

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“-ВАРНА
Медицински факултет**

**ПЪРВА КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
УС ПО КАРДИОЛОГИЯ**

Д-Р ИВАНЕТА ДИМИТРОВА ЙОНЧЕВА-БИСЕРОВА

**ФИБРОЗНА АКТИВНОСТ
ПРИ ПАЦИЕНТИ СЛЕД ИМПЛАНТАЦИЯ
НА ПОСТОЯНЕН
ЕЛЕКТРОКАРДИОСТИМУЛАТОР**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

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

Научна специалност: Кардиология, шифър 03.01.47

Научен ръководител: проф. д-р Мария Негрева, д.м.н.

Варна, 2024

Дисертационният труд съдържа 135 страници и е онагледен с 5 таблици и 34 фигури. Библиографията включва 409 литературни източника на латиница. Проучването е извършено в кардиологично отделение към УМБАЛ “Дева Мария” гр. Бургас. Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на Катедрата по вътрешни болести при Медицински Университет „Проф. д-р П. Стоянов“-Варна.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 18.10.2024г. от 14 часа в зала на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Медицински Университет „Проф. д-р П. Стоянов“-Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО	6
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ.....	7
IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.....	23
V. ИЗВОДИ	59
VI. НАУЧНИ ПРИНОСИ	60
VII. ПУБЛКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕТАЦИОННИЯ ТРУД	62

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АКН	- Артериално кръвно налягане
ВСС	- Внезапна сърдечна смърт
ДК	- Дясна камера
ДКМП	- Дилатативна кардиомиопатия
ЕЦМ	- Екстрацелуларен матрикс
ЛББ	- Ляв бедрен блок
ЛК	- Лява камера
ПЕКС	- Постоянен електрокардиостимулатор
ПМ	- Предсърдно мъждене
РААС	- Ренин ангиотензин алдостеронова система
СН	- Сърдечна недостатъчност
ЯМР	- Ядрено-магнитен резонанс
AV-блок	- Атриовентрикуларен блок
BMI	- Индекс на телесната маса
BNP	- Натриуретичен пептид тип В
CFBs	- Сърдечни фибробласти
CITP	- Карбокситерминален телопептид на колаген тип I
CRT	- Сърдечна ресинхронизираща терапия
CTGF	- Съединително тъканен растежен фактор
EF	- Фракция на изтласкване
HBP	- (His Bundle Pacing) Пейсиране на снопа на Хис
ICD	- Имплантируем кардиовертер дефибрилатор
IL -1 β	- Интерлевкин 1 бета
LAVI	- Индексиран обем на лявото предсърдие
LBAP	- (Left Bundle Area Pacing) пейсиране в зоната на лявото бедро
LVEDV	- Левокамерен краен диастолен обемната
LVESV	- Левокамерен краен систолен обем
MMPs	- Матриксни металпротеинази
myoFBs	- Миофибробласти
PAI-1	- Инхибитор на плазминогенен активатор тип I
PICM	- Пейсмейкър индуцирана кардиомиопатия
PIIINP	- Амино-терминален пропептид на проколаген тип III
PIICP	- Карбокси-терминален пропептид на проколаген тип III
PICP	- Карбокси терминален пропептид на проколаген тип I
PINP	- Амино-терминален пропептид на проколаген тип I
ROS	- Реактивни кислородни радикали
SSS	- Синдром на болен синусов възел
TIMP	- Тъканен инхибитор на металпротеиназите
TNF α	- Туморнекротизиращ фактор
TGF β 1	- Трансформиращ растежен фактор бета

I. ВЪВЕДЕНИЕ

През втората половина на 20-ти век, технологичният напредък в областта на кардиологията и кардиостимулацията доведе до нарастване на броя на пациентите с импалнтирани пейсмейкъри за преодоляване на налична ритъмно-проводна патология (Mond & Proclemer, 2011). Докладваната честота на поставените устройства варира между отделните регистри, като достига до над 1000 устройства на 1 милион население в развитите държави в Европа (Timmis et al., 2018). Това води до удължаване на продължителността и качеството на живот на засегнатата популация пациенти (Hofer S et al., 2005).

Повече от 50 години най-масовият метод за пейсиране е чрез имплантиране на електрод в апекса на ДК. От друга страна, деснокамерна апикална стимулация провокира електрическа и механична дисинхрония, което води до повишен риск от развитие на сърдечна недостатъчност (СН) и предсърдно мъждене (ПМ) (Nielsen et al., 2003; Sweeney et al., 2003).

Резултатите от проведени анализи показват, че над 10 % от пациентите след имплантация на постоянен електрокардиостимулатор (ПЕКС) развиват прояви на СН още на 2-та година след това (Tayal et al., 2019). От друга страна изследвания върху експериментални модели сочат, че асинхронната камерна контракция води до разлика в работното натоварване на кардиомиоцитите от отделните зони на миокарда (Duchenne et al., 2018). Това се последва от проемни в клетъчния метаболизъм и левокамерно ремоделиране, което се асоциира с динамика в екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ) и колагеновото отлагане в миокарда (Mollmann et al., 2009). Тези резултати поставят въпроса за молекулярните и клетъчните механизми, които участват в развитието на СН и фиброзата в сърдечния мускул при пациентите след имплантация на ПЕКС, както и от ефективен неинвазивен метод за диагнозата на това състояние.

Динамичното проследяване на промените във фиброзния статус при пациенти с ПЕКС е обект на единични проучвания, като резултатите от тях са противоречиви и недостатъчни. Това даде основание за провеждането на настоящото изследване, като определи формулирането на целта му.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО

1. ЦЕЛ

Да се изследва в динамика фиброзния процес при пациенти след имплантация на постоянен електрокардиостимулаторзадачи.

За постигане на тази цел бяха набелязани следните задачи:

1. Да се изследва фиброзния статус преди имплантацията на двукухинен ПЕКС, на 12-та седмица и на 24-та седмица след имплантацията, като се определят плазмените нива на сигналните молекули TGF- β 1 и CTGF.
2. Да се проследят нивата на маркерите за колагенов синтез преди имплантацията на двукухинен ПЕКС, на 12-та седмица и на 24-та седмица след имплантацията, като се изследват плазмените нива на P1PC, P11NP.
3. Да се изследва ехокардиографски обема на ЛП, като се проследи промяната в този параметър изходно в деня след имплантацията на ПЕКС, на 6-та, 12-та и 24-та седмица след това.
4. Да се проследи ширината на QRS комплекса от повърхностната ЕКГ за да се оцени индуцираната от апикалната деснокамерна стимулация електрическа асинхронност на миокарда изходно на 6-та, 12-та и 24-та седмица след имплантацията.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Дизайн на изследването

Проучването се проведе в Кардиологично отделение към УМБАЛ "Дева Мария" гр. Бургас, България за периода 03/2019 - 08/2021. Процедурата по включване на пациенти и контроли започна след одобрение на Комисията по етика на научните изследвания към МУ гр. Варна 82/28.03.2019 и Комисията по етика на научните изследвания към УМБАЛ "Дева Мария" гр. Бургас 502/21.03.2019 и в съответствие с изискванията на Хелзинкската декларация (The World Medical Association Declaration of Helsinki, 2008). Включени бяха участници над 18 годишна възраст след предварително разясняване и подписване на информирано съгласие за участие.

Формирани бяха две групи, пациентска и контролна. Подборът на участниците в проучването беше извършен въз основа на ясно формулирани *„Включващи и изключващи от проучването критерии“* (виж по-долу). Пациентската група беше формирана при селектиране на последователно постъпили в отделението пациенти с индикация на имплантация на двукухинен кардиостимулатор. Контролите бяха доброволци, насочени от личен лекар за скриниране за участие в проучването след посещение при него за годишен профилактичен преглед.

Ключов момент в дизайна на изследването беше изравняване на демографски и клинични характеристики на двете групи (пациентската и контролната), с цел осигуряване максимално обективно съпоставяне и минимизиране възможността за грешка при подбора (Kang et al., 2008; Suresh, 2011). Това допринесе за достоверност на направените изводи и установените причинно - следствени връзки. Контролната група беше създадена като близка на пациентската по отношение на полова структура, възраст и придружаващи заболявания.

Клиничната оценка на всеки участник беше извършена въз основа на налична медицинска документация, подробно снета анамнеза, физикален преглед, електрокардиограма и трансторакална ехокардиография.

За целта на проучването при всеки участник бяха изследвани четири показатели за фиброзна активност в периферна венозна кръв, взета от кубитална вена.

В пациентската група показателите за фиброзна активност бяха определени трикратно - непосредствено преди имплантацията на ПЕКС (начална стойност или визита 1 - V1), на 12-та (визита 2 - V2) и 24-та (визита 3 - V3) седмица след имплантацията. Също така при пациентите беше проведена допълнителна визита на 6-

та седмица след имплантацията на кардиостимулатора, която се маркира като визита V1.1. На нея беше осъществен клиничен преглед, повърхностна електрокардиограма, ехокардиография и телеметрия на имплантираното устройство.

В контролната група се изследваха същите показатели трикратно - изходно (визита 1 - V1), на 12-та (визита 2 - V2) и 24-та (визита 3 - V3) седмица след селектирането им за проучването. Кръвта беше центрофугирана според изискванията на използваните тестове. Получената плазма беше замразявана и съхранявана отново в съответствие с приложените тестове. В контролната група беше проведен клиничен преглед с ЕКГ и ехокардиография при селектирането им за включване в проучването. На проследяващите визити беше взимана кръв за изследване на фиброзните показатели, като също така участниците бяха разпитвани за новопоявили се оплаквания и заболявания.

За проучването бяха скринирани само пациенти със запазена синусова активност и пълен атриовентрикуларен блок като индикация за имплантация на двукухинен кардиостимулатор. Пациентите бяха последователно скринирани при хоспитализацията в лечебното заведение спрямо поставените цели.

На селектираните пациенти, след подписване на информирано съгласие се имплантира двукухинен пейсмейкър - DDDR спрямо изискванията описани в ръководството на ESC/ EHRA (Boriani et al., 2019; Brignole et al. 2018).

2. Участници в изследването

От общо скринирани 144 пациенти, поради наличие на изключващи критерии (*виж изкл. критерии*), от проучването отпаднаха 99 пациенти. За изравняване на половата структура бяха селектирани 45 пациенти (25 мъже, 20 жени), на средна възраст 72.18 ± 1.35 г. За селектиране на участници бяха използвани представените по-долу включващи критерии, които произтичаха от целите на проучването.

Включващи критерии за участници в пациентска група

1. Наличие на пълен атриовентрикуларен блок като индикация за имплантация на двукухинен кардиостимулатор.
2. Допустимо съпътстващо заболяване – до I степен артериална хипертония, която беше с добър медикаментозен контрол.
3. Липса на изключващи критерии.

Включващи критерии за участници в контролна група

1. Липса на анамнестични или ЕКГ данни за ритъмно-проводна патология.
2. Допустимо съпътстващо заболяване – до I степен артериална хипертония, която беше с добър медикаментозен контрол.
3. Липса на изключващи критерии.

За целите на проучването беше от изключителна важност при селектираните пациенти и контроли да се минимизира влиянието на фиброзния отговор от приемани медикаменти и съпътстващи заболявания. Поради тази причина както пациентите, така и контролите бяха лекувани само с фармацевтични препарати, за които няма доказателства за пряко влияние върху RAAS системата (renin-angiotensin-aldosterone system, ренин-ангиотензин-алдостеронова система). След селектиране за включване в проучването на участниците беше предписана терапия с дихидропиридинов калциев антагонист - амлодипин, тиазиден диуретик - хидрохлоротиазид и при необходимост беше добавен централно действащ медикамент – метилдопа, в дози, необходими за постигане на контрол на артериалното налягане.

