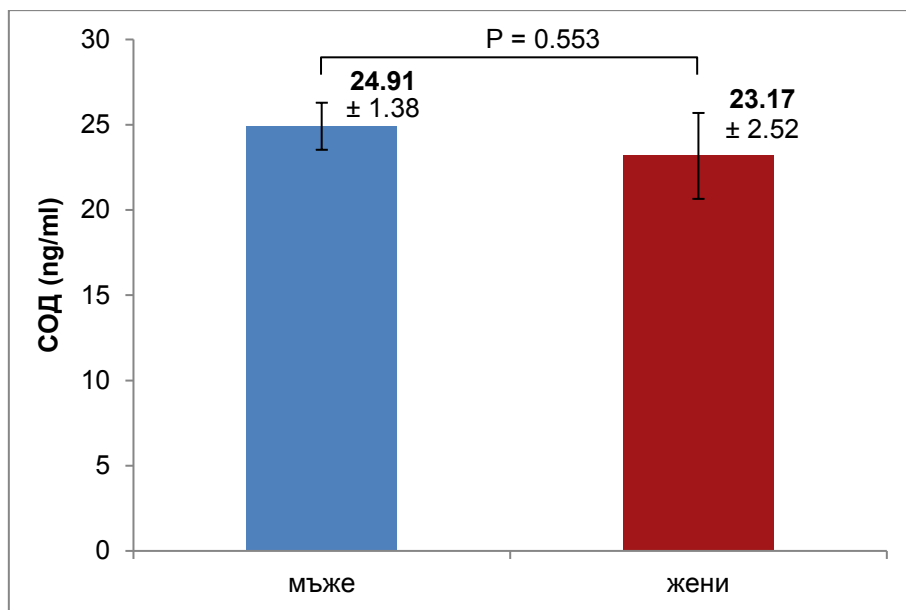


Фигура 8. Средни стойности на ГПО (mean ± SEM) при мъже (n = 11) и при жени (n = 15) с хроничен хепатит

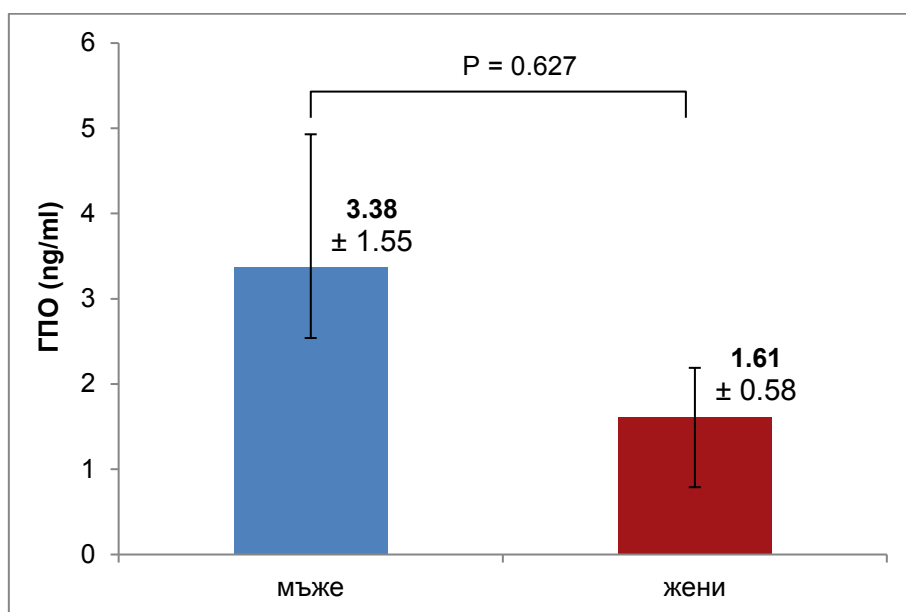
При пациентите с *чернодробна цироза* средната възраст на мъжете е 61.96 ± 2.19 г., а на жените – 74.00 ± 1.44 г. ($t = 4.61$, $P = 0.0001$). В тази група проучваните метаболитни показатели и показателите на оксидативния стрес не се различават при мъжете и при жените, защото достигнатата статистическа значимост на t-критерия на Student при независими извадки и на U-критерия на Mann-Whitney е по-голяма от 0.05. Данни за концентрацията на МДА, СОД и ГПО при мъже и при жени с чернодробна цироза са представени на фиг. 9, фиг. 10 и фиг. 11.



Фигура 9. Средни стойности на МДА (mean ± SEM) при мъже (n = 23) и при жени (n = 6) с чернодробна цироза



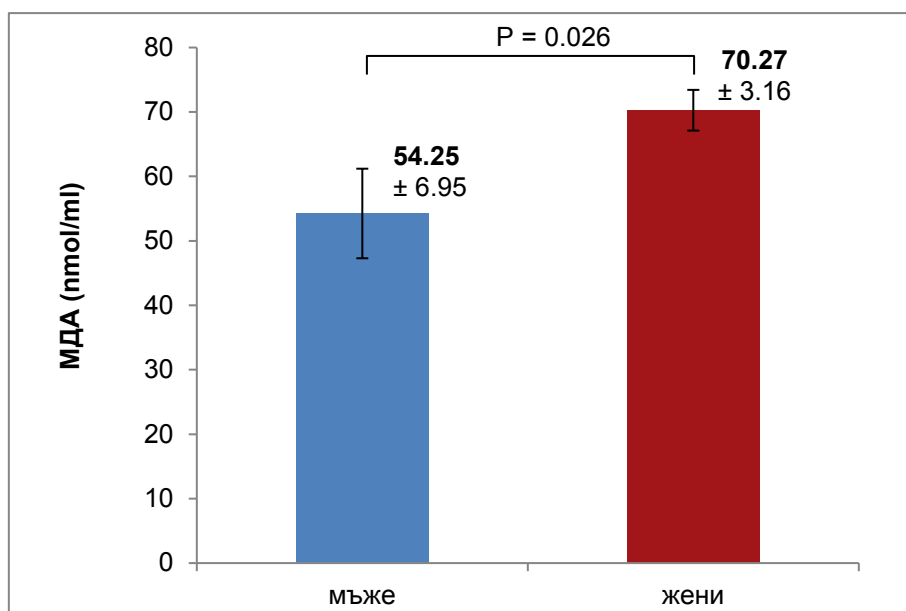
Фигура 10. Средни стойности на СОД (mean ± SEM) при мъже (n = 23) и при жени (n = 6) с чернодробна цирроза



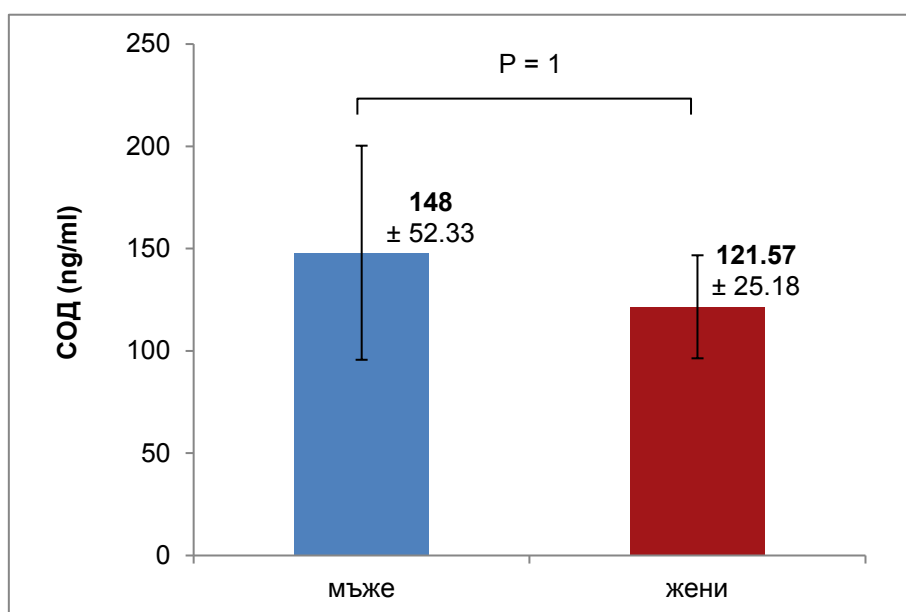
Фигура 11. Средни стойности на ГПО (mean ± SEM) при мъже (n = 23) и при жени (n = 6) с чернодробна цирроза

Мъжете и жените от *контролната група* не се различават статистически значимо по възраст: 33.13 ± 5.15 г. спрямо 36.57 ± 2.77 г. ($t = 0.59$, $P = 0.567$). Получените средни разлики на общия холестерол, ХДЛ-холестерола и на ЛДЛ-холестерола при лицата от тази група не се различават статистически значимо между двата пола, $P > 0.05$. От показателите, анализирани с теста на Mann-Whitney, само средната стойност