Включените пациенти в изследването бяха проследени в четири визити, съответно изходно, на 6, на 12 и на 24 седмица след имплантацията на ПЕКС. Кръвни проби бяха взети непосредствено след селектиране за включване при първото убождане за поставяне на венкат. За целите на проучването, ехокардиографското изследване и регистрирането на ЕКГ бяха проведени в деня след имплантацията на кардиостимулатора. Данните от изходните стойности на кръвните проби и изследваните ехографски показатели бяха маркирани като визита 1 (V1). За да се оцени и проследи ранният ефект на възстановената предсърдно камерна синхронност в резултат на имплантираният пейсмейкър, беше въведена проследяваща визита на 6-та седмица, когато беше проведено ехокардиографско изследване, ЕКГ, както и телеметрия на кардиостимулатора. Тази визита беше маркирана като визита 1.1 (V1.1) и не беше свързана с взимане на кръвни проби за изследване на фиброзна активност. На последващите визити на 12-та седмица - визита 2 (V2) и на 24-та седмица - визита 3 (V3), беше проведен клиничен преглед, ехокардиография, ЕКГ и телеметрия, и бяха взети кръвни проби за изследване на фиброзните показатели. Проведеното ехокардиографско изследване бе съгласно действащите препоръки за оценка на сърдечните камери, както и тези за провеждане на клинично ехокардиографско проучване, предложени и описани от European Association of Cardiovascular Imaging (Lang et al., 2015). Всички участници бяха

разпитани за симптоми на новопоявило се сърдечно съдово заболяване, като такова не бе установено при проведения след това клиничен и ехокардиографски преглед.

За формиране на контролната група бяха приложени идентични изключващи критерии, както при пациентската група (виж по-долу). Контролната група беше създадена като идентична на пациентската, като участниците се набираха паралелно със селектирането на пациентите и след подписване на информирано съгласие. Така след общо 102 скринирани, 46 от тях (24 мъже, 22 жени) бяха селектирани като контроли със средна възраст от 71.96 ± 1.29 години. При контролните нямаше анамнестични и ЕКГ данни за налична ритъмно-проводна патология. Като съпътстващо заболяване се допускаше наличие на до I степен, добре контролирана с медикаменти артериална хипертония. Както в пациентската група, така и в контролната се използваха антихипертензивни медикаменти, които нямат пряк ефект върху фиброзния отговор. Здравният статус на участниците в проучването (пациенти и контроли) беше определен на базата на снета анамнеза, физикален преглед, лабораторни изследвания, както и регистрирана ЕКГ и трансторакална ехокардиография.

Подборът на участниците в проучването (пациенти и контроли) целеше да изключи всички фактори, които могат да окажат влияние върху фиброзната активност, а именно - съпътстващи заболявания и медикаментозна терапия.

Изключващи критерии от проучването:

- Наличие на сърдечно-съдови заболявания: исхемична болест на сърцето (включително остър коронарен синдром, преживян миокарден инфаркт, независимо от давността, коронарна реваскуларизация PCI/CABG, стабилна ангина пекторис), сърдечна недостатъчност с намалена помпена функция, неконтролируема хипертония, възпалителни заболявания на сърцето (миокардит, перикардит, инфекциозен ендокардит), вродени сърдечни дефекти, клинично значими придобити заболявания на сърдечните клапи, кардиомиопатии, тромбоемболични инциденти.
- Наличие на други заболявания: бъбречна или чернодробна недостатъчност, заболявания на централната нервна система, възпалителни и/или инфекциозни заболявания в последните три месеца, неопластични или автоимунни заболявания, хронични белодробни заболявания, заболявания на ендокринната система, оперативни интервенции през последните три месеца.

- Наличие на бременност, системен прием на НСПВС (нестероидни противовъзпалителни лекарства), антитромбозни медикаменти кортикостероиди.
- Участници, които поради каквато и да било причина не са били проследени до края на определения период, се изключваха от изследването.

3. Оперативна техника, интраоперативна верификация на параметрите на електродите, програмиране на имплантираното устройство

Имплантацията на пейсмейкърите се извършваше в ангиографската зала на болницата, като се спазваха стриктни правила за асептика и антисептика (Ramsdale & Rao, 2012). След внимателно почистване на оперативното поле с разтвор на повидон-йод, пациентът беше покрит със стерилен сет, след което беше приложена местна анестезия в подключичната зона с лидокаин (1% разтвор на лидокаинов хидрохлорид).

За поставяне на електродите се извършваше венозен достъп чрез пункция на вена субклавия в ляво или дясно. Преди пункцията, позицията на вената се верифицираше чрез впръскване на 20 ml контрастно вещество Омнипак (Omnipaque). Канюлирането на вената се извършва по метода на Seldinger с 7F Peel-Away Introducer Kit (Seldinger, 1953). След успешното поставяне на двата водача в горната празна вена, последователно се въвеждат двата електрода - единият за камерата и единият за предсърдието.

Електродът за камерата се позиционира в апекса на дясната камера с активна фиксация. Позицията му се потвърждава рентгеноскопично в дясна предна коса проекция и в лява латерална проекция. За да се потвърди стабилност на позицията на електрода, се използва стимулация при 1 V амплитуда на вълната след инструкции към пациента да кашля и да направи няколко дълбоки вдишвания и издишвания. След като бъде определен прагът на стимулация, съпротивлението и сензингът на електрода чрез PSA (пейсмейкър анализираща система) на фирма Medtronic, той се фиксира за фасцията на пекторалния мускул с нерезорбируема лигатура.

С цел да се намали риска от асистолия по време на имплантацията, след като се осигури стабилна позиция на деснокамерния електрод, той се оставя свързан с PSA анализатора със защитна стимулация от 30 удара в минута.

Предсърдният електрод беше поставен в ухото на дясното предсърдие чрез стилет с предварително зададена J форма. За да се верифицира коректната позиция се приемаше

наличие на специфичното странично движение на върха на електрода при проведена рентгеноскопия. След потвърждение на правилната позиция, той беше фиксиран чрез освобождаване на хеликса в предсърдния миокард. Параметрите на сензинг, стимулация и съпротивление бяха измервани с PSA анализатора, като электродът беше фиксиран с нерезорбируема лигатура към пекторалната фасция.

За оптимални параметри бяха приети следните стойности:

- Сензинг на предсърдие над 1 mV.
- Праг на стимулация под 1 V при ширина на импулса 0.5 ms.
- Съпротивление между 400 и 1000 Ома при ширина на импулса 0.5 ms.

За камерния електрод, оптималните параметри бяха следните:

- Сензинг на камерата над 2,5 mV.
- Праг на стимулация под 1 V при ширина на импулса 0.5 ms.
- Съпротивление между 400 и 1000 Ома при ширина на импулса 0.5 ms.

Електродите бяха свързани с пулсгенератора, който беше поставен в предварително оформен джоб подключично в препекторалното пространство. Оперативната рана беше затваряна слой по слой с резорбируем конец и интрадермален шев, след което беше приложена суха стерилна превръзка. Имплантираните устройства бяха на фирма Medtronic - Sphera DR MRI SureScan, а електродите - CapSure Fix Novus MRI SureScan, с дължини съответно 52 мм и 58 мм за предсърдие и камера.

След всяка имплантация и преди напускането на болницата, пациентите бяха подлагани на телеметрия с цел потвърждаване на оптималните параметри на електродите и програмиране на устройствата в режим DDDR. На всяка последваща визита, проведени на 6-та, 12-та и 24-та седмици след имплантацията, се извършваше телеметрия на кардиостимулаторите, за да се търсят данни за дисфункция на устройствата. Не бе регистрирана такава дисфункция при нито един от участниците. Също така бе проверен процентът на постоянна деснокамерна стимулация, който се оказа над 80% при всички пациенти, включени в изследването.

4. Получаване и съхраняване на пробите

За изследването на показателите се използваше венозна кръв, която се вземаше след убождане на периферна вена (лява или дясна кубитална вена). Обемът на кръвта, взет за всяка кръвна проба, беше 8 мл и се разпределяше в два серумни вакутейнера по 4 мл всеки. При пациентите се вземаха кръвни проби трикратно - преди имплантацията на ПЕКС (начална стойност), след 12-та и 24-та седмици след имплантацията. Кръвни

проби от контролната група също се вземаха трикратно - в началото, след 12-та и 24-та седмици след включването им в проучването.

След вземането на кръвните проби, те бяха оставяни на статив за 3 часа при температура от 22°C, след което бяха центрофугирани при 3500 оборота за 15 минути. Серумът, който се отделяше, се прехвърляше в пластмасови епруветки. За всеки показател се отделяха по две епруветки - една за изследване и една като резерва, след което бяха замразявани на -20°C. Събраните и замразени проби се транспортираха в сух лед в рамките на 1 месец след вземането им и след това бяха съхранявани при температура -70°C, където оставаха до шест месеца.

При изпълнението на изследванията не беше позволено размразяване и повторно замразяване на пробите.

Всички проби бяха кодирани непосредствено след получаването им. Този процес предотвратяваше тяхната идентификация по време на лабораторното изследване (контролна или пациентска проба), както и определението на деня на вземане на пробата.

5. Изследвани показатели и лабораторни методи

При всеки участник в проучването (пациент или контрола) в серум бяха изследвани общо четири показателя отразяващи фиброзната активност: две сигнални молекули и два маркера за колагенов синтез.

В серум бяха определени нивата на сигналните молекули TGF- β 1 и CTGF, както и маркерите за колагенов синтез PICP и PINP. Изследването на пробите се проведе в Медико-Диагностичната лаборатория "Липогард" в София.

В пациентската група показателите за фиброзна активност бяха определени трикратно - непосредствено преди имплантацията на ПЕКС (начална стойност или визита 1 - V1), на 12-та седмица (визита 2 - V2) и 24-та седмица (визита 3 - V3) след имплантацията на ПЕКС.

В контролната група се изследваха същите показатели трикратно - изходно (визита 1 - V1), на 12-та седмица (визита 2 - V2) и 24-та седмица (визита 3 - V3) след селектирането им за проучването.

Всеки показател беше определен трикратно, като средната стойност от трите измервания беше взета предвид при изчисляване на резултатите.

За целите на проучването беше извършено ехокардиографско определяне на теледиастолния и телесистолния обем на лявата камера, откъдето се изчисли фракцията на изтласкване по метода на Simpson. Този метод е общоприет за оценка на

левокамерната помпена функция съгласно актуалните препоръки (Lang et al., 2015). Също така беше измерен телесистолния обем на лявото предсърдие от апикална четирикухинна позиция, също по метода на Simpson. Обемът на лявото предсърдие се използва като косвен маркер за оценка на теледиастолното налягане на лявата камера и въздействието на деснокамерната апикална стимулация върху хемодинамиката (Nagueh et al., 2016). Получените стойности бяха индексирани към телесната повърхност на пациентите и след това бяха подложени на статистическа обработка. Всички използвани методи на ехокардиографски измервания, се придържаха към актуалните препоръки за оценка на сърдечните кухини, описани в European Association of Cardiovascular Imaging (Lang et al., 2015). За да се оцени ранният ефект на възстановената атриовентрикуларна синхронност след преодоляване на проводното нарушение с двукамерен кардиостимулатор, беше извършено допълнително ехокардиографско изследване на пациентската група 6 седмици след имплантацията, което се кодира като визита 1.1.

На всяка визита в пациентската група беше регистрирана повърхностна ЕКГ с цел да се проследи ширината на QRS комплекса. Това имаше за цел да се оцени електрическото активиране на миокарда в режима на двукухинен кардиостимулатор и да се анализира предизвиканата асинхронност.

5.1. Определяне на TGF- β 1

Нивата на TGF- β 1 бяха определени чрез метода на ELISA (ензимно-свързаният имуносорбентен анализ), като за целта бяха използвани китове на фирма "MyBioSource" за Human TGF- β 1 Sandwich – ELISA със следните характеристики: сензитивност 10 pg/ml и зона на детекция 62.5 pg/ml – 4000 pg/ml.

Принципът на метода е следният:

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) е метод, основан на ензимно свързани антитела. Този метод позволява качествено и количествено определяне на специфични протеини в сложни биологични проби. Методът беше първоначално описан от Engvall и Perlmann през 1971 година (Engvall & Perlman, 1971).

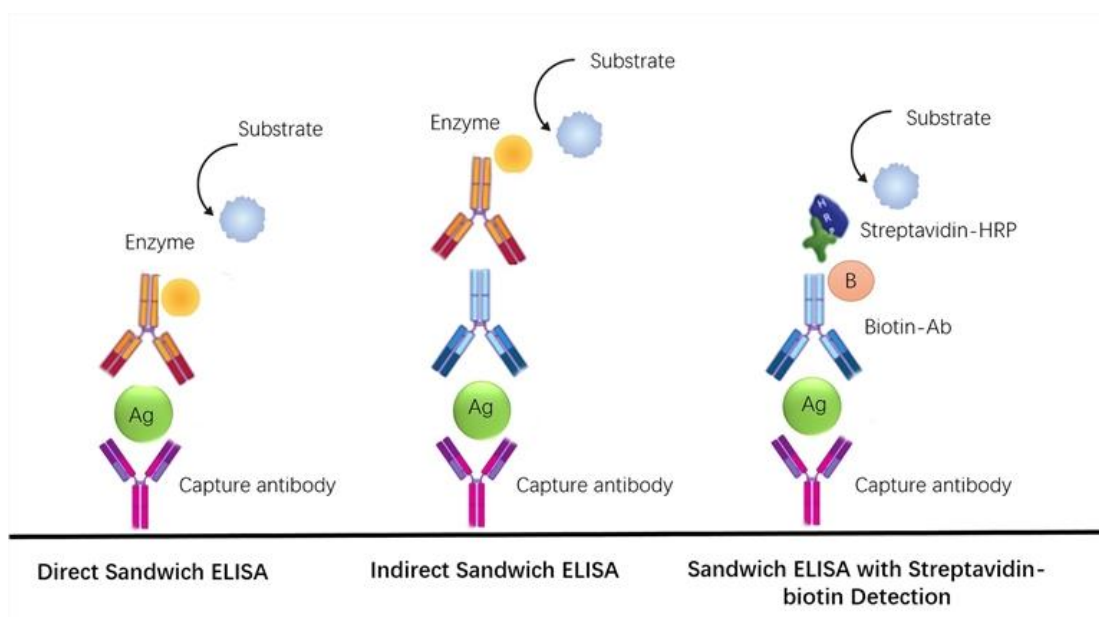
ELISA има различни формати, като най-често срещаният е "сандвич" формат (Crowther, 2009) (Фигура 1). В този формат антителата улавят антигена, който се намира в пробата. След това се използва второ антитяло, белязано с ензим, което да разпознае и засече формирания комплекс.

Процедурата обикновено включва следните стъпки:

1. Подготовка на пробите и изолиране на антигена (в този случай TGF- β 1).

2. Антителата, които специфично разпознават TGF- β 1, се добавят към пробата. Те могат да бъдат анти-TGF- β 1 антитела, които се адсорбират към повърхността на лабораторния съд.
3. Ако TGF- β 1 присъства в пробата, този антиген ще бъде уловен от антителата и образува комплекс.
4. Второ антитяло, беязано с ензим, което разпознава антиген-антитяло комплекса, се добавя.
5. След добавянето на субстрат, ензимът променя цвета му, което се измерва със спектрофотометър.
6. Измерването на цветната промяна се използва за определяне на концентрацията на TGF- β 1 в пробата.

Този метод е предпочитан поради високата си сензитивност и специфичност, и е често използван в молекулярната и клетъчната биология, както и в медицинските изследвания за определяне на концентрацията на различни биомаркери в биологични проби.



Фиг. 1. Схема на ELISA методите (no Thermo Scientific, 2010)

За проучването беше използвана плочка с 96 клетки, предварително покрита със специфично антитяло за Human TGF- β 1. Пробите от серума за изследване бяха добавени в клетките, където наличният TGF- β 1 се свързваше с имобилизиращите антитела. След това плочката беше промита с буферен разтвор, след което бяха добавени биотин-маркирани антитела за Human TGF- β 1. След допълнително изплакване на несвързаните антитела с буферен разтвор, към плочката беше добавен стрептавидин, свързан с HRP

(horseradish peroxidase). След последователно промиване на аналитичната плочка, беше добавен разтвор на ТМВ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine ; 3,3',5,5'-тетраметилбензидин). Този разтвор променя цвета си в синьо при окисление, което настъпва в резултат на образуването на кислородни радикали, генерирани от хидролизата на хидрогенпероксида от HRP.

Цветът на ТМВ разтвора се променя в жълто при добавяне на сярна или фосфорна киселина (стоп-разтвор). След добавяне на стоп-разтвора, спектрофотометричен анализ беше извършен на 450 нм в рамките на 30 минути. За целите на този дисертационен труд, оптичната плътност беше измервана двукратно, а концентрациите бяха изчислявани с помощта на софтуера на ELISA четеца, използвайки стандартни криви, получени от разредените стандарти.

5.2. Определяне на CTGF

Нивата на CTGF бяха определени чрез метода ELISA (Engvall & Perlmann, 1971), използвайки китове OmniKine на фирма "MyBioSource" за Human CTGF Sandwich – ELISA със зона на детекция от 63 pg/ml до 4000 pg/ml. Преди началото на анализа, серумните проби бяха разредени в съответствие с инструкциите на производителя. Процедурата за изследване е описана по-горе.

5.3. Определяне на PICP

Нивата на PICP бяха определени чрез метода ELISA (Engvall & Perlmann, 1971), използвайки китове на фирма "MyBioSource" за Human PICP Sandwich – ELISA със сензитивност от 2.26 ng/ml и зона на детекция от 5 ng/ml до 1500 ng/ml. Преди началото на анализа, серумните проби бяха разредени в съответствие с инструкциите на производителя. Процедурата за изследване е описана по-горе.

5.4. Определяне на PIIINP

Нивата на PIIINP бяха определени чрез метода ELISA (Engvall & Perlmann, 1971), използвайки китове на фирма "MyBioSource" за Human PIIINP Sandwich – ELISA със сензитивност от 1.0 ng/ml. Преди началото на анализа, серумните проби бяха разредени в съответствие с инструкциите на производителя. Процедурата за изследване е описана по-горе.

6. Електоркардиографски и ехокардиографски методи

При всяка визита на селектираните за изследването пациенти беше регистрирана повърхностна ЕКГ с употреба на апарата SCHILLER CARDIOVIT AT-1 G2 (произведен през януари 2013 г. от Schiller Americas, Inc.) със скорост на записа от 25 мм/сек и амплитуда на калибровка от 10 мм/1 mV. От направения запис се измери ширината на QRS комплекса на 5 последователни съкращения, и средната стойност беше взета и включена в статистическия анализ.

На пациентите при всяка визита беше проведено ехокардиографско изследване с помощта на апарата GE Healthcare Vivid S6 (произведен през септември 2013 г. от GE Medical Systems, Israel Ltd.). В контролната група ултразвуковото изследване беше извършено само по време на включващата визита. Всички измервания бяха извършени в съответствие с актуалните препоръки за оценка на сърдечните структури и функции, както и с инструкциите за провеждане на клинично ехокардиографско проучване, предложени и описани от European Association of Cardiovascular Imaging (Lang et al., 2015).

За определяне на обемите на лявата камера беше използван методът на двуразмерното сумиране на дискове, съобразно правилата на метода на Simpson. За тази цел, границата между ендокарда и левокамерната кухина беше очертавана от апикалната четирикухинна и двукухинна позиция на трансдюзера, съответно по време на теледиастолата и телесистолата. Образите, използвани за анализ, трябваше да бъдат с добро качество, включително папиларните мускули и трабекуларизацията към обема на лявата камера. Така определените теледиастолен обем (ТДО, LVEDV- left ventricle end diastolic volume) и телесистолен обем (ТСО, LVESV- left ventricle end systolic volume) бяха индексирани спрямо телесната повърхност и след това беше изчислена фракцията на изтласкване по следната формула: $EF = (EDV - ESV) / EDV$.

Крайният систолен обем на лявото предсърдие (LAVI- left atrial volume index) беше измерен от апикалната четирикухинна позиция с помощта на метода на Simpson и също беше индексиран спрямо телесната повърхност на индивида. За дефиницията на намалена фракция на изтласкване се взема стойност под 50 %, както е препоръчано от Lang et al. (2015). За определение на увеличен обем на лявото предсърдие се използва стойност над 34 мл/м², препоръчано в същата референция.

7. Статистически анализ - използвани методи

Статистическият анализ на данните беше извършен с помощта на специализирания софтуер STATISTICA 13.3.0, разработен от StatSoft Inc., USA (StatSoft, Inc., STATISTICA Manual (Data analysis software system), Version 11.0, 2018). При изпълнението на статистически хипотези, нивото на значимост беше зададено на $p=0.05$. Това представлява вероятността за допускане на грешка от първи род, което означава, че нулевата хипотеза може да бъде отхвърлена, дори когато тя е вярна, с вероятност 5%.

Резултатите бяха представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение ($\pm$ SD) или n (%), в зависимост от характера на данните.

За целите на настоящото дисертационно изследване бяха приложени следните статистически методи:

7.1. *Дескриптивна статистика*

Тя беше използвана за изчисляване на средни стойности при n наблюдения в

извадката $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$, стандартни отклонения $SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$, стандартни

грешки на средната $SE = \frac{SD}{\sqrt{n}}$, относителни дялове и 95% доверителни интервали (Jobson, 1991). Дескриптивната статистика дава количествено описание на основните свойства и характеристики на изследваната популация. В табличен вид беше представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване, средните стойности и стандартните грешки.

7.2. *Тест на Стюdent (t-критерий) за две независими извадки*

В нашето изследване беше използван двустранен t-тест за независими (несдвоени) извадки. *t-тестовете са* ефективен начин да се провери хипотезата за равенство на средните стойности на две зависимы или независими извадки (Guo & Yuan, 2017). *t*-статистиките са въведени от ирландския математик Willian S. Gosset (1876-1937) през 1908г., когато той публикува трудовете си в списание Biometrika под псевдонима Student. Тестването на хипотези за равенство на средни стойности и на показатели за относителен дял беше направено чрез така именувания *t*-критерий на Стюdent.

При получаване на стойности $p < 0.05$ се отхвърля хипотезата за равенство на средните и се потвърждава хипотезата, че разликата между средните е статистически значима.

7.3. Тест на Стюдент (*t*-критерий) за две зависими извадки

Зависими извадки са тези, при които единиците от едната извадка предопределят тези във втората. Типичен случай са изследванията за сравняване на променливи преди и след някакво въздействие.

Проверява се верността на нулевата и алтернативната й статистическа хипотеза:

H_0 : Разликата d между средните стойности на двете извадки е равна на нула

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

т.е. няма значима разлика между резултатите преди и след.

Издига се и алтернативна хипотеза:

H_A : Разликата d между средните стойности на двете извадки е различна от нула

$$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$$

т.е. има статистически значима разлика между резултатите преди и след.

Проверката се извършва с помоща на Стюдентов *t*-критерий с $(N - 1)$ степени на свобода (df), където N броят на данните в извадките при ниво на значимост α (p-level), което най-често се избира $\alpha = 0,05$. Пресмятат се разликите между съответните измервания в извадките $d_i (i = 1, 2, \dots, N)$, $\bar{d}$ на тези разлики

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^N d_i}{N}$$

и стандартното отклонение на тези разлики:

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (d_i - \bar{d})^2}{N - 1}}.$$

Проверяваната статистика е

$$t = \frac{\bar{d}}{S_d \sqrt{N}}, \nu = N - 1$$

Ако стойността ѝ е

$$t < -t_{\frac{\alpha}{2}}(v) \quad \text{или} \quad t > t_{\frac{\alpha}{2}}(v)$$

то нулевата хипотеза се отхвърля с ниво на значимост α .

7.4. Анализ на мощността (Power analysis) на даден тест за обем на извадката

Съществена характеристика на дадена извадка е нейния обем. Изменението в обема води до пропорционално увеличаване или намаляване на честотите на срещане на отделни стойности. Въпросът за обема на извадката е от изключителна важност, защото от това зависи достоверни ли ще са направените изводи от статистическия анализ. Тъй като няма правило за това е необходимо да се проведе Power analysis (анализ на мощността) на прилагания тест по предварителни данни, които да ни ориентират в необходимия размер на извадките (Suresh & Chandrashekar, 2012)

В дисертационния труд беше направен анализ на мощността на t-критерий за отклоненията във фиброзните показатели при изследваните групи.

7.5. Регресионен анализ

Регресионният анализ изучава и оценява възможните функционални зависимости между две или повече случайни величини, чиито стойности са реални числа (Schober & Vetter, 2021). Той е статистически метод за изследване на наличие на взаимовръзка между една променлива (отговора) и една или повече независими променливи (предиктори, аргументи, факторни променливи). Получената функция се нарича модел, представящ отговора като функция на независимите променливи. При установена статистическа значимост (адекватност) на модела той се използва за прогнозиране на стойността на зависимата променлива при стойности на факторната променлива, които не са наблюдавани в извадката.