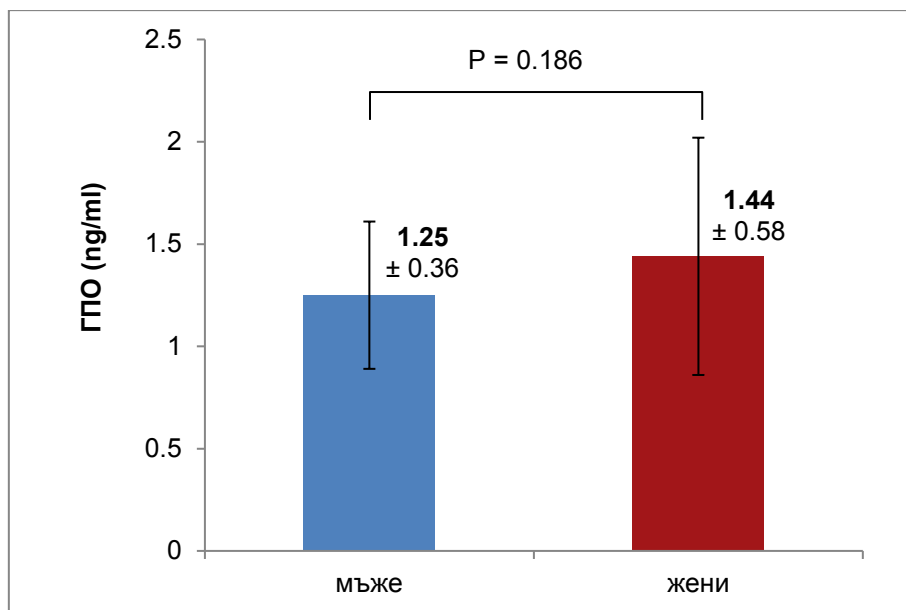
на МДА при жените е по-висока от тази на мъжете (70.27 ± 3.16 nmol/ml спрямо 54.25 ± 6.95 nmol/ml), разликата е статистически значима, $P = 0.026$. Данни от проведеня статистически анализ за изследване влиянието на пола върху МДА, СОД и ГПО при лицата от контролната група са представени на фиг. 12, фиг. 13 и фиг. 14.



Фигура 12. Средни стойности на МДА (mean ± SEM) при мъже ($n = 8$) и при жени ($n = 21$) от контролната група



Фигура 13. Средни стойности на СОД (mean ± SEM) при мъже ($n = 8$) и при жени ($n = 21$) от контролната група

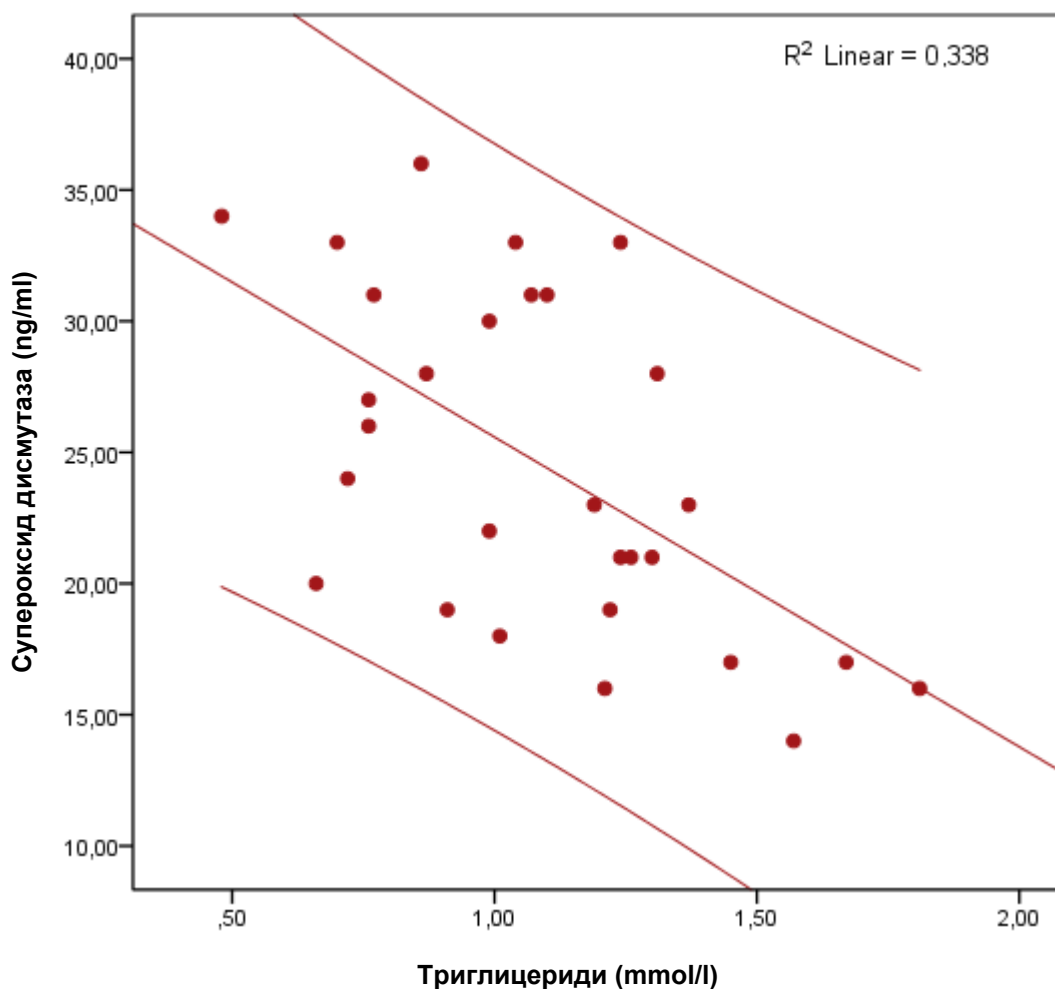


Фигура 14. Средни стойности на ГПО (mean ± SEM) при мъже (n = 8) и при жени (n = 21) от контролната група

Проучване на взаимовръзките между показателите на оксидативния стрес, както и между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели при пациентите с хроничен хепатит, с чернодробна цироза и при лицата от контролната група

С корелационен анализ се установи, че при пациентите с *хроничен хепатит* не се наблюдават статистически значими зависимости както между МДА, ГПО и СОД ($P > 0.05$), така и между показателите на оксидативния стрес от една страна и метаболитните показатели от друга ($P > 0.05$).

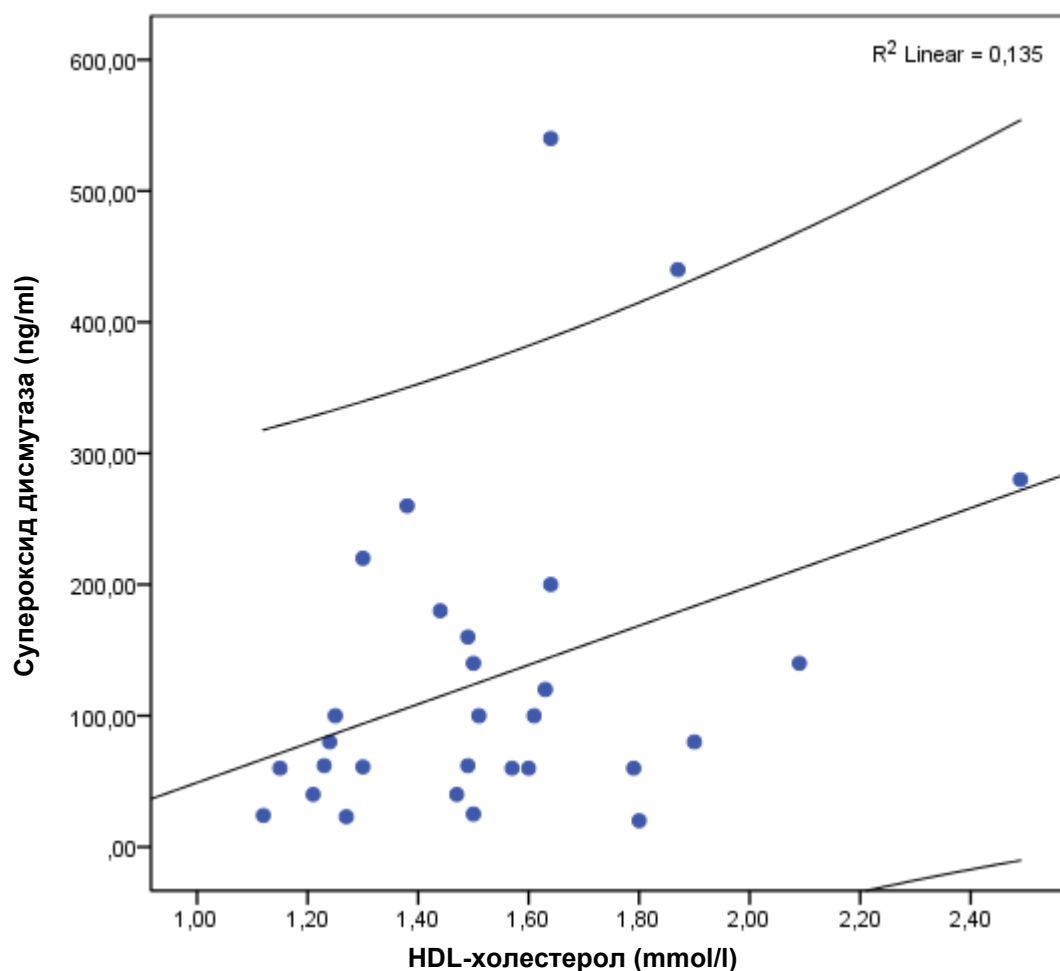
При пациентите с *чернодробна цироза* се установи статистически значима корелация между СОД и триглицеридите (значителна отрицателна зависимост, $\rho = -0.540$, $P = 0.002$) (фиг. 15). В тази група не се установиха други статистически значими корелации между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели с разпределение, различно от нормалното ($P > 0.05$), както и с тези с нормално разпределение на данните ($P > 0.05$).



Фигура 15. Отрицателна корелация на триглицеридите със СОД при пациентите с чернодробна цироза

При лицата от *контролната група* се установи, че от метаболитните показатели с нормално разпределение само ХДЛ-холестеролът корелира умерено положително със СОД (фиг. 16).