Регресионният анализ служи за моделиране на зависимостта на един зависим (резултативен) признак от един или няколко фактор-признаци (независими променливи), като не се отчита, че изменението на разглежданите величини може да се дължи на външни, невключени в модела признаци. Когато независимата променлива е една, говорим за едномерен регресионен анализ, а ако независимите променливи са повече – за многомерен. Когато резултативната променлива зависи от два или повече фактора

(независими променливи), се прилага многомерен регресионен анализ. В регресионния анализ зависимата променлива винаги е една.

При едномерния анализ зависимостта между две променливи, в най-общия случай, се изразява с уравнението:

$$y = f(x),$$

където y е зависима променлива (функция от x), а x е независима променлива (аргумент). Изменението на функцията в зависимост от изменението на аргумента се нарича регресия. Съответствието между x и y може да бъде представено с:

- Уравнение на регресията с регресионни коефициенти
- Графично – с линия на регресия

7.5.1. Линейна регресия

За изследване на (евентуална) линейна зависимост между една зависима променлива (y) и една или повече независими ($x_1, x_2, \dots, x_n$) променливи се използва методът на линейната регресия. Проста линейна регресия се прилага при наличие на един предиктор (една независима променлива), а при два и повече – съответно двумерна и многомерна. Уравнението на линейния регресионен модел в този случай е:

$$y(x) = b_0 + b_1 x,$$

където b_0 е константа (свободен член в регресионното уравнение), а b_1 е регресионен коефициент, показващ с колко единици се изменя зависимата променлива при изменение на факторната променлива с една нейна мерна единица. На базата на данните на извадката се пресмятат оценки на тези коефициенти по метода на най-малките квадрати. За статистическата значимост на оценените коефициенти $\hat{b}_0$ и $\hat{b}_1$ на регресионното уравнение се тестват нулеви хипотези $\hat{b}_0 = 0$ и $\hat{b}_1 = 0$ като се използва критерий на Фишер със степени на свобода в числителя и знаменателя съответно $(1, n-2)$, където n е броят на данните в извадката. При p -стойност на критерия по-малка от 0.05 се отхвърлят нулевите хипотези и коефициентите се приемат за статистически значими.

Проверка за адекватност на линейния регресионен модел

Адекватността на построенния линеен регресионен модел се прави чрез стойностите на корелационния коефициент r .

- Коефициент на корелация r

Стойностите на r се изменят в интервала $[-1;1]$ и определят силата на линейната корелация:

$|r| < 0.3$ – слаба зависимост;

$0.3 \leq |r| \leq 0.7$ – добра зависимост;

$|r| > 0.7$ – силна зависимост.

Знакът на r показва вида на зависимостта. При $r > 0$ е налице положителна корелация, наличие на растяща линейна зависимост т.е. с нарастване стойностите на x , нарастват стойностите на y . При $r < 0$ се установява отрицателна корелация или намаляваща линейна зависимост т.е. с нарастване стойностите на x , намаляват стойностите на y . При $r = 0$, величините са корелационно независими.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Демографска и клинична характеристика на участниците в изследването

На Таблица 1 е представена демографската характеристика на пациентската и контролната групи.

Табл. 1. Демографска характеристика на пациентска и контролна групи

	Пациентска група	Контролна група	Р стойности
Брой участници в група	45	46	>0.05
Средна възраст (години)	72.18 ± 1.35	71.96 ± 1.29	>0.05
Мъже/Жени	25/20	24/22	>0.05
ВМІ (kg/m ²)	27.45 ± 0.64	26.51 ± 0.49	>0.05

Както е видно от стойностите с $p > 0.05$, между тях нямаше статистически значими различия по отношение на броя включени участници, възрастовата и полова структура, както и ВМІ ($p > 0.05$) (Таблица 1).

Табл. 2. Клинична характеристика на пациентска и контролна група; Приемана медикаментозна терапия след селектиране за включване в проучването.

	Брой пациенти (%)	Брой контроли (%)	Р стойност
Придружаващи заболявания			
Хипертонична болест	39 (86.66 %)	37 (80.43%)	>0.05
Антихипертензивна терапия			
Метилдопа	23 (51.11%)	24 (52.17%)	>0.05
Амлодипин	35 (77.78%)	33 (71.74%)	>0.05
Хидрохлоротиазид	35 (77.78%)	35 (76.09%)	>0.05

По отношение на съпътстващите заболявания и в пациентската и контролната група беше допуснато наличие само на до I степен добре контролирана артериална хипертония. Относно медикаментозното лечение всички участници бяха лекувани с медикаменти, за които няма данни за влияние върху фиброзния отговор и колагеновия синтез (Таблица 2).

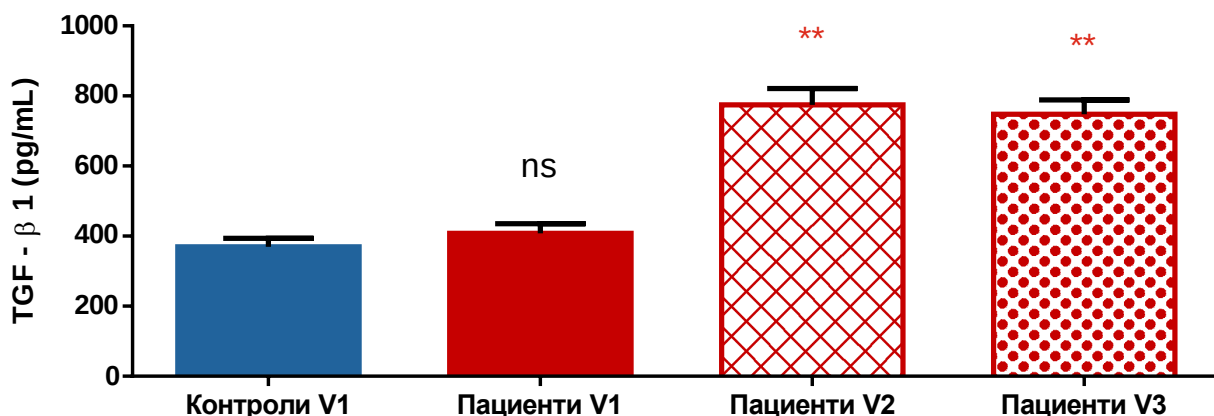
Изравняването на групите по представените по-горе демографски и клинични характеристики беше включено в дизайна на проучването (вижте "Материали и

методи"). Това осигури баланс между групите и обективно сравнение на получените данни.

2. Отклонения в показателите на фиброзната система

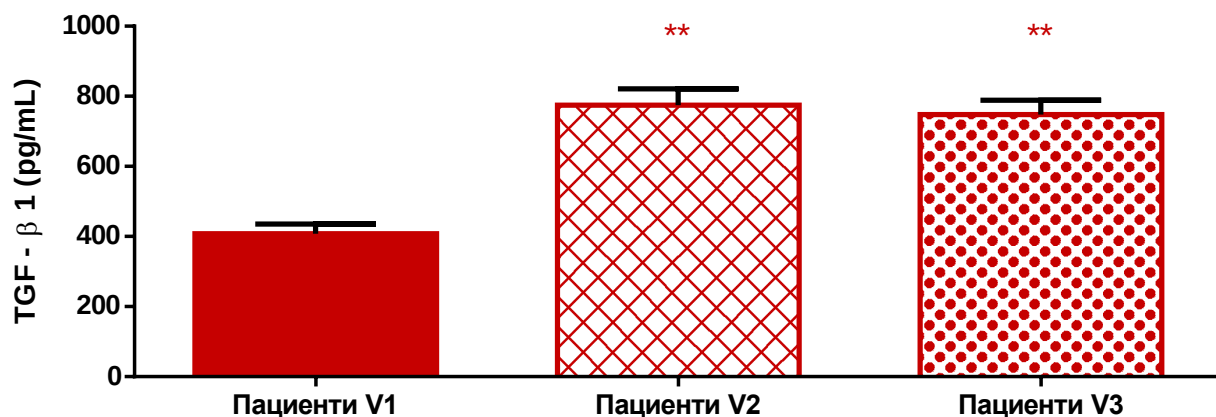
2.1. Отклонения в сигналните молекули: TGF- β 1 и CTGF

Фигура 2 представя липсата на статистически значима разлика между изходните стойности на TGF- β 1 в пациентската (пациенти V1) и контролната групи (контроли V1) (407.69 ± 27.36 pg/ml vs 369.97 ± 24.20 pg/ml; $p > 0.05$). На 12 седмица (пациенти V2) след имплантацията на ПЕКС бяха установени сигнификантно повишени стойности спрямо изходните в контролната група (Фигура 2) (774.18 ± 47.41 vs 369.97 ± 24.20 pg/ml, $p < 0.001$). На 24 седмица значимото покачване на изследвания показател при пациентите (пациенти V3) персистираше спрямо изходните при контролите (V1) (748.28 ± 40.76 vs 369.97 ± 24.20 pg/ml, $p < 0.001$) (Фигура 2).



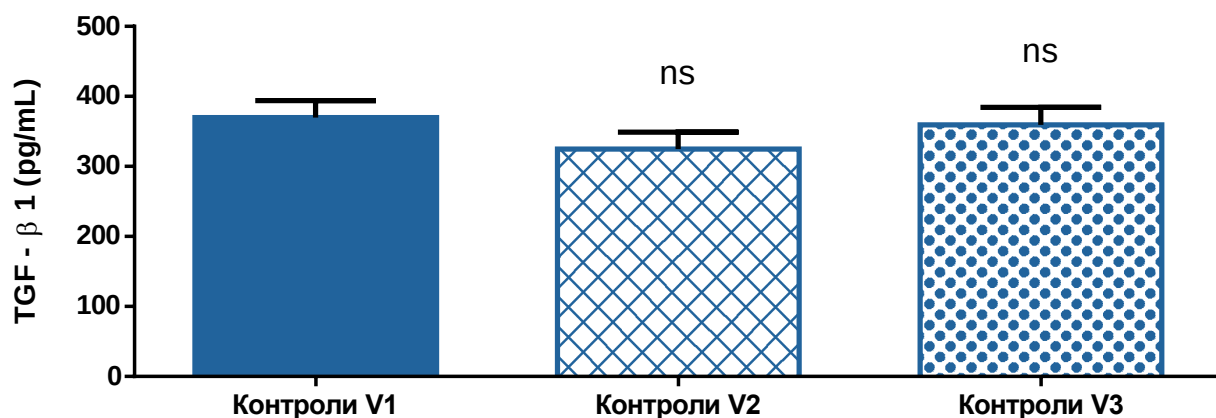
Фиг. 2. Съпоставяне на стойностите на TGF- β 1 при пациенти спрямо изходните стойности на показателя в контролната група (Контроли V1) (пациенти V1- изходни стойности; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС) (*- $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$; ns- статистически незначима разлика)

При проследяване на стойностите в пациентската група става ясно, че на 12 седмица (пациенти V2) след имплантацията на ПЕКС повишените нива на TGF beta 1 бяха достигнали статистически достоверност спрямо изходните (пациенти V1) (774.18 ± 47.41 vs 407.69 ± 27.36 pg/ml, $p < 0.001$) (Фигура 3). На 24 седмица сигнификантното повишение на стойностите (пациенти V3) беше се задържало, спрямо изходните (пациенти V1) (Фигура 3) (748.28 ± 40.76 vs 407.69 ± 27.36 pg/ml, $p < 0.001$).



Фиг. 3. Динамика на нивата на TGF-β1 в пациентската група. (пациенти V1- изходни стойности на показателя; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; *- $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$; ns- статистически незначима разлика)

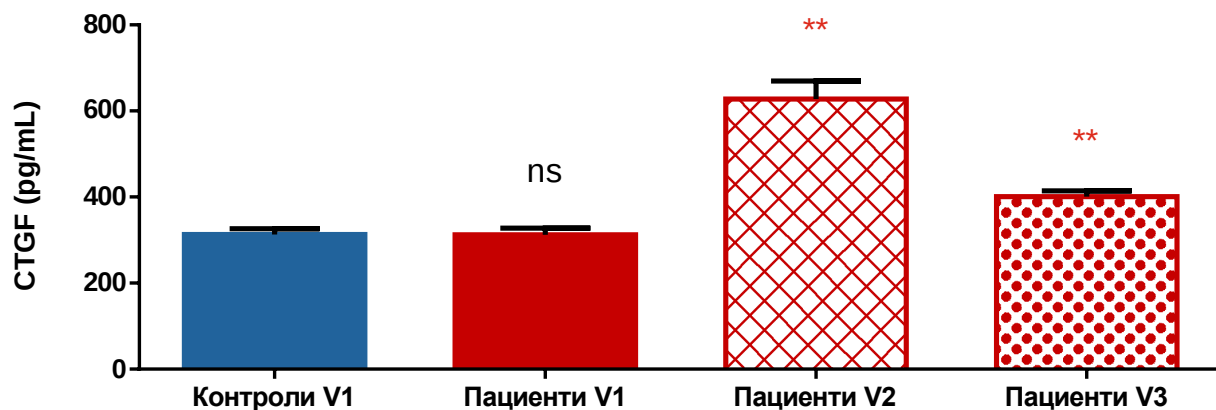
От проведеното изследване на TGF-β1 в контролната група не се установиха значими промени в плазмените нива на показателя по време на периода на проследяване. Не беше установена съществена разлика между стойностите на показателя от втората и третата визита спрямо началните (324.83 ± 23.94 vs 369.97 ± 24.20 pg/ml; 359.55 ± 24.80 vs 369.97 ± 24.20 pg/ml, $p > 0.05$) (Фигура 4). Въпреки че не е представено на фигура 4, стойностите на показателя баха съпоставени и между трета и втора визита, като не беше установена значима разлика (359.55 ± 24.80 vs 324.83 ± 23.94 pg/ml, $p > 0.05$).



Фиг. 4. Динамика в нивата на TGF-β1 в контролната група: (контроли V1 - изходни стойности на показателя; контроли V2 – стойности на 12 седмица след включване в проучването; контроли V3 – стойности на 24 седмица след включване в проучването. ns- статистически незначима разлика)

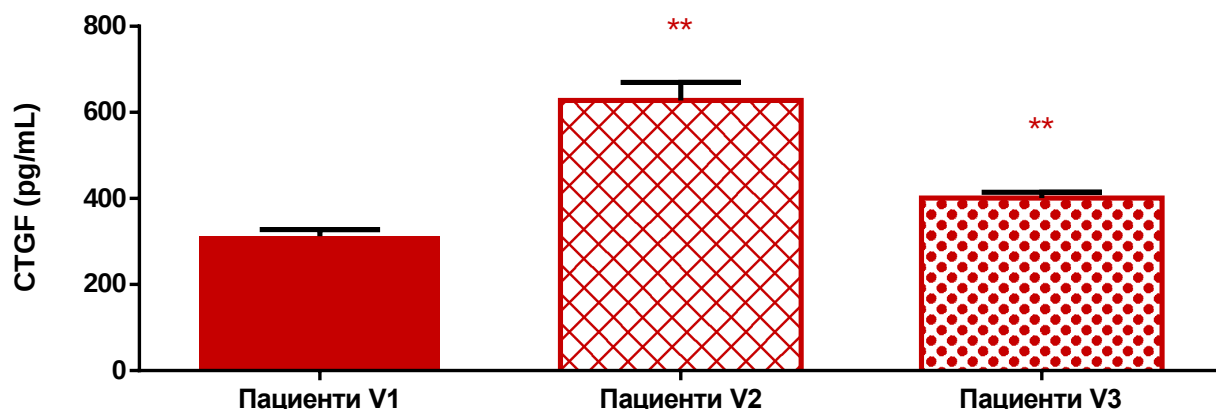
На фигура 5 се вижда, че няма сигнификантна разлика между изходните стойности на CTGF между пациенти (пациенти V1) и контроли (контроли V1) (312.66 ± 15.25 vs 313.05 ± 12.98 $p > 0.05$). На 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС в пациентската група (пациенти V2) беше установено сигнификантно повишени стойности спрямо изходните стойности в контролната група (Фигура 5) (627.74 ± 41.81 vs 313.05 ± 12.98

pg/ml $p<0.001$). На 24-та седмица след имплантацията повишението на проследявания параметър при пациентите (пациенти V3) беше се задържало на статистически значимо по-високи нива спрямо изходните при контролите (контроли V1) (400.83 ± 13.29 vs 313.05 ± 12.98 pg/ml $p<0.001$) (Фигура 5).



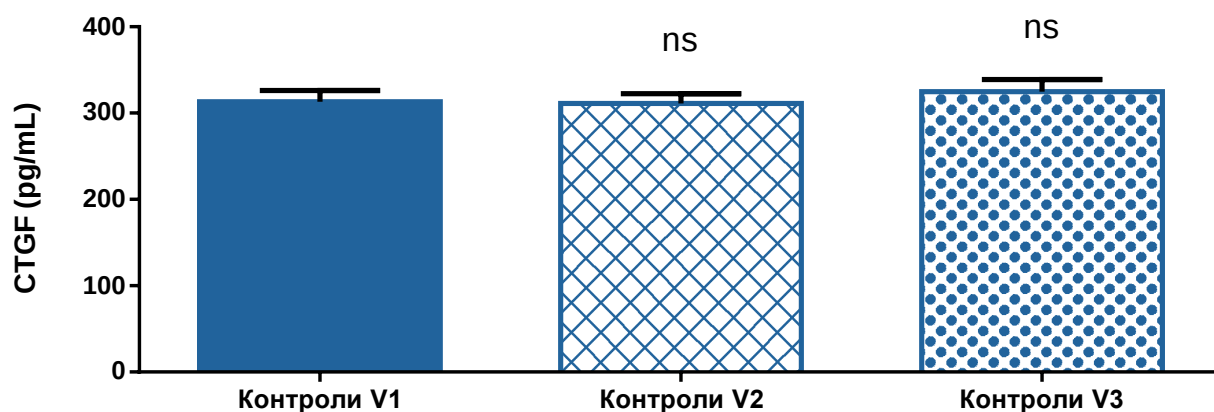
Фиг. 5. Съпоставяне на стойностите на CTGF при пациенти спрямо изходните стойности на показателя в контролната група (Контроли V1) (пациенти V1- изходни стойности; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; *- $p<0.05$; ** - $p<0.001$; ns- статистически незначима разлика)

При проследяване на стойностите на CTGF в пациентската група на 12-та седмица (пациенти V2) след имплантацията на ПЕКС беше установено повишаване на стойностите спрямо изходните (пациенти V1) (Фигура 6) (627.74 ± 41.81 vs 312.66 ± 15.25 pg/ml, $p<0.001$). На 24-та седмица след имплантацията нарастването на нивата на CTGF при пациентите (V3) се бяха задържали сигнификантно по-високи спрямо изходните (пациенти V1) (Фигура 6) (400.83 ± 13.29 vs 312.66 ± 15.25 pg/ml, $p<0.001$).



Фиг. 6. Динамика на нивата на CTGF в пациентската група: (пациенти V1- изходни стойности на показателя; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; *- $p<0.05$; ** - $p<0.001$; ns- статистически незначима разлика)

В контролната група не бяха настъпили значими промени в плазмените нива на показателя по време на периода на проследяване. Не беше установено съществено различие между стойностите на показателя от втора и трета визита спрямо изходните (311.02 ± 11.47 vs 313.05 ± 12.98 pg/ml; 324.74 ± 14.20 vs 313.05 ± 12.98 pg/ml $p > 0.05$) (Фигура 7). Въпреки че не е представено на фигура 7, не беше установена значима разлика в нивата на проследяващите трета и втора визита (324.74 ± 14.20 vs 311.02 ± 11.47 pg/ml, $p > 0.05$).



Фиг. 7. Динамика в нивата на CTGF в контролната група: (контроли V1 - изходни стойности на показателя; контроли V2 – стойности на 12 седмица след включване в проучването; контроли V3 – стойности на 24 седмица след включване в проучването. ns- статистически незначима разлика)

Абнормната активация на сърцето в резултат на апикална деснокамерна стимулация се свързва с промени в миокардния метаболизъм и перфузия (Tse & Lau, 1997). Това е доказано както в клинични, така и в предклинични проучвания, където се установяват регионални различия в коронарния кръвоток, глюкозната утилизация и кислородната консумация от кардиомиоцитите по време на деснокамерно стимулиране (Lee et al., 1994; Prinzen et al., 1990). Тези промени водят до дезорганизация на миофибрилите, отлагане на дистрофични калцификати, както и хетерогенност в митохондриалната функция. Пейсмейкър индуцираната левокамерна дисфункция води до миокардна хипертрофия в по-късно активираните зони, като резултат от локално механично натоварване и редистрибуция на симпатиковите нервни окончания (Simantirakis et al., 2001; Prinzen et al., 1995). Чрез процеса на механотрансдукцията кардиомиоцитите улавят тези регионалните промени в натоварването, като реагират със структурни и биохимични промени (Lee & Libby, 2000). Този процес води до трансфериране на интрацелуларни стимули от клетъчната мембрана до клетъчното ядро чрез фосфорилиране на редица сигнални протеини (Tamada et al., 2009; Wang et al., 2009). Молекули като интегрините, кадхерините и титините играят ролята на механосензори за

екстрацелуларни, интерцелуларни и интрацелуларни стимули, като така провокират адаптивен отговор към конкретния дразнител (McCain & Parker, 2011; Curtis & Russell, 2011). В резултат на промяната в механиката на сърдечната контракция вследствие на апикалната деснокамерна стимулация се провокира активиране на сигнални пътища, които влияят на фиброзния отговор и ремоделирането на ЕЦМ (Gopalan et al., 2003). По време на развитието на профиброзното състояние се наблюдава абнормна продукция на цитокини и растежни фактори, които водят до хронично активиране на фибробластите. В този процес участват множество сигнални молекули, като се смята, че TGF- β 1 играе водеща роля в отключването на тази каскада (Verrecchia & Mauviel, 2002). Суперсемейството на TGF- β взаимодейства с TGF-тип 1 и TGF-тип 2 рецепторите, които активират ефекторни протеини, известни като SMAD протеини. Те от своя страна играят централна роля в предаването на сигналите от рецепторите, разположени върху клетъчната мембрана, до специфични гени в клетъчното ядро (Kretzschmar et al., 1997). Също така е доказано, че основните гени, кодиращи синтеза на колаген в ЕЦМ, са директни цели на SMAD протеините (Verrecchia et al., 2001).

Друг важен фактор във фиброзния отговор е CTGF, като неговата експресия във фибробластите се контролира от TGF- β 1 с участието на SMAD ефекторния път (Holmes et al., 2001). Активирането на CTGF води до фибробластна пролиферация и повишено отлагане на колаген в ЕЦМ и има синергичен ефект с TGF- β 1. Както стана ясно, TGF- β 1 и CTGF вземат активно участие в активирането на фиброзен отговор при наличие на патологично състояние в миокарда (Zou et al., 2021).