Данни от корелационния анализ между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели с негаусово разпределение при лицата от контролната група са представени на табл. 12.



Фигура 16. Положителна корелация на ХДЛ-холестерола със СОД при лицата от контролната група ($r = 0.367$, $P = 0.050$)

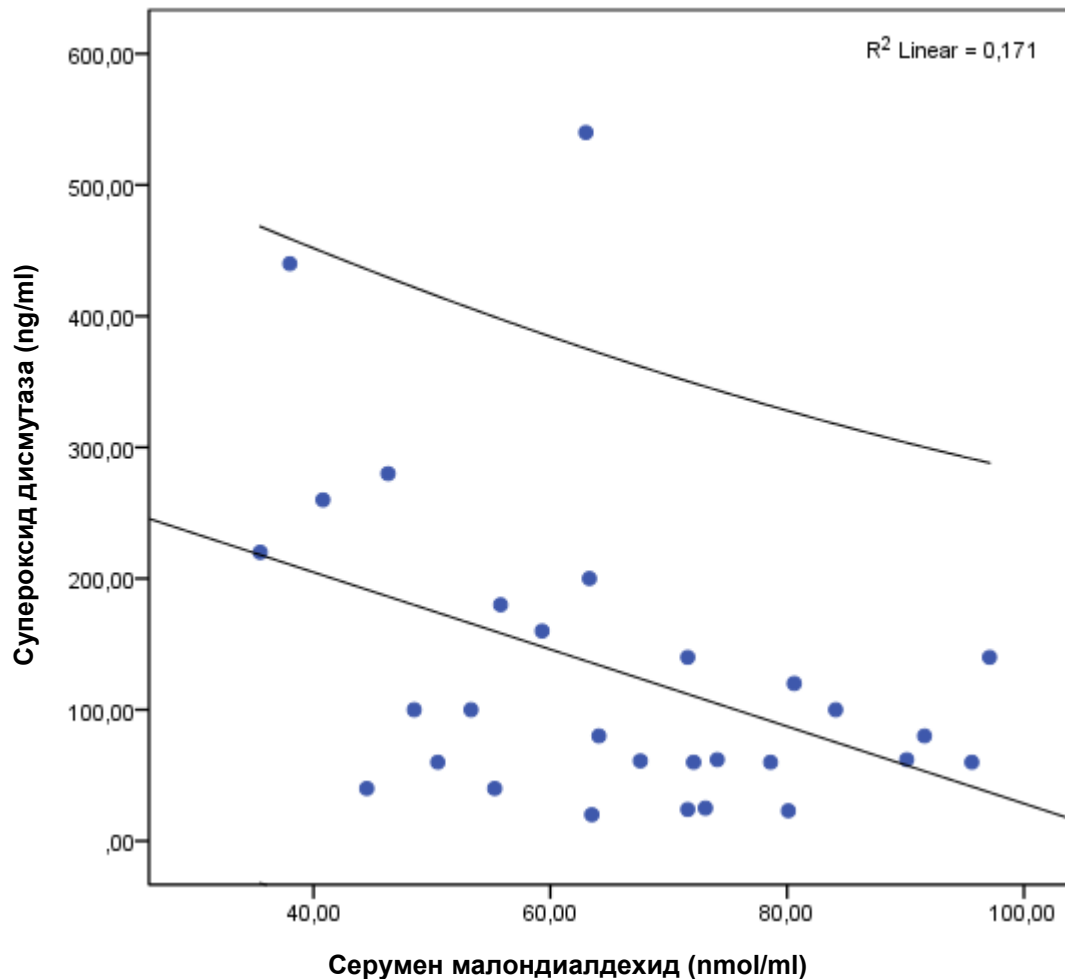
Таблица 12. Корелации между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели с разпределение, различно от нормалното при лицата от контролната група

Показател		МДА	СОД	ГПО	ТГ	Глюкоза	Инсулин	НОМА-IR
МДА	rho		-0.367*	-0.478**	0.116	0.158	0.161	0.165
	P		0.050	0.007	0.549	0.412	0.404	0.392
СОД	rho	-0.367*		0.443*	-0.315	-0.410*	-0.297	-0.355
	P	0.050		0.016	0.096	0.027	0.117	0.059
ГПО	rho	-0.478**	0.443*		0.035	-0.067	-0.016	0.003
	P	0.007	0.016		0.858	0.730	0.934	0.987

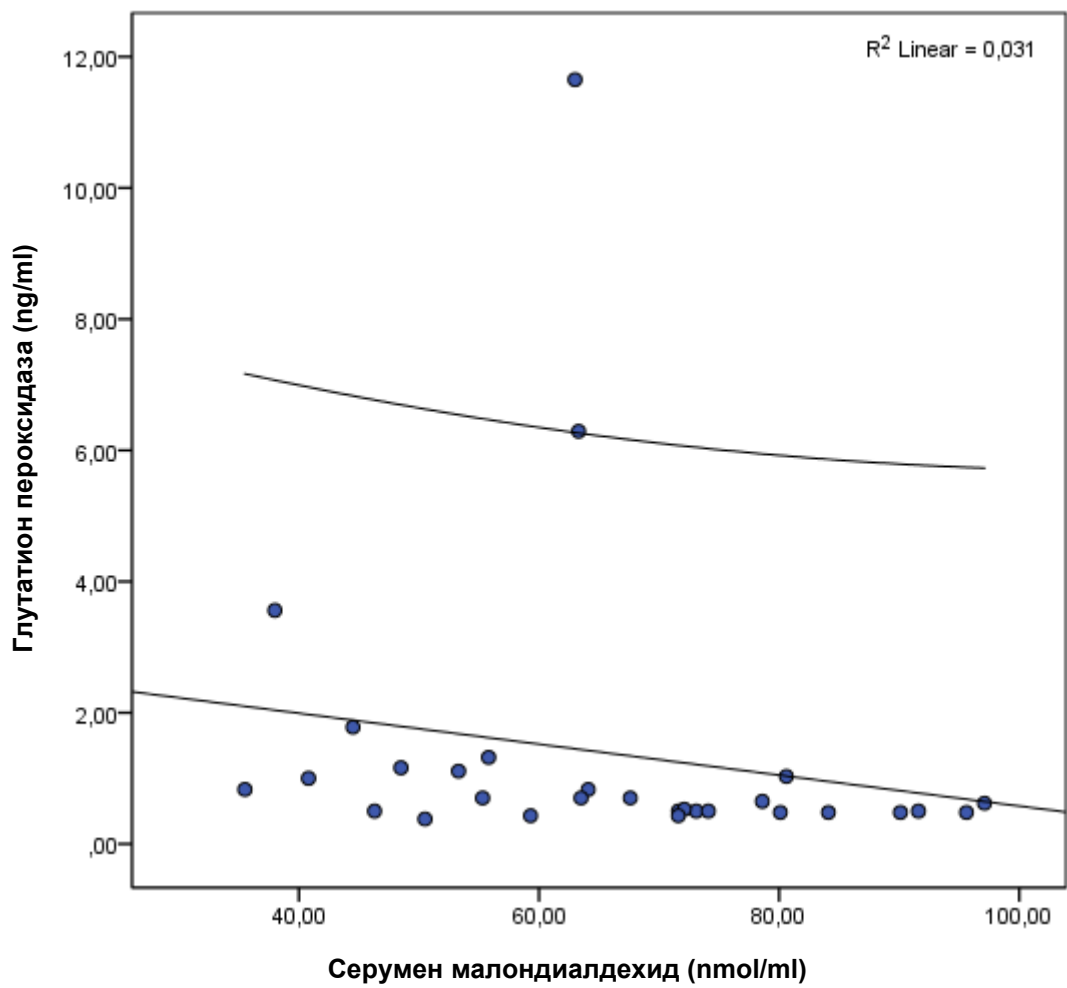
*Корелацията е сигнификантна при ниво на значимост $P < 0.05$ (двустранен тест)