Резултатите от нашето проучване показаха изключително ранно повишаване на нивата на TGF- β 1 в пациентската група още на 12 седмица след имплантацията на кардиостимулатор (Фигура 2 и Фигура 3). Това повишение е статистически значимо както спрямо изходните стойности при пациентите, така и спрямо изходните стойности при контролната група. При проследяване на CTGF също се установява сигнификантно повишение при пациентите на 12 седмица след процедурата (Фигура 5 и Фигура 6). Тези еднопосочни промени в нивата на изследваните от нас сигнални молекули вероятно се дължат на провокираното профиброзно състояние в миокарда в резултат на апикалната деснокамерна стимулация. За да се минимизира възможността допълнителни фактори да повлияят на фиброзната система в сърдечния мускул, в проследената от нас група пациенти се включиха само такива без сериозна придружаваща сърдечносъдова патология. *Това ни дава основание да предположим, че повишените нива на TGF- β 1 и CTGF са резултат от провокираната от апикалното пейсиране асинхронна сърдечна контракция.*

Данни от литературата сочат, че при развитие на миокардна дисфункция, сърдечните фибробласти продуцират TGF- β 1, като това води до развитие на интерстициална фиброза (Bujak & Frangogiannis, 2007). В *in vitro* условия, TGF- β 1 индуцира значително повишение на синтеза на колаген тип I и колаген тип III (Eghbali et al., 1991). Изследвания на хистологични проби от миокард показват, че колагеновата фракция в интерстициума намалява след имплантация на CRT и преодоляване на асинхронията от левия бедрен блок (D'Ascia et al., 2006). Също така, плазмените нива на TGF- β 1 намаляват на първата година след оперативното лечение при пациенти с аортна клапна стеноза и корелират с ремоделирането на лявата камера (Almendral et al., 2010; Villar et al., 2009). Категорична връзка между нивата на TGF- β 1 и асинхронната камерна контракция при ЛББ се установява от екипа на Osmancik et al. (2013) При проследяване на нивата на TGF- β 1 при пациенти с ЛББ с индикации за имплантация на CRT се установява намаляване на стойностите му в групата на респондерите на 6 месеца след имплантацията. Също така, установяват повишаването на този маркер в групата на нонреспондерите, като по-високите нива преди имплантацията на CRT се свързват с лоша прогноза при съответните пациенти. Подобни резултати показват изследвания при животински модели, където асинхронията при ЛББ се асоциира с асиметрична хипертрофия на свободната стена на ЛК и локално повишена експресия на CTGF (van Oosterhout et al., 1998; van Middendorp et al., 2017). Постоянната апикална деснокамерна стимулация води до подобни промени, като е установено повишаване на фиброзната активност в миокарда на латералната стена на лявата камера при експериментални животински модели (Lin et al., 2010).

С напредване на възрастта настъпват естествени промени в организма, и остаряването на фибробластите се свързва с повишени нива на TGF- β 1 (Tominaga & Suzuki, 2019). Некодиращата микро РНК (Non - coding microRNAs - miRNAs) е мощен регулатор на генната експресия и заема важно място в патофизиологията на редица сърдечни заболявания (Gebert & MacRae, 2019). Семейството на miR-29 е едно от първите miRNA семейства, свързани тясно с развитието на сърдечна фиброза. Те модулират колагеновия метаболизъм в перинфарктната зона при експериментални модели. Изследване на профила на miRNA при възрастни пациенти, загинали от внезапна сърдечна смърт (BCC) в резултат на първична миокардна фиброза, показва повишена експресия на miR-1468-3p (Lin et al., 2020). Също така, *in vitro* изследване на човешки сърдечни фибробласти показва, че повишаването на нивата на miR-1468-3p индуцира колагенова депозиция и клетъчната метаболитна активност, което води до повишена експресия на колаген тип I, CTGF и периостин. Анти-miR-1468-3p антагонизират

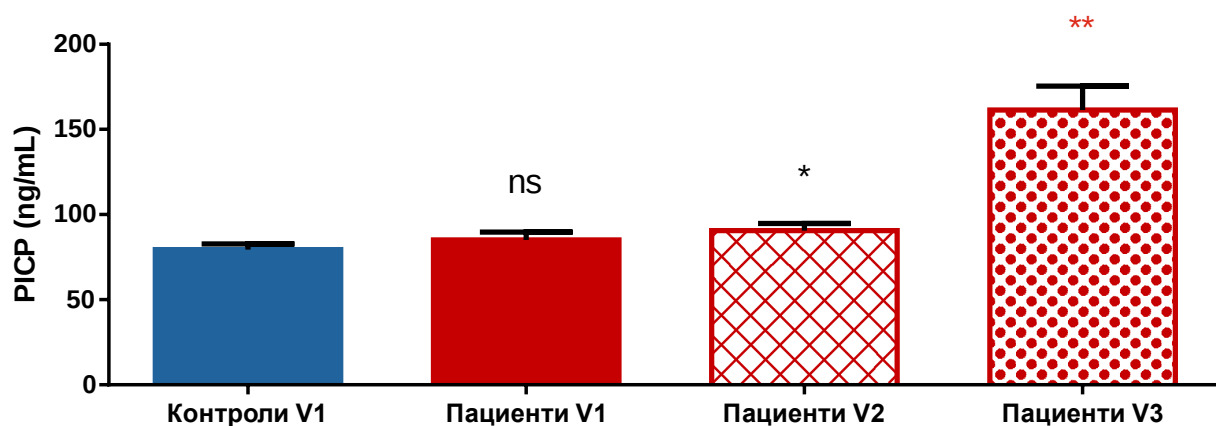
провокираната от TGF- β 1 колагенова депозиция и метаболитната активност. Това показва, че повлияването на нивата на miR-1468-3p при възрастни индивиди може да бъде начин за терапевтично повлияване на фиброзното отлагане в миокардния интерстиций.

Също така, има категорични данни, че плазмената активност на CTGF се увеличава с прогресирането на времето (Ungvari et al., 2017). Това беше и причината да проследим нивата на сигналните молекули TGF- β 1 и CTGF паралелно и в динамика както в пациентската, така и в контролната група. Резултатите ни показаха липса на сигнификантна промяна на тези параметри при проследяването им в контролната група (Фигура 4, Фигура 7). Това ни дава основание да заключим, че възрастовите промени в стойностите на тези сигнални молекули изискват по-дълъг период, като динамиката в показателите в пациентската група не се дължи на фактора време.

Резултатите от проследяването на двадесет и четвъртата седмица в пациентската група, проведено в нашето изследване, показаха, че нивата на TGF- β 1 (Фигура 2, Фигура 3) и на CTGF (Фигура 5, Фигура 6) остават значително повишени както спрямо изходните стойности при контролната група, така и спрямо изходните стойности при пациентите. *Разгледани в контекста на изложените по-горе литературни данни, тези резултати показват наличие на трайно профиброзно състояние, което се задържа до шест месеца след имплантацията на ПЕКС.*

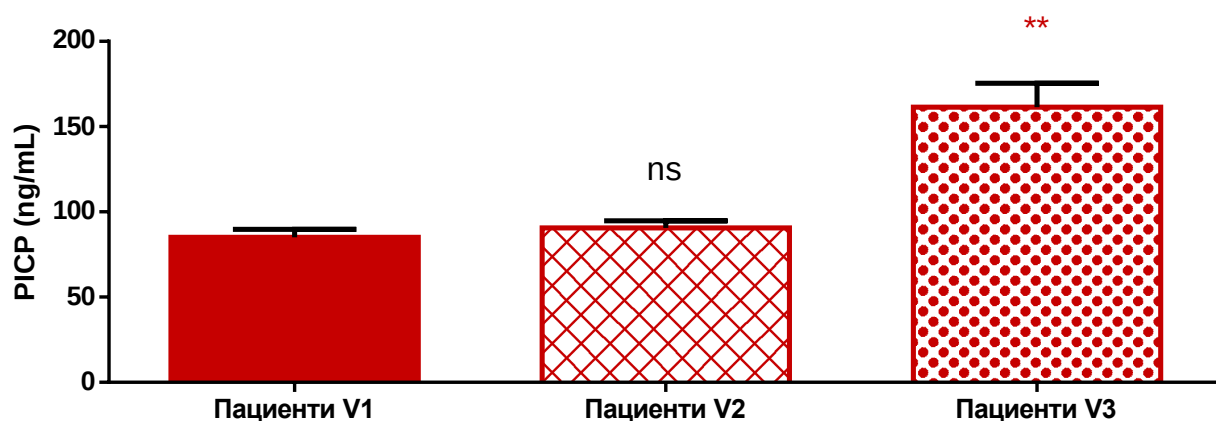
2.2. Отклонения в маркерите за колагенов синтез PICP и PIIINP

Изходните серумни нива при пациентите не се различаваха от тези на контролите, видно от фигура 8 (85.13 ± 4.68 vs 79.34 ± 3.49 ng/ml, $p > 0.05$). На 12-та седмица (пациенти V2) нивата на PICP бяха повишени сигнификантно спрямо тези на контролите (90.51 ± 4.28 vs 79.34 ± 3.49 ng/ml, $p = 0.0445$), като на 24-та седмица (пациенти V3) тенденцията на нарастване персистираше и нивата бяха значимо по-високи спрямо изходните при контролната група (161.35 ± 14.05 vs 79.34 ± 3.49 ng/ml, $p < 0.001$) (Фигура 8).



Фиг. 8. Съпоставяне на стойностите на PICP при пациенти спрямо изходните стойности на показателя в контролната група (Контроли V1) (пациенти V1- изходни стойности; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$; ns- статистически незначима разлика)

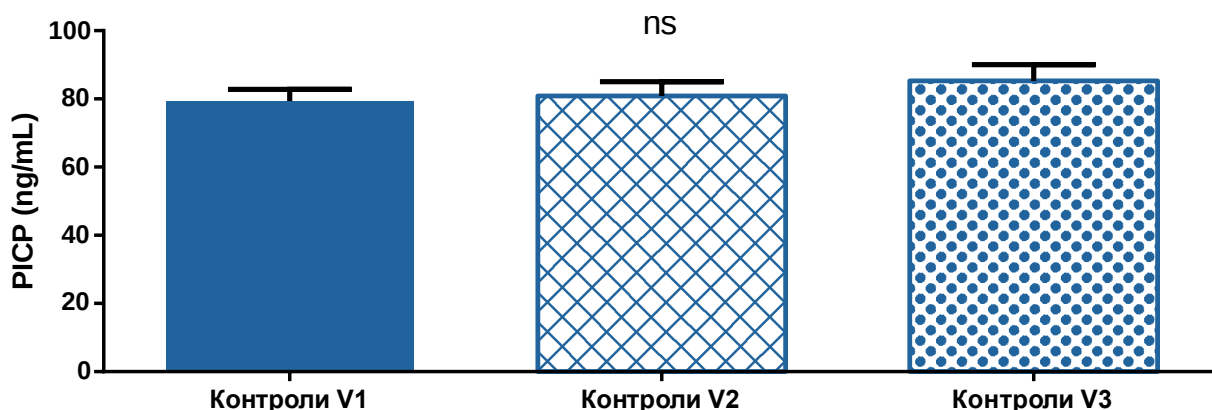
При сравняване на стойностите в пациентската група (фигура 9) се вижда, че на 12-та седмица (пациенти V2) нивата на PICP бяха се повишили спрямо изходните стойности (пациенти V1) (90.51 ± 4.28 vs 85.13 ± 4.68 ng/ml, $p < 0.05$), но това повишение не беше достигнало сигнификантна значимост. На 24-та седмица (пациенти V3) абсолютните стойности продължаваха да нарастват като вече бяха сигнификантно по-високи спрямо изходните нива (пациенти V1) (161.35 ± 14.05 vs 85.13 ± 4.68 ng/ml, $p < 0.001$).



Фиг. 9. Динамика на нивата на PICP в пациентската група: (пациенти V1- изходни стойности на показателя; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$; ns- статистически незначима разлика)

В контролната група не бяха настъпили значими промени в плазмените нива на този показател през целия период на проследяване. Не беше установено съществено различие между стойностите на показателя от втората и третата визита спрямо изходните (80.91 ± 4.14 vs. 79.34 ± 3.49 ng/ml, $p > 0.05$; 85.26 ± 4.75 vs. 79.34 ± 3.49 ng/ml, $p > 0.05$) (Фигура

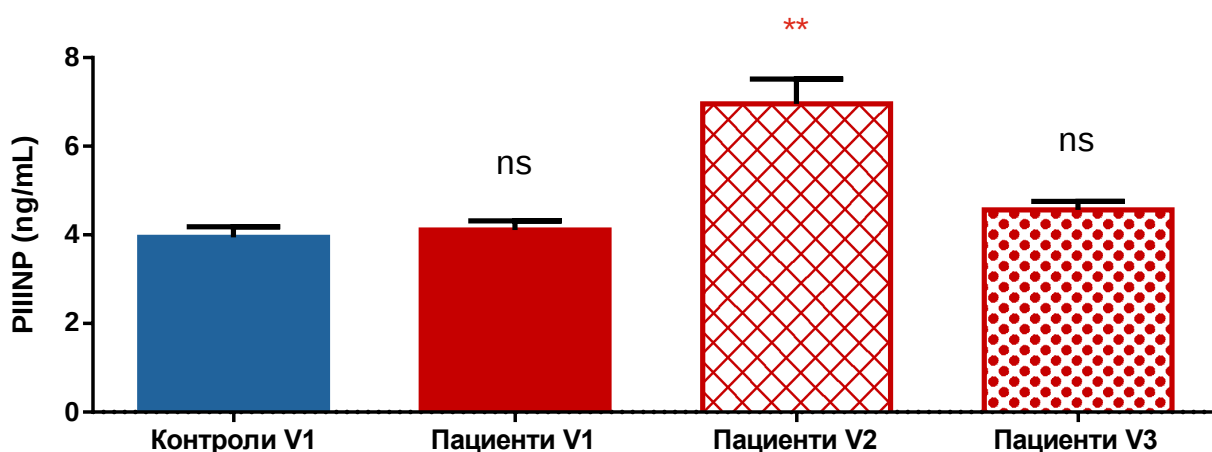
10). Също така, нямаше значима разлика в нивата на показателя между третата и втората визита въпреки, че не е отразено на фигура 10 (85.26 ± 4.75 vs. 80.91 ± 4.14 ng/ml, $p > 0.05$).



Фиг. 10. Динамика в нивата на PICP в контролната група: (контроли V1 - изходни стойности на показателя; контроли V2 – стойности на 12 седмица след включване в проучването; контроли V3 – стойности на 24 седмица след включване в проучването. ns- статистически незначима разлика)

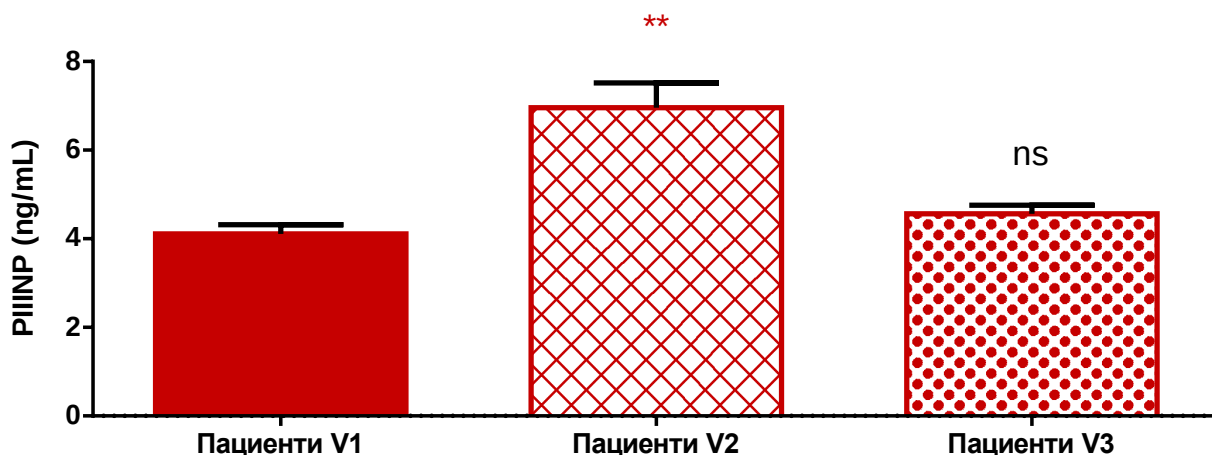
На фигурите по-долу са представени промените в нивата на PIIINP.

Изходните стойности на PIIINP не се различаваха от изходните стойности при контролите, което е представено на фигура 11 (4.11 ± 0.20 vs 3.94 ± 0.24 ng/ml, $p > 0.05$) (Фигура 11). На 12-та седмица нивата при пациентите (пациенти V2) бяха сигнификантно по-високи спрямо изходните на контролите (6.95 ± 0.56 vs 3.94 ± 0.24 ng/ml, $p < 0.001$) (Фигура 11). На 24-та седмица стойностите при пациентите (пациенти V3) бяха достигнали до нива, по-високи от тези на контролите, но тази разлика не беше сигнификантно значима (4.56 ± 0.20 vs 3.94 ± 0.24 ng/ml, $p > 0.05$) (Фигура 11).



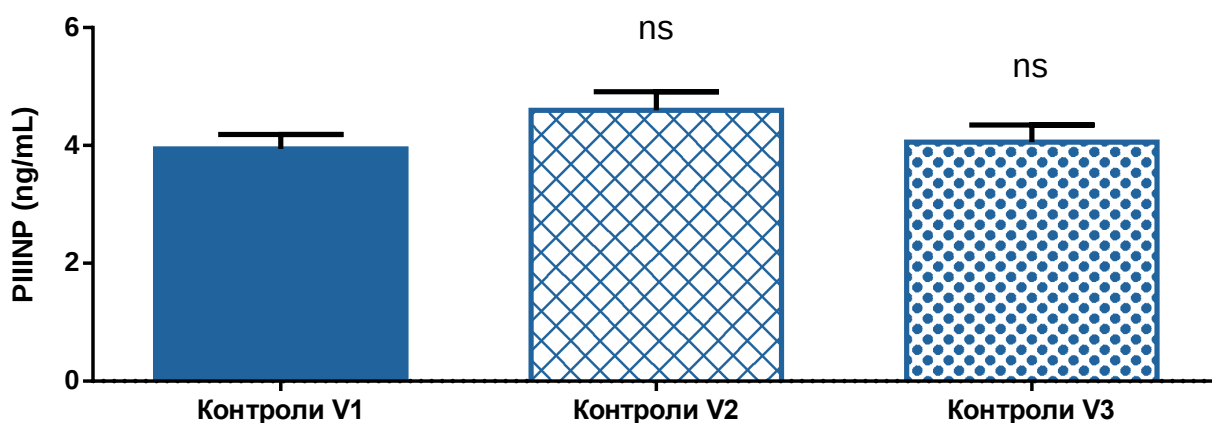
Фиг. 11. Съпоставяне на стойностите на PIIINP при пациенти спрямо изходните стойности на показателя в контролната група (Контроли V1) (пациенти V1- изходни стойности; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; *- $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$; ns- статистически незначима разлика)

При проследяване на нивата на PIIINP в пациентската група (фигура 12) става ясно, че на 12-та седмица (пациенти V2) стойностите на PIIINP бяха нараснали сигнификантно спрямо изходните (пациенти V1) (6.95 ± 0.56 vs 4.11 ± 0.20 ng/ml, $p < 0.001$). На 24-та седмица (пациенти V3) нивата бяха спаднали, като бяха все още по-високи от изходните, но тази разлика не беше статистически значима (4.56 ± 0.20 vs 4.11 ± 0.20 ng/ml $p > 0.05$)



Фиг. 12. Динамика на нивата на PIIINP в пациентската група: (пациенти V1- изходни стойности на показателя; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; *- $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$; ns- статистически незначима разлика)

В контролната група не бяха настъпили значими промени в плазмените нива на показателя по време на периода на проследяване - не беше установено съществено различие между стойностите на показателя от втора и трета визита спрямо изходните (4.60 ± 0.32 vs 3.94 ± 0.24 ng/ml; 4.06 ± 0.29 vs 3.94 ± 0.24 ng/ml, $p > 0.05$) (фигура 13).



Фиг. 13. Динамика на PIIINP в контролната група: (контроли V1 - изходни стойности на показателя; контроли V2 – стойности на 12 седмица след включване в проучването; контроли V3 – стойности на 24 седмица след включване в проучването. ns- статистически незначима разлика)

Още през 1994 г. в експериментални модели е установено, че постоянната деснокамерна апикална стимулация в продължение на 14 седмици води до регионални промени в перфузията на миокарда, повишена катехоламинаова активност и развитие на диастолна дисфункция (Lee et al., 1994). Към момента вече има категорични данни за негативните последици върху функцията на сърцето в резултат на предизвиканата от апикалната деснокамерна стимулация асинхронна контракция на ЛК (Ravassa et al., 2019). Ремоделирането на ЕЦМ стои в основата на развитието на систолна и диастолна дисфункция с течение на времето при пациенти със сърдечносъдова патология (Ducharme et al., 2000; Spinale, 2002). Повишеното отлагане на колаген в екстрацелуларния матрикс на миокарда води до развитие на фиброза и структурно ремоделиране (McMurray et al., 2012). Като последица се наблюдава намален комплайнс на сърдечния мускул и повишен риск от развитие на миокардна дисфункция, аритмии, исхемия и сърдечна недостатъчност (Velagaleti & Vasan, 2007)."

Съвременните схващания са, че сърдечният интерстициум е динамична мрежеста структура с важна метаболитна активност (Jarvelainen et al., 2009). Под въздействие на патологичен стимул настъпва активиране на фибробластите, което води до повишен колагенов синтез (Jong et al., 2011; Espeland et al., 2018). При пациенти с изявена сърдечна недостатъчност се установява повишено колагеново съдържание в интерстициума, което води до задълбочаване на патофизиологичните последици и прогресиране на заболяването (Segura et al., 2014; Kong & Christia, 2014).

През последните години нивата на PICP (carboxy-terminal pro-peptide of pro-collagen type I) и PIIINP (amino-terminal pro-peptide of pro-collagen type III) се наложиха като надеждни молекули за оценка на колагеновия метаболизъм (Prockop and Kivirikko, 1995; Lopez et al., 2015). Данни от проведени проучвания сочат, че за развитие на сърдечна дисфункция има значение както количеството интерстициален колаген, така и отношението между колаген тип I към колаген тип III (Uchinaka et al., 2018). При увеличение на това отношение се установява намалена еластичност на стената на лявата камера и дилатация на камерата. Връзката между нарушенията в колагеновия обмен и развитието на различни сърдечни патологии се изучава в продължение на последните десетилетия.

Резултатите от проведеното от нас изследване показват, че нивата на PICP нарастват още на 12 седмица след имплантацията спрямо тези на контролите, макар и да е с гранична стойност на $p=0.0445$ (Фигура 9). На 24 седмица се установява сигнификантно повишаване на PICP, както спрямо изходните стойности на пациентите, така ($p<0.001$) (фигура 10) и спрямо изходните на контролите ($p<0.001$) (Фигура 9).

Предвид динамичният характер на промените тези резултати ни дават основание да предположим, че апикалната деснокамерна стимулация води изключително рано до активиране на колагеновия метаболизъм.

Поради факта, че полуживота на колагеновата молекула в сърдечния интерстициум е над 6 месеца, се предполага, че процесите на ремоделиране на миокарда при наличие на патологичен стимул изискват време, като баланса между синтез и деградация се измества в посока на повишен синтез (Weber et al., 1989). Молекулите на колаген тип I, изграждат дебели фибрили с ниски нива на обмен, докато молекулите на колаген тип III изграждат по-тънки и нежни нишки, подлежащи на ускорен търноувър (Holm Nielsen et al., 2020). За синтеза на колаген тип I е нужно повече време, поради по-сложната вторична и третична структура на молекулата. Скоростта на синтеза на колагеновите молекули, съответно и степента на техния обмен трябва да се има предвид при интерпретацията на резултатите от проведеното от нас проучване.

Миокардният екстрацелуларен матрикс има специфичен състав и съдържа основно колаген тип I (85%) и колаген тип III (11%) (Kong et al., 2014). Данните сочат, че съставът на фиброзната тъкан при реактивна миокардна фиброза се характеризира с увеличаване на колаген тип I, който е съставен от дебели фибрилни полимери с множество кръстосани връзки помежду им и на по-малко количество колаген тип III, който е с по-тънки и не толкова прекръстосани молекули (Lopez et al., 2015). Поради различните биофизични характеристики на двата типа колагенови фибрили, дори и леко увеличение на отношението между колаген тип I и колаген тип III води до значително увеличаване на миокардния стифнес. Това кореспондира и с резултатите от нашето проучване, където има сигнификантно повишаване на нивата на P13P в пациентската група към края на периода на проследяване от 24 седмици (фигура 9). При съпоставяне на стойностите на P13NP се вижда, че на 24 седмица нивата му са повишени както спрямо изходните при пациентите, така и спрямо изходните при контролите, макар и това повишение да не достига сигнификантна значимост (фигура 11; фигура 12). *Като резултат можем да заключим, че и двата маркера реагират с увеличение им 6 месеца на асинхронна камерна контракция, предизвикана от апикалната деснокамерна стимулация.*

Според заложения дизайн на проведеното от нас проучване, пациентите нямат тежка съпътстваща сърдечносъдова патология, освен проводното нарушение и до I степен добре контролирана АХ, което наложи имплантацията на постоянен кардиостимулатор. Това ни дава основание да предположим, че колагеновият синтез реагира с активиране в резултат на електрическата и механична асинхрония, предизвикана от стимулацията в апекса на дясната камера. Подобни данни са получени

и при изследване, проведено от Lin et al. (2010). Те установяват, че след 12 седмици на постоянна деснокамерна стимулация се наблюдават хетерогенни промени в ЕЦМ, увеличена активност на MMP-2 и MMP-9, както и нарастване на нивата на колаген тип I mRNA.