**Корелацията е сигнификантна при ниво на значимост $P < 0.01$ (двустранен тест)

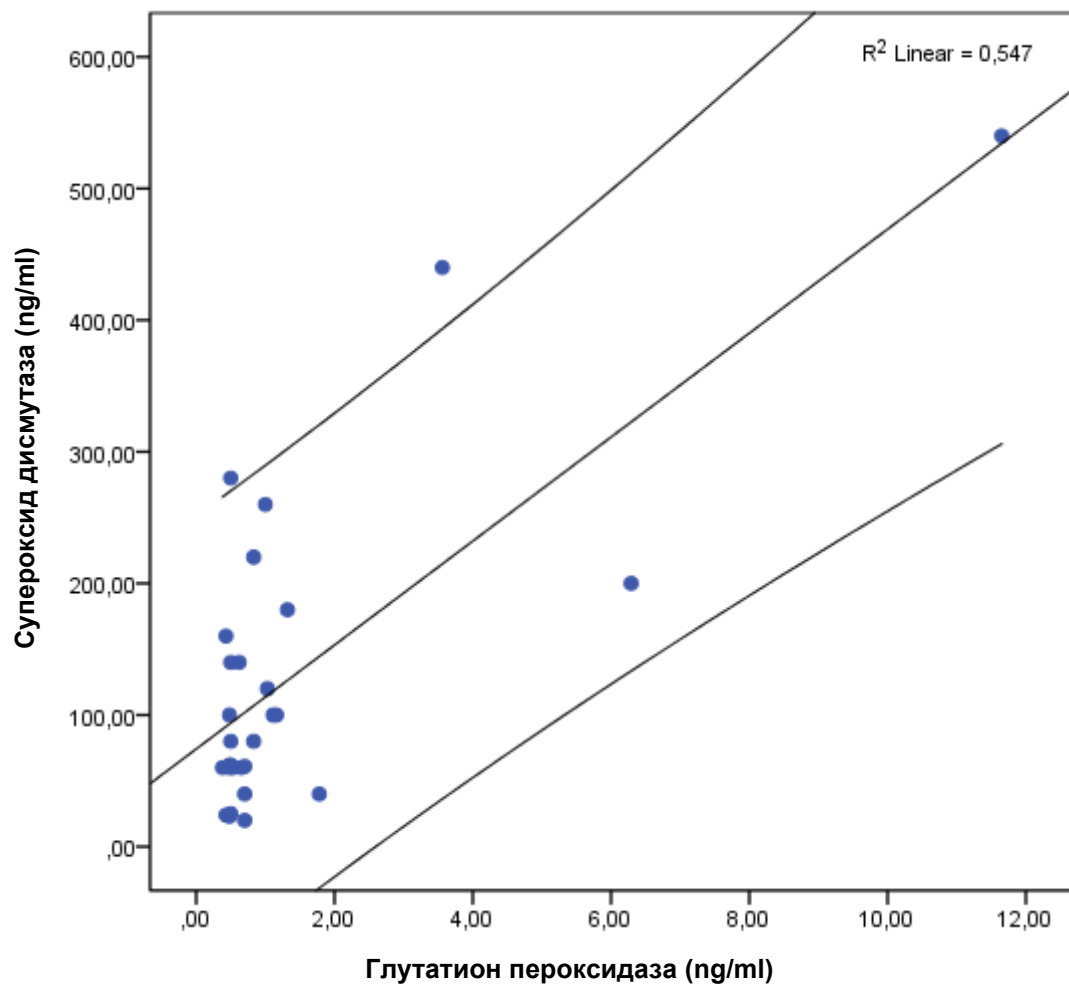
Установи се умерена отрицателна зависимост между МДА и СОД (фиг. 17) и между МДА и ГПО (фиг. 18). СОД корелира умерено положително с ГПО (фиг. 19) и умерено отрицателно с глюкозата (фиг. 20). Не се установиха статистически значими корелации на МДА, СОД и ГПО с триглицеридите, инсулина и НОМА-IR.



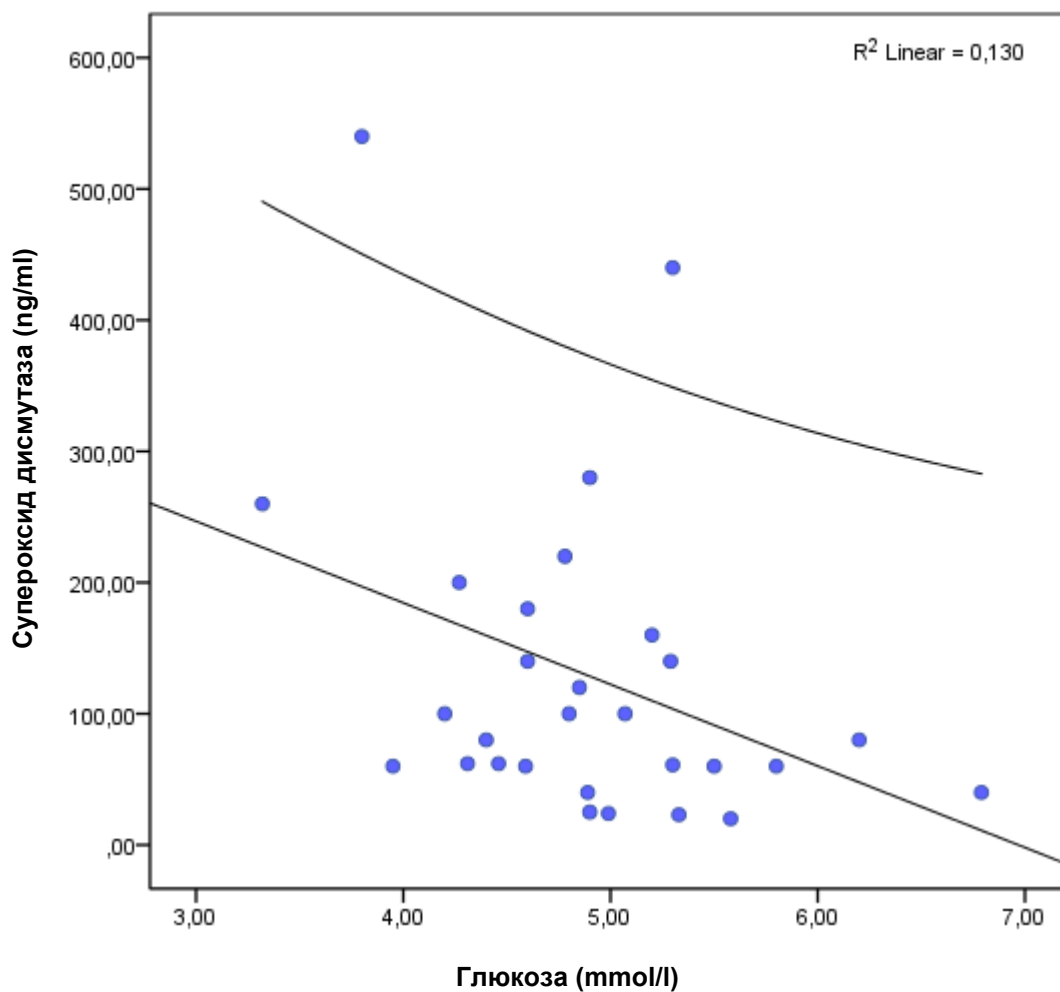
Фигура 17. Отрицателна корелация на МДА със СОД при лицата от контролната група ($\rho = -0.367$, $P = 0.050$)



Фигура 18. Отрицателна корелация на МДА с ГПО при лицата от контролната група ($\rho = -0.478$, $P = 0.007$)



Фигура 19. Положителна корелация на ГПО със СОД при лицата от контролната група ($\rho = 0.443$, $P = 0.016$)



Фигура 20. Отрицателна корелация на глюкозата със СОД при лицата от контролната група ($\rho = -0.410$, $P = 0.027$)

ОБСЪЖДАНЕ

1. Избор на подходящи показатели за оценка на активността на оксидативния стрес при пациенти с хронични чернодробни заболявания

Проблемът за значението на образуваните в хода на хроничното чернодробно възпаление РКЧ и тяхната роля за прогресията му е обект на все по-задълбочено изучаване през последните 10 – 15 год. Допуска се, че главна роля в прогресията на хроничното чернодробно заболяване имат образуваните в хода на хроничното възпаление РКЧ (Albano, 2006). Високата концентрация на РКЧ спомага за хепатоцитната некроза и/или апоптоза. Въпреки това, донякъде поради известни ограничения на съществуващите методи за оценка на състоянието на оксидативния стрес *in vivo* при хората, за сега се смята, че няма окончателни доказателства за връзка между оксидативния стрес и патофизиологичните механизми при редица остри и хронични заболявания (Dalle-Donne, 2006).

Затрудненията при изучаването на мястото и ролята на свободните радикали при физиологични и патологични процеси произтичат от разнообразните химични реакции, в които те участват и от разнообразните процеси на увреждане, свързани с прекомерното им натрупване. Вероятно това е причината да има множество комплексни подходи за оценка на свободнорадикаловата активност. В научните проучвания се определя както тоталния антиоксидантен капацитет като израз на кумулативния ефект на всички антиоксиданти в биологичните проби, така и концентрацията на отделни антиоксиданти (Alajbeg и сътр., 2017). Съществува голямо разнообразие на използваните биомаркери за оценка на оксидативния стрес, на вида биологичен материал, в който се правят определянията, и на методите за тяхното количествено определяне. По-важни недостатъци на използваните методи за анализ на биомаркерите на оксидативен и/или нитрозативен стрес са ограничена специфичност на метода, измервания показател не е специфичен продукт на определена РКЧ или РАЧ, недостатъчна чувствителност при определяне концентрацията на измервания показател при здрави индивиди, което не позволява изработването на референтни интервали, влияние на външни фактори върху измерваните концентрации, например липидното съдържание на диетата и др. (Dalle-Donne, 2006).

Към настоящия момент все още няма показател или група от показатели, които да се приемат като „златен стандарт“ при измерването на свободните радикали. Смята се, че трите основни ензима, които предпазват клетките от свръхобразуване на свободни радикали са СОД, каталаза и ГПО (Ighodaro и сътр., 2018). Резултатите от тяхното количествено определяне дават информация за първото ниво на антиоксидантна защита. За измерване на серумната активност или на концентрацията на СОД има разработени различни индиректни методи, при които супероксидните радикали се свързват с детекторни молекули като цитохром С, луциген, пирогалол, тетразолиева сол и др. (Arauz и сътр., 2016). ГПО може да се определя с методи на базата на окислението на глутатиона от ГПО. За СОД и за ГПО има разработени търговски ELISA методи на сандвичев принцип с много добри характеристики на аналитичната надеждност. Използваните в настоящата работа ELISA тест-набори имат обявена от производителя невъзпроизводимост на резултатите в серия: $CV \leq 10.7\%$ за СОД и $\leq 4.5\%$ за ГПО и във време: $CV \leq 11.9\%$ за СОД и $\leq 8.9\%$ за ГПО (Human Cu/Zn SOD Platinum ELISA. Product information & Manual, Human Glutathione Peroxidase 1 ELISA. Product Data Sheet).