В групата пациенти, която включихме в нашето изследване, се установи повишаване на нивата на PIIINP след 12 седмици след имплантацията, както спрямо изходните стойности при пациентите ($p < 0.001$) (Фигура 12), така и спрямо изходните стойности при контролната група ($p < 0.001$) (Фигура 11). На 24 седмици след имплантацията, обаче, се наблюдава спадане на стойностите до нива, близки, но по-високи от изходните.

Относно значимото повишение 12 седмици след имплантацията, може да се предложи хипотезата, че то може да е резултат от проведената хирургична интервенция. Неоспорим факт е, че колаген тип III участва в изграждането на кожата и подкожната тъкан и активно участва в зарастването на оперативните рани (Riekkilä et al., 2004). Изследвания на проби, взети от оперативни рани, установяват значително повишение на нивата на PIIINP в дните след интервенцията (Haukipuro et al., 1987). Също така е установено, че серумните нива на този маркер се повишават 1000 пъти над тези при неоперирани пациенти, като пика е на 5-тия постоперативен ден, но не е изследвана динамиката на нивата на показателя след този период. Данни от хистологични изследвания на тъкани от оперативни рани в процес на заздравяване показват най-изразеното отлагане на колаген в пробите, взети на 14-ти и 28-ти ден след интервенцията (White et al., 2002). Важно е да се отбележи, че имунофлуоресцентни хистологични анализи на 14-тия и 28-тия ден показват наличие на колаген тип I и колаген тип III в равни количества в пробите. Въпреки че тези данни не показват динамиката на колагеновото отлагане след този период, става ясно, че процесът на заздравяване на оперативната рана ангажира в еднаква степен и колаген тип I и колаген тип III в първите 4 седмици. Заздравяването на всяка рана обикновено преминава през фазите на възпаление, пролиферация и ремоделиране (Young & McNaught, 2011). При малки оперативни интервенции, като имплантацията на постоянен пейсмейкър, оперативните цикатрикси обикновено преминават през тези фази бързо, за период от 7 до 10 дни. Обаче имплантацията на кардиостимулатор изисква също и формиране на джоб, където да се разположи пулсгенератора (Burri et al., 2021). Интраоперативното формиране на джоба нарушава целостта на подкожната съединителна тъкан. Процесите на заздравяване на мекотъканни травми могат да доведат до продължително повишаване на синтеза на PIIINP (Haukipuro et al., 1990).

Резултати от проучвания върху опитни животни показват повишение на нивата на PIIINP при формирането на грануляционна тъкан по време на заздравяването на меките тъкани, като това повишение може да продължи до няколко месеца (Jensen et al., 1993). Данни от изследване, проведено от Ulrich et al. (2003) при пациенти с кожни изгаряния, подложени на оперативно лечение, показват връх на нивата на PIIINP на 14-тия ден след интервенцията, като те остават сигнификантно повишени до 6 месеца след това. Важно е да се отбележи, че стойностите на PIIINP на 6 месеца след оперативна реконструкция на обширно увредена кожа спадат почти наполовина, но са сигнификантно по-високи спрямо тези в контролната група. Този факт подчертава активното участие на колагеновия синтез в процеса на формиране и ремоделиране на цикатриците и доказва, че дори при пациенти с обширни цикатрициални зони стойностите на маркера значително намаляват 6 месеца след реконструкцията. Също така, формирането на зрял цикатрикс при пациенти с кожни изгаряния може да продължи за период над 12 месеца (Tuan & Nichter, 1998).

Казаното до тук ни дава основание да предположим, че повишените стойности на PIIINP на 12 седмица след имплантацията на ПЕКС могат да се дължат на заздравителните процеси и формирането на капсулата около пулсгенератора. Повишените стойности след 6 месеца, обаче, е твърде вероятно да са резултат от активирането на колагеновия синтез в миокарда, породен от деснокамерната апикална стимулация. За да се установи по-нататъшния ход на нивата на PIIINP, е необходимо проследяване за по-продължителен период.

Отлагането на колаген при реактивна миокардна фиброза увеличава ригидността на сърдечния мускул, което води до развитие на систолна и диастолна дисфункция (Zile et al., 2011; Michalski et al., 2017; Duprez et al., 2018). При пациенти със застойна сърдечна недостатъчност се установява положителна корелационна зависимост между нивата на PICP и размерите на лявата камера, нивата на BNP и наличието на вътрекамерна асинхрония (Löfsjögård et al., 2014). Подобни резултати са установени и при пациенти с ICD (Flevari et al., 2012). Данните показват, че при регистрирана тахикардия, наложила терапия от устройството, се намира по-ниска фракция на изтласкване на лявата камера и по-високо отношение на PICP/PIINP. В двете проучвания серумните маркери за колагенов синтез са изследвани едновременно, без да се анализира промяната им в динамика.

Както стана ясно, промените в миокардия интерстициум могат да настъпят при различни патологични състояния (Velagaleti & Vasan, 2007; McMurray et al., 2012). Затова пациентите, които включихме в проучването, бяха без сериозни съпътстващи

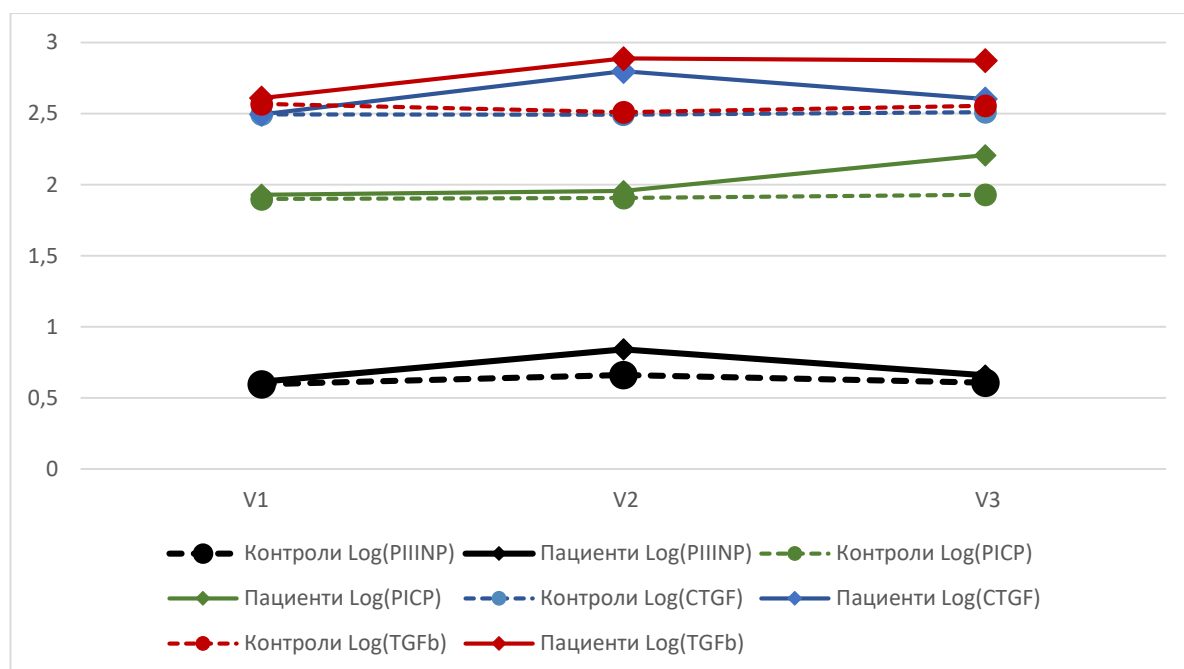
заболявания, които могат да се отразят на фиброзната активност по време на проследяването. От друга страна, с естествените процеси, които настъпват при биологичното остаряване на организма, се наблюдава активиране на фиброзните процеси в различни тъкани и органи (Jong et al, 2011). Фиброзата се характеризира основно с повишено отлагане на колаген в интерстициума на засегнатия орган (Hwang et al., 2007). Колагеновите фибрили, които се синтезират в интерстициума на остаряващия организъм, се характеризират с повишена устойчивост към металлопротеиназите (ММР) поради наличието на повече напречни връзки, усуквания и прекръсвания между молекулите (Kwak et al., 2011). Този процес води до увеличаване на миокардната ригидност, електрическа нееднородност и развитие на систолна и диастолна дисфункция на лявата камера (Zile et al., 2011). Това беше и причината да се проследят маркерите за колагенов синтез паралелно и в динамика както в пациентската, така и в контролната група. Резултатите ни показаха липса на значими промени в параметрите при проследяването им в контролната група (Фигура 10, Фигура 13).

Друг важен аспект, на който трябва да се обърне внимание, е че медикаментозната терапия на пациентите при включването им в изследването, както и по време на самото изследване не повлиява фиброзната метаболитизъм или няма категорични данни за това. Това беше заожено в дизайна на изследването с цел достоверно отчитане на “нето” ефекта на ПЕКС върху изследваните молекули. От проведени проучвания има неоспорими доказателства, че медикаментите, които повлияват РААС, оказват влияние на степента на колагеново отлагане в миокарда и по този начин подобряват прогнозата на пациентите (Neumans et al., 2015). Данни от изследване при хора с хипертония се установява, че след 9-месечно лечение с минералокортикостероидния рецепторен антагонист спиронолактон се наблюдава значителна редукция в плазмените нива на маркерите за колагенов синтез PIIINP и PICP, както и нарастване на нивата на маркера за колагенова деградация CITP (C-terminal telopeptide of collagen type I) (Ferreira et al., 2019). В резултат се наблюдава обратно ремоделиране на екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ) и редукция на миокардната фиброза. Важно е да се отбележи, че този ефект е независим от степента на понижаване на артериалното налягане, което подчертава директното въздействие върху миокардния интерстициум и води до подобряване на дългосрочната прогноза на пациентите и намаляване на риска от развитие на систолна и диастолна сърдечна дисфункция. Включените от нас пациенти бяха лекувани с метилдопа, амлодипин и хидрохлоротиазид (Таблица 2). Няма литературни данни за тези медикаменти, че повлияват колагеновия метаболитизъм. Според дизайнът на проучването, ние се опитахме да минимизираме външните фактори, които биха могли да

окажат влияние на синтеза на колагена и на активиране на фиброзната каскада. От една страна включените пациенти нямаха тежки съпътстващи заболявания, а от друга антихипертензивната терапия беше модулирана така, че да се избегнат медикаменти с ефект върху РААС.

Процесът на миокардно ремоделиране и изключително динамичен (Hwang et al., 2007). Както стана ясно той се влияе както от разнообразни патологични фактори, така и от приеманата медикаментозна терапия (Ferreira et al., 2019). Също така не трябва да се пренебрегват и естествените процеси на стареенето на организма, които увеличават колагеновата депозиция в редица паренхимни органи. За да се оцени степента на колагенова депозиция в миокарда при пациенти с ПЕКС е проведено изследване от Saunderson et al (2021). Те провеждат ЯМР с контрастно усилване преди имплантацията на ПЕКС и 6 месеца след нея при пациенти с високостепенен AV блок. Важно е да се отбележи, че в проучването електрода се пласирал в апекса на ДК. Резултатите показват, че при пациентите с най-изразена миокардна фиброза от ЯМР преди ПЕКС се изяснява ЛК дисфункция, което налага надграждане към ресинхронизираща система. При тези от тях, при които на 6 месец след имплантацията е имало данни за засилена фиброза в миокарда се установява по-значима редукция на EF и увеличаване на LVESV. Поради това, че ЯМР с контрастно усилване е златен стандарт за оценка на степента на миокардна фиброза, данните от това проучване за пореден път потвърждават връзката между деснокамерното апикално стимулиране с ПЕКС и сърдечното ремоделиране. За потвърждаване на резултатите е нужно да се проведе подобно изследване с ЯМР и проследяване на маркерите за колагенов синтез в пациентска и контролна групи, като така получените данни ще са още по-представителни.

За обобщаване получените от нас резултати се представиха на обща