За оценка на степента на оксидативния стрес е важно също измерването на индиректни показатели на свободнорадикаловата активност, каквито са продуктите на липидната пероксидация. Най-често като достоверен маркер за оценка на липидната пероксидация се използва МДА. Знае се, че той има мутагенен, атерогенен и карциногенен потенциал, което допълнително подчертава нуждата от неговото мониториране. Концентрацията на МДА в биологични проби (серум, плазма или тъкани) се определя с различни аналитични техники. Първият метод за количествено определяне на МДА в клетъчни или тъканни екстракти и в биологични течности (серум, плазма, урина) е на базата на реакцията между МДА и тиобарбитуровата киселина, при който полученият цветен продукт може да се измери спектрофотометрично или флуориметрично (Young и сътр., 1991, Fogarasi и сътр., 2016). Съществен проблем при този метод е неговата ниска специфичност, която се дължи на лъжливо положителната интерференция от захари, биливердин, билирубин, албумин, сиалова киселина, гликопротеини, урея, както и поради факта, че и други алдехиди, освен МДА реагират с тиобарбитуровата киселина (Dalle-Donne, 2006, Young и сътр., 1991, Fogarasi и сътр., 2016, Marzocco и сътр., 2017). Важен източник на положителна интерференция при тези методи е хемолизата (Marzocco и

сътр., 2017). Друга група методи за количествено определяне на МДА включва използването на редица високоразделителни техники като капилярна електрофореза, газова хроматография с мас-спектрометрично отчитане, течна хроматография, високоефективна течна хроматография (Young и сътр., 1991, Fogarasi и сътр., 2016, Biondi и сътр., 2019). Предимства на тези методи са високата аналитична специфичност, чувствителност и възпроизводимост. Същевременно хроматографските методи изискват скъпа апаратура и тясно профилиран персонал за работа. Вече има разработени търговски ELISA тест набори за количествено определяне на МДА в лизати от клетки или тъкани, в серум или плазма. Те се основават на сандвичев анализ с две антитела, като концентрациите се отчитат по калибрационна крива. В настоящата работа е използван ELISA метод на сандвичев принцип с две антитела – човешко МДА моноклонално антитяло и поликлонално антитяло, маркирано с биотин (MDA ELISA kit, Instruction for use). Коефициентът на вариация на резултатите в серия при този тест набор е $\leq 8\%$, а във време – $\leq 12\%$. Важно предимство на метода е, че не е установена кръстосана реактивност между МДА и други алдехиди. Концентрацията на МДА се измерва с фотометри, които са достъпни и лесни за работа.

Заклучение: Данните за концентрацията на основни ендогенни антиоксидантни ензими като СОД и ГПО, които осигуряват първото ниво на клетъчна защита от оксидативен стрес като намаляват до минимум ендогенното образуване на свободни радикали и на МДА като индиректен показател за засилваща се липидна пероксидация в резултат на свободнорадикалово увреждане, предоставят подходяща информация в подкрепа на хипотезата за ролята на свободните радикали при патологични процеси.

2. Показатели на оксидативния стрес при пациенти с хроничен хепатит

Според получените от нас данни, в сравнение с контролите, пациентите с хроничен хепатит имат статистически значимо по-висок МДА (65.85 ± 3.22 nmol/l спрямо 157.88 ± 10.31 nmol/l, $P < 0.0001$) и по-ниска СОД (128.86 ± 22.84 ng/ml спрямо 25.46 ± 1.72 ng/ml, $P < 0.0001$). При пациентите с хроничен хепатит МДА е около 2.4 пъти по-висок, а СОД е около 5 пъти по-ниска в сравнение с тези показатели при здравите контроли. Средната концентрация на ГПО на пациентите с хроничен хепатит е по-висока от тази

на здравите контроли, но разликата не достигна статистическа значимост (2.19 ± 0.58 ng/ml спрямо 1.38 ± 0.43 ng/ml, $P = 0.344$).

Подобно на нашите резултати, и тези от други проучвания показват наличие на оксидативен стрес при пациентите с хроничен вирусен В или С хепатит, което се потвърждава от високия МДА и компрометирания антиоксидантен статус. В различните проучвания, данните за промените на отделните показатели, особено по отношение на антиоксидантните ензими, не са еднозначни. Съпоставката с данните от сходни на нашето проучване е много затруднена поради използването на различни методи за определяне на показателите на оксидативния стрес и големите разлики в броя на изследваните лица, най-често недостатъчен. Подобно на нашите данни, статистически значимо по-висок МДА при пациенти с хроничен хепатит (7 с хепатит В инфекция и 18 с хепатит С) в сравнение със здрави контроли ($P = 0.026$), са получени от Kumar и сътр. (2013). За разлика от нас, тези изследователи не установяват разлика между двете изследвани групи по отношение на СОД ($P = 0.127$), но намират по-висока активност на ГПО при лицата с хронични хепатити ($P = 0.006$). Нашите данни за по-ниска СОД са в съответствие с данните на Yalcin и сътр. (2020), които при 18 пациенти с хроничен хепатит С (9 мъже и 9 жени) на средна възраст 47.8 ± 3.9 год. установяват сигнификантно по-ниска активност на плазмената СОД в сравнение с тази на здрави контроли (2.75 ± 0.75 U/mg Prot. спрямо 3.76 ± 1.53 U/mg Prot., $P < 0.05$), но активността на ГПО е по-висока (78.25 ± 23.2 U/gHb спрямо 63.26 ± 6.9 U/gHb, $P < 0.05$). Според някои изследователи е подходящо рутинното използване на МДА като полезен показател за проследяване на хода на хроничен хепатит С вирусната инфекция и за мониториране на ефекта от лечението. В тази връзка, в сравнение с 28 здрави контроли, при 19 пациенти с хроничен С хепатит Levent и сътр. (2006) установяват по-висок среден МДА (4.20 ± 1.47 спрямо 9.28 ± 1.61 , $P < 0.001$) и по-ниски СОД (285.78 ± 96.46 спрямо 213.84 ± 71.61 , $P < 0.05$) и ГПО (8.01 ± 1.79 спрямо 6.52 ± 1.86 $P < 0.05$). След 48 седмици лечение с пегилиран интерферон алфа-2b в комбинация с рибавирин е установено сигнификантно понижение на МДА и повишение на СОД и ГПО в сравнение със стойностите на тези показатели при същите пациенти преди лечението ($P < 0.001$ за всички показатели).

Патогенетичните механизми, чрез които хепатит С вирусната инфекция уврежда клетките не са напълно изяснени (Yalcin и сътр., 2020). В различни вътреклетъчни структури на чернодробните клетки (митохондрии,

ендоплазматичен ретикулум, пероксизоми) се образуват разнообразни реактивни видове (супероксидни аниони, хидроксилни радикали, водороден пероксид, азотен оксид, азотен диоксид, нитрат и др.), които при оксидативен стрес или директно засягат липиди, протеини, ДНК или индуцират увреждане на хепатоцитите и на другите чернодробни клетки чрез фиброза, апоптоза или клетъчна некроза (Rebbani and Tsukiyama, 2016). Нарушеното съотношение оксиданти/антиоксиданти често се дължи на повишено образуване на РКЧ и/или РАЧ и понижена антиоксидантна защита, резултат от дисрегулация на ензимните системи (СОД, ГПО, каталаза, глутатион трансфераза и др.) или на понижени антиоксиданти (албумин, билирубин, пикочна киселина, глутатион, трансферин, витамин С, витамин Е и др.). Знае се, че СОД предпазва клетките от вредното действие на супероксидните радикали, а ГПО очиства хидропероксидите. Едно възможно обяснение на ниската концентрация на СОД при хроничен хепатит е свързано или с изчерпване на ензима поради натрупаните нефизиологични количества супероксидни аниони или с нарушена секреция на ензима от увредените хепатоцити (Yalcin и сътр., 2020). Промяната в активността дори на един от антиоксидантните ензими нарушава равновесието между тях и ефективността на тяхното действие, което има важно значение както за прогресията на заболяването, така и за лечението на хроничния С вирусен хепатит. Смята се, че добавянето на антиоксиданти към комплексната терапия на пациентите вероятно би било полезно. Тенденцията към по-висока стойност на ГПО в нашето проучване би могла да се обясни със засилена синтеза на ензима като адаптивен отговор към засиленото генериране на водороден пероксид при пациентите с хроничен хепатит. В същото време ГПО може да редуцира липидните хидропероксиди, като по този начин се стреми да намали вредното влияние на засилената липидна пероксидация върху чернодробните клетки.

Заключение: Според данните от нашето проучване, пациентите с хроничен хепатит са със засилена липидна пероксидация и нарушен баланс между два от основните антиоксидантни ензими – СОД и ГПО. Задълбоченото изучаване на патогенезата на хроничния хепатит в контекста на засилената липидна пероксидация и дисбаланса на антиоксидантната защита като израз на оксидативен стрес, би имало значение за изработването на рационални и ефективни терапевтични подходи.

3. Показатели на оксидативния стрес при пациенти с чернодробна цироза

Чернодробната цироза е крайният изход на хроничното чернодробно заболяване, като най-често цирозирането има вирусна или алкохолна етиология. В проведеното от нас сравнително проучване са включени пациенти с разнообразна етиология на цирозата, като най-висок относителен дял имат лицата, при които заболяването е с етилична (45%) и с постхепатитна (38%) генеза (табл. 1). Според нашите резултати, пациентите с чернодробна цироза имат сигнификантно по-висок среден МДА в сравнение с този на контролите (193.74 ± 11.69 nmol/l спрямо 65.85 ± 3.22 nmol/l, $P < 0.0001$). Лицата с цироза имат около 2.9 пъти по-висока средна концентрация на МДА в сравнение със здравите контроли. Двете групи, включени в настоящото проучване, се различават статистически значимо по концентрацията на ГПО и на СОД. В сравнение с контролите, пациентите с цироза имат статистически значимо по-висока средна плазмена концентрация на ГПО (1.38 ± 0.43 ng/ml спрямо 3.01 ± 1.24 ng/ml, $P = 0.008$, фиг. 3) и по-ниска серумна концентрация на СОД (128.86 ± 22.84 спрямо 24.55 ± 1.20 ng/ml, $P < 0.0001$, фиг. 4). ГПО е около 2 пъти по-висока при лицата с цироза в сравнение със здравите контроли.

В последните 10 – 15 год. нарастват данните от клинични и експериментални проучвания за ролята на оксидативния стрес, както в патогенезата на чернодробната цироза, така и в прогресията на заболяването. Съобщени са данни за статистически значимо по-висок МДА в серум (Galicia-Moreno и сътр., 2016) и в плазма (Nickovic и сътр., 2018) при пациенти с алкохолна цироза в сравнение с този при здрави контроли. Czeczot и сътр. (2006) сравняват концентрацията на МДА и на глутатиона, както и активността на глутатион-свързаните ензими (ГПО, глутатион редуктаза, глутатион трансфераза) в хомогенат от три вида човешка чернодробна тъкан – циротична, неопластична и със запазена структура (контрола). Те установяват статистически значимо по-висок МДА, по-нисък глутатион, по-ниска активност на селен-зависимата ГПО в циротичната и неопластичната тъкани в сравнение с тези на контролата. Според тези изследователи, съобщените от тях резултати показват сигнификантни промени в чернодробния антиоксидантен капацитет при цироза и хепатоцелуларен карцином, увеличават се количествата на РКЧ и в резултат е засилена липидната пероксидация.

В нашето проучване при всички пациенти е налице портална хипертония. Основен фактор в патогенезата на порталната хипертония е повишената чернодробна резистентност към порталния кръвоток. Към настоящия момент се смята, че взаимовръзката между оксидативния стрес и порталната хипертония при пациенти с цироза все още не е добре изучена (Wang и сътр. 2015), но се знае, че потиснатата чернодробна антиоксидантна защита е фактор, който може да допринесе за оксидативното увреждане на черния дроб (Clot и сътр., 1994). При редица други заболявания с нарушен кръвен ток, като например исхемичен и хеморагичен инсулт (Valavi и сътр., 2016) и сърдечно-съдови заболявания (Kaуа и сътр., 2012) има данни за засилена пероксидация на липиди. Според проучване на Wang и сътр. (2015) плазменият МДА е по-висок при 60 лица с постхепатитна цироза в сравнение с този на 30 здрави контроли (673 ± 301 nmol/l спрямо 288 ± 138 nmol/l, $P < 0.01$). Подразделянето на пациентите на подгрупи според класификацията на Child-Pugh, степента на езофагеалните варици и ширината на порталната вена, показва сигнификантно повишение на МДА в зависимост от тежестта на фиброзата и порталната хипертония. В научната литература се срещат проучвания, при които, подобно на нашето, пациентите са със смесена етиология на цирозата. Изследванията в тази насока, извършени от Bhandari и сътр., (2008) също установяват статистически значимо по-висок серумен МДА и по-ниска активност на еритроцитната СОД при пациенти с цироза в сравнение с тези на здрави лица. Подразделянето на пациентите на подгрупи според класификацията на Child-Pugh показва, че групата от Child C има статистически значимо по-висок МДА и по-ниски антиоксидантни маркери в сравнение с тези от Child B клас. Изследователите правят извод, че по-тежката функционална увреда на черния дроб се асоциира с по-тежък оксидативен стрес.

Проучвания, проведени в лабораторни условия, също подкрепят хипотезата за ролята на оксидативния стрес в патогенезата на чернодробната цироза с портална хипертония. В хомогенат от циротичен черен дроб на плъхове е установено увеличено съдържание на супероксидни аниони в резултат от свръхпродукция на циклооксигеназа и ксантинооксидаза, намалено съдържание на азотен оксид, намалена активност на общата СОД, която е резултат от намалена експресия на цитоплазмената и митохондриална форми (Garcia-Sancho и сътр., 2008). Получените данни показват наличието на оксидативен стрес в циротичния черен дроб и подкрепят концепцията, че „очистването“ на азотния оксид от

супероксидния анион вероятно е важна детерминанта за намалена бионаличност на азотен оксид, за ендотелна дисфункция и повишен чернодробен съдов тонус при цироза. По-късно Guillaume и сътр. (2013) съобщават, че приложението на рекомбинантна човешка митохондриална СОД при циротични плъхове понижава порталното налягане без сигнификантни промени в кръвния ток на спланхникуса, което подсказва редукция на резистентността в чернодробните съдове. Тези данни навеждат на мисълта за приложение на рекомбинантната митохондриална СОД като допълваща терапия при лечението на порталната хипертония при цироза. В научната литература е представено съвременното виждане за използването на антиоксиданти като част от вазопротективната стратегия при лечението на порталната хипертония, както и с цел подобряване на антиоксидантния капацитет на черния дроб (Vilaseca и сътр., 2018).

Заклучение: Сигнификантно по-високите концентрации на МДА при пациентите с цироза в сравнение с контролите са израз на значимите процеси на липидна пероксидация с образуване на високо реактивни токсични ненаситени алдехиди. Натрупването на липидни пероксиди при пациентите с цироза показва тяхната роля при заболяването. Установената в нашето проучване по-висока плазмена концентрация на ГПО и по-ниска серумна СОД при пациентите с цироза показват наличието на дисбаланс между тези основни антиоксидантни ензими. Получените сигнификантни променени на МДА, СОД и ГПО при пациентите с цироза в сравнение с тези при здравите контроли потвърждават наличието на изразен оксидативен стрес.

4. Сравнение на показателите на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит и с чернодробна цироза

Проведеното от нас сравнително проучване на показателите на оксидативния стрес между пациентите с хроничен хепатит и с чернодробна цироза показва, че двете групи се различават статистически значимо по серумния МДА (157.88 ± 10.31 nmol/l спрямо 193.74 ± 11.69 nmol/l, $P = 0.034$, табл. 10, фиг. 5). Средната разлика между концентрациите на МДА на тези две групи пациенти (mean difference \pm SE difference) е 35.85 ± 15.74 nmol/ml. МДА е по-висок при пациентите с чернодробна цироза в сравнение с този на пациентите с хроничен хепатит. Налице е тенденция към по-висока ГПО и малко по-ниска СОД при пациентите с цироза в сравнение с тези

показатели при пациентите с хроничен хепатит, но разликите не достигнаха статистическа значимост.

В сравнителните проучвания, посветени на оценката на оксидативния стрес при пациенти с хроничен хепатит и цироза, най-често се определят тоталният антиоксидантен статус (ТАС) и тоталният оксидативен стрес (ТОС). Така например, според проучване на Bolukbas и сътр. (2005) групите с хроничен В хепатит ($n = 33$) и с цироза ($n = 12$) не се различават по ТАС ($P > 0.05$) и по концентрацията на общите пероксиди ($P > 0.05$). В друго по-скорошно и по-обширно проучване също са сравнени ТОС, ТАС и индексът на оксидативния стрес (ИОС = $\text{ТОС}/\text{ТАС}$) при 145 пациенти с хроничен В хепатит, 101 с цироза и 50 с хепатоцелуларен карцином (Feng и сътр., 2017). Не е установена статистически значима разлика на ТАС при сравнението му между пациентите с хроничен хепатит и цироза ($P = 0.152$). Двете групи се различават статистически значимо по ТОС ($P = 0.021$) и по ИОС ($P = 0.038$). В сравнение с пациентите с хепатоцелуларен карцином, ТАС на пациентите с хроничен хепатит и цироза обаче, е значимо по-висок ($P < 0.001$ и $P = 0.001$ съответно).

Данните от тези проучвания са полезни, защото те дават обобщена представа за наличието на оксидативен стрес при изследваните пациенти. По-конкретна информация за промените на отделните фактори, които участват в оксидативния стрес обаче, предоставя тяхното количествено определяне. То дава възможност да се анализират сложните взаимоотношения, както между оксиданти и антиоксиданти, така и между различните антиоксиданти, което е важно с оглед по-детайлната оценка на клиничното състояние на отделния пациент. Изследванията в тази насока на Aksoy и сътр. (2003) показват сигнификантно по-висок МДА при лица с чернодробна цироза усложнена с асцит в сравнение с този на лица с цироза без асцит ($21.10 \pm 6.97 \mu\text{mol/l}$ спрямо $16.52 \pm 5.85 \mu\text{mol/l}$, $P < 0.01$). За разлика от нашето проучване обаче, тези изследователи не установяват разлика между МДА на групите с цироза с асцит и без асцит от една страна и на групата с различни видове хроничен хепатит като цяло от друга страна ($19.20 \pm 5.11 \mu\text{mol/l}$). Средната концентрация на МДА при трите групи с хронично чернодробно заболяване е значимо по-висока в сравнение с тази на здравите контроли ($P < 0.0001$ за всички групи). Допуска се, че ранното активиране на стелатните клетки, които са основен източник на екстрацелуларен матрикс, от липидните пероксиди е важно при чернодробна фиброза.

Заклучение: По-високият МДА при пациентите с чернодробна цироза отразява по-засилените процеси на липидна пероксидация в сравнение с тези при пациентите с хроничен хепатит. Това показва наличие на по-изразен оксидативен стрес при пациентите с цироза, в резултат на което вероятно е установената в нашето проучване тенденция към по-висока серумна концентрацията на ГПО при тези пациенти. Допускаме, че това е адаптивен отговор на ГПО да обезврежда увеличаващите се количества хидропероксиди и да влияе на засилващата се липидна пероксидация, като се стреми да я редуцира.

5. Влияние на пола върху метаболитните показатели и показателите на оксидативния стрес при пациентите с хроничен хепатит, с чернодробна цироза и при контролната група

При изследваните от нас пациенти с хроничен хепатит и с цироза не се установи половообусловена разлика както в серумната концентрация на показателите на оксидативния стрес (фигури 6, 7, 8, 9, 10 и 11), така и на метаболитните показатели. При лицата от контролната група, единствената разлика, която установихме е по отношение на серумния МДА, който при жените е статистически значимо по-висок в сравнение с този на мъжете (70.27 ± 3.16 nmol/ml спрямо 54.25 ± 6.95 nmol/ml, $P = 0.026$), фиг. 12.

В научната литература проучванията, в които се изучава влиянието на факторите на биологичната вариация върху концентрацията на оксиданти и антиоксиданти не са многобройни, резултатите са разнопосочни (Kowalska и Milnerowicz, 2016). Според японски изследователи, при здрави жени ($n = 17$) и мъже ($n = 12$) на възраст от 61 до 80 год., плазменият МДА, СОД, ГПО, каталаза, окислен и редуциран глутатион не се различават статистически значимо (Takahasi и сътр., 2013). Според полски изследователи, при сравнение на 74 жени и 35 мъже на възраст от 20 до 25 год. МДА и ГПО не се различават, а СОД е статистически значимо по-висока при мъжете (Kowalska и Milnerowicz, 2016). Според Мао и сътр. (2019) при 2223 лица (997 мъже и 1226 жени) на възраст от 65 до 100 год. средната плазмена активност на СОД при мъжете (56.18 U/ml) е по-ниска от тази на жените (58.50 U/ml), $P < 0.001$. Мъжете и жените не се различават по средната концентрация на МДА ($P = 0.24$).

Подобно на нашите данни за по-висок МДА при жените от контролната група в сравнение с този на мъжете, се съобщава в обширно проучване, което изучава ролята на демографски, физически, плазмени и диетични

фактори за липидната пероксидация при 298 здрави лица на възраст от 19 до 78 год. (Block и сътр., 2002). Установени са сигнификантно по-високи плазмени концентрации на МДА и F_2 – изопростани при жените ($n = 177$) в сравнение с тези на мъжете ($n = 121$), $P < 0.0001$. Едно възможно обяснение на сигнификантно по-високата липидна пероксидация при жените според тези изследователи е високият процент телесни мазнини при жените, но тяхното точно определяне в това проучване не е извършено. В друго обширно проучване е изучавана биологичната вариация на СОД и ГПО при 1863 клинично здрави лица на възраст от 4 до 97 год. и не е установена полововообусловена разлика в плазмената активност на тези показатели (Gulmougi и сътр., 1991). Според това проучване, фактори като телесно тегло, кръвно налягане и менопауза не повлияват ензимната активност на тези антиоксиданти, СОД се влияе от тютюнопушенето, а ГПО – от консумацията на алкохол.

В нашето проучване за влиянието на пола ние не установяваме разлики по отношение на метаболитните показатели и показателите на оксидативния стрес в двете патологични групи. В проучване от 2020 год. (Zelber-Sagi и сътр.) е определен МДА при 394 лица с неалкохолна стеатозна болест (185 жени и 209 мъже) и е установено наличие на сигнификантна разлика между мъжете и жените (14.37 ± 6.50 nmol/l спрямо 17.89 ± 9.79 nmol/l съответно, $P < 0.001$). Някои изследователи проучват влиянието на редица други фактори като минали бременности, прием на орални контрацептивни средства, менопауза и хормонална заместителна терапия върху прогресията на чернодробната фиброза при 157 жени с хроничен С хепатит (Martino и сътр., 2004). Установено е, че менопаузата се явява независим предиктор на прогресията на фиброзата, приемът на орални контрацептивни средства няма сигнификантен ефект върху нея, а миналите бременности и хормонозаместителната терапия повлияват благоприятно фиброзата. Допуска се, че в дългосрочен аспект вероятно естрогените имат протективен ефект върху хистопатологичните лезии при жените с хроничен С хепатит.

Заключение: В нашето проучване установихме полововообусловена разлика само по отношение на МДА при лицата от контролната група, който е по-висок при жените. Мъжете и жените, включени в тази група, не се различават статистически значимо по възраст, но ние не сме анализирали влиянието и на други фактори върху показателите на оксидативния стрес. Към момента в научната литература са изказани предположения за влиянието на различни фактори върху показателите на оксидативния стрес –

възраст, ИТМ, процент на телесните мазнини, тютюнопушене, холестерол, С-реактивен протеин, естрогени и др. Но за сега данните за влиянието на пола върху показателите на оксидативния стрес са разнопосочни и това не позволява да се оформят окончателни изводи.

6. Анализ на връзката между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели при пациентите с хроничен хепатит, с чернодробна цироза и при контролната група

Експериментални (Ahmadvand и сътр., 2014) и клинични (Dworzański и сътр., 2020) проучвания при състояния, свързани с инсулинова резистентност, показват наличието на променен антиоксидантен капацитет. За целите на тези проучвания са използвани различни биологични проби (черен дроб, бъбреци, серум, плазма и др.), налице са известни противоречия в получените резултати, което затруднява съпоставката на данните. Според едни проучвания СОД и ГПО са с понижена серумна активност при пациенти със ЗД тип 2 в сравнение с контролна група без ЗД тип 2 (Dworzański и сътр., 2020). В други проучвания са намерени повишени Cu/Zn СОД и ГПО при пациенти с диабет тип 1 или 2 в сравнение със здрави контроли (Moussa, 2008, Salman, 2018). Едно задълбочено и критично виждане за най-често използваните циркулиращи биомаркери за оценка на оксидативния стрес и антиоксидантната защитна система при пациенти с предиабет, ЗД тип 2 и неговите усложнения е представено от Bigagli и Lodovici (2019). От него става ясно, че проучванията в тази насока не са малко, но резултатите са разнопосочни, особено по отношение промените на антиоксидантната защита, като най-често не се взема предвид влиянието на някои преданалитични фактори като потенциални полово-свързани разлики или интерференции от лекарства, които имат антиоксидантен ефект, като статини, β -блокери и др. Въпреки това се отчита факта, че засиленото оксидативно увреждане, което съпътства хипергликемията, би могло да се разглежда като потенциален таргет при терапията на засегнатите пациенти, което би подпомогнало нейното индивидуализиране.

Ние анализирахме взаимовръзките между показателите на оксидативния стрес от една страна и между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели от друга страна при лицата от контролната група и в групите с хронично чернодробно заболяване. При лицата от контролната група, МДА корелира отрицателно със СОД ($P = 0.050$) и с ГПО ($P = 0.007$), а СОД и ГПО корелират положително по между

си ($P = 0.016$). В допълнение, СОД корелира значимо и положително с HDL-холестерола ($P = 0.050$) и значимо и отрицателно с глюкозата ($P = 0.027$). Налице е гранична значимост на връзката между СОД и НОМА-IR ($P = 0.059$). Тези взаимовръзки не се потвърдиха в групите с хроничен хепатит и цироза. При пациентите с хроничен хепатит и с цироза не установихме статистически значими корелации между МДА, СОД и ГПО. В групата с хроничен хепатит не установихме статистически значими корелации между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели. В тази група установихме гранична значимост на връзката между СОД и инсулина ($P = 0.076$). В групата с цироза установихме значима отрицателна корелация на СОД с триглицеридите ($P = 0.002$) и гранична значимост на връзката между СОД и общият холестерол ($P = 0.074$) и между ГПО и HDL-холестеролът ($P = 0.063$).

В нашето проучване при здравите лица не установихме значима корелация между МДА и липидните показатели, но в проучване на Block и сътр. (2002) при 298 здрави лица на възраст от 19 до 78 год. е установена положителна корелация на МДА с общия холестерол и С-реактивния протеин, а ИТМ и расата асоциират с изопростаните.

В обширно проучване от 2010 год. са анализирани данните от две проспективни кохортни проучвания проведени в Шотландия за период от 42 години, в които са включени общо 9559 мъже на средна възраст 47 ± 3 год. с цел да се установи дали комбинираният ефект на високата алкохолна консумация и високият ИТМ повишават риска от чернодробно заболяване (Hart и сътр., 2010). Анализът на данните е показал, че всеки от тези фактори поотделно повишава риска от чернодробно заболяване и е налице усилване на ефекта при комбинираното им действие. Две съображения се коментират в подкрепа на този извод. От една страна, затлъстяването води до развитието на стеатохепатит чрез влияние върху чернодробната инсулинова чувствителност. От друга страна, алкохолният мастен черен дроб индуцира периферна инсулинова резистентност и така подпомага затлъстяването.

Изглежда и други фактори, извън тези, свързани с инсулиновата резистентност, имат значение за нивата на оксидативния стрес при хроничното чернодробно заболяване. Намерена е връзка между СОД и МДА от една страна и концентрацията на плазмения ендотоксин от друга (Chen и сътр. м 2013). Изследвана е група от 94 пациенти с хроничен хепатит (90 лица с хроничен хепатит В и 4 с хроничен хепатит С) на средна възраст

35 год. При 60 от тях е установена ендотоксинемия. Сравнени са СОД и МДА на лицата с и без ендотоксинемия и е установено, че пациентите с ендотоксинемия имат по-висок МДА (6.28 ± 1.52 nmol/ml спрямо 4.50 ± 1.09 nmol/ml) и по-ниска СОД (85.43 ± 23.10 NU/ml спрямо 120.0 ± 52.38 NU/ml), $P < 0.001$ за двата показателя. Установена е статистически значима положителна корелация на плазмения ендотоксин с МДА и отрицателна със СОД, което показва връзка между ендотоксинемията и антиоксидантния капацитет.

На клетъчно ниво ултраструктурни митохондриални лезии, понижена активност на комплексите от дихателната верига и нарушена способност за синтез на АТФ се установяват в чернодробна тъкан на пациенти с алкохолни и неалкохолни чернодробни заболявания (Mansouri и сътр., 2018). Засилената липогенеза и потиснатото β -окисление на мастни киселини води до натрупване на триглицериди в хепатоцитите, което заедно с повишените нива на РКЧ допринася за инсулиновата резистентност при пациентите със стеатохепатити. Митохондриалните РКЧ нарушават метаболитни сигнални пътища, което повлиява развитието и прогресията на хроничното чернодробно заболяване. Митохондриалният стрес и лезии спомагат за клетъчната смърт, чернодробната фиброгенеза, възпалението и имунните отговори към вирусни инфекции. Експериментални *in vitro* проучвания са показали, че третирането на хепатомна клетъчна култура от плъх със свободни мастни киселини повишава вътреклетъчните триглицериди, индуцира стеатоза и стрес на ендоплазматичния ретикулум (Ota и сътр., 2008). Липид-индуцираният стрес на ендоплазматичния ретикулум повлиява секрецията на апо В100. Тя се променя дозозависимо, като високият липиден товар я потиска. Тези данни са потвърдени и *in vivo* при интравенозна инфузия на олеинова киселина при мишки. Получените данни подсказват, че повишените липиди в черния дроб предизвикват стрес на ендоплазматичния ретикулум, ограничена секреция на апоВ и на триглицериди, което влошава стеатозата.

Заключение: Корелационният анализ на данните за оксидативния стрес и за метаболитните показатели при контролите, очаквано показва отрицателна корелация на МДА със СОД и ГПО, положителна корелация между двата антиоксидантни ензима, а СОД корелира положително с ХДЛ-холестерола и отрицателно с глюкозата. Нито една от тези корелации не се потвърди при двете групи с хронични чернодробни заболявания. В групата с чернодробна цироза е налице статистически значима отрицателна

връзка на СОД с триглицеридите. В групите с хронични чернодробни заболявания не установихме други значими връзки между показателите на оксидативния стрес и метаболитните показатели. Допускаме, че вероятно не само анализираниите от нас метаболитни, но и други фактори влияят върху концентрацията на МДА, СОД и ГПО в кръвта.

ИЗВОДИ

1. Повишеният серумен МДА и понижената СОД при пациентите с хроничен хепатит показват наличие на оксидативен стрес, който е довел до засилен процес на липидна пероксидация и изчерпване на СОД. Непроменената концентрация на ГПО показва отчасти съхранен антиоксидантен капацитет при тези пациенти.
2. При пациентите с чернодробна цироза, освен високият МДА и ниската СОД, се установи висока концентрация на ГПО. Промените на два от основните антиоксидантни ензими, които директно елиминират реактивни кислородни части, вероятно е компенсаторна реакция на организма за противодействие срещу засилващия се оксидативен стрес. Тя обаче не е достатъчна да потисне процесите на липидна пероксидация.
3. Пациентите с чернодробна цироза се различават от пациентите с хроничен хепатит по статистически значимо по-високият МДА. Това е израз на по-силно изразените процеси на липидна пероксидация в групата с чернодробна цироза.
4. При пациентите с хроничен хепатит и с чернодробна цироза факторът пол не оказва статистически значимо влияние върху концентрациите на изследваните от нас метаболитни показатели и показатели на оксидативния стрес.
5. Полово обусловени разлики се установиха единствено по отношение на серумния МДА при лицата от контролната група, който е по-висок при жените. Допускаме, че значение за този резултат има по-високият брой на жените, включени в тази група.
6. При пациентите с чернодробна цироза, СОД и триглицеридите взаимодействат помежду си в сложния процес на развитие на инсулиновата резистентност. Израз на това взаимодействие е установената статистически значима отрицателна корелация между серумните концентрации на СОД и триглицеридите.
7. При лицата от контролната група положителната корелация между СОД и ГПО потвърждава комплексното действие на двата антиоксидантни ензима при обезвреждането на свободни радикали.

8. Отрицателната корелация между двата антиоксидантни ензима и МДА при лицата от контролната група показва съвместното протективно действие на СОД и ГПО срещу последиците от прекиското окисление на липидите.
9. При лицата от контролната група антиоксидантният ензим СОД показва корелационни връзки с глюкозата и ХДЛ-холестерола. Тези връзки не се потвърдиха при пациентите с хроничен хепатит и с чернодробна цироза.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с научно-теоретичен характер

1. За първи път у нас е проведено комплексно клинично проучване върху процесите на липидна пероксидация и антиоксидантна защита за установяване ролята на оксидативния стрес при пациенти с различно по тежест хронично чернодробно заболяване.
2. Доказана е промяна в процеса на липидна пероксидация при пациенти с хронични чернодробни заболявания, която е по-изразена при пациенти с чернодробна цироза с портална хипертония в сравнение с пациенти с хроничен хепатит.
3. За първи път у нас е проучено влиянието на фактора пол върху концентрациите на МДА, СОД и ГПО при пациенти с хронично чернодробно заболяване и при контролна група клинично здрави лица от българската популация.
4. Проведеното клинично проучване допринася за изясняване на връзката между отклоненията в показателите на оксидативния стрес МДА, СОД и ГПО и нарушенията в метаболитните показатели при пациенти с хронични чернодробни заболявания, свързани с инсулиновата резистентност.
5. За пръв път у нас е анализирана връзката между показателите на оксидативния стрес МДА, СОД и ГПО и метаболитните показатели при клинично здрави лица от българска популация.

Приноси с научно-приложен характер

1. Получените данни за промените на антиоксидантните ензими СОД и ГПО могат да послужат като основа за по-нататъшни задълбочени проучвания, свързани с индивидуализиране на терапията при пациенти с хронични чернодробни заболявания.
2. С помощта на ELISA методи за първи път у нас са изследвани концентрациите на серумния МДА като маркер на липидната пероксидация и на антиоксидантните ензими СОД и ГПО при пациенти с хронични чернодробни заболявания.

Списък на публикациите и научните съобщения във връзка с дисертационния труд

I. Публикации в периодика

1. **Dimitar Terziev**. Relationship between antioxidant enzymes and insulin resistance in patients with chronic liver disease. 15th International Scientific Conference “Knowledge in practice”, Bansko, Bulgaria, 15-17 December, 2017. Knowledge-International Journal Scientific Papers, vol. 20.4, december, 2017; pp:1997-2002
2. **D. Terziev**, D. Terzieva, Vl. Andonov. The role of oxidative stress in liver pathology. 16th International Scientific Conference “Knowledge without borders”, 16-18.03.2018, Vranjaska banja, Serbia. Knowledge-International Journal Scientific Papers, vol. 22.5, march, 2018; pp:1403-1406
3. **Д. Терзиев**, Д. Терзиева, Вл. Андонов, Н. Матева. Серумна концентрация на някои антиоксидантни ензими при пациенти с чернодробна цироза. Научни трудове на Съюза на учените в България-Пловдив. Серия Г. Медицина, фармация, дентална медицина, том XXIV, 2020, стр. 150-153
4. **Димитър Терзиев**, Дора Терзиева, Владимир Андонов, Митко Митков, Нонка Матева. Връзка на биомаркери на оксидативен стрес и инсулинова резистентност при пациенти с чернодробна цироза. Сп. „Обща медицина“, брой 3/2022 (Под печат)

II. Участия в национални и международни форуми

1. **Dimitar Terziev**, Dora Terzieva, Vl. Andonov. Serum levels of malondialdehyde in patients with chronic liver disease. The 26th meeting of the Balkan Clinical laboratory Federation. The 6th National Congress of the Macedonian Association of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine, October 03th-05th, 2018; Skopje, Macedonia. Balkan Journal of Clinical Laboratory – XXVI, 18,1 (Scientific Program, Topic Varia): pp87; P058
2. **D. Terziev**, D. Terzieva, V. Andonov, N. Mateva. Investigation of serum malondialdehyde in patients with chronic viral hepatitis. EuromedLab 2019-23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, May 19-23. 2019, Barcelona, Catalonia, Spaine. Clinica Chimica Acta, Special Issue/ Abstracts, vol. 493S1, June 2019; S355-S378: T394. **IF 2019: 2.615**
3. **D. Terziev**, D. Terzieva, V. Andonov, N. Mateva. Serum levels of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in patients with chronic viral hepatitis. EuromedLab 2019-23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, May 19-23. 2019, Barcelona, Catalonia, Spaine. Clinica Chimica Acta, Special Issue/ Abstracts, vol. 493S1, June 2019; S355-S378: T395. **IF 2019: 2.615**
4. **D. Terziev**, Vl. Andonov, M. Mitkov, D. Terzieva, N. Mateva. Investigation of relationship between some antioxidant enzymes activity and insulin resistance in chronic liver disease patients. Folia medica 2020; vol. 62 (1):125-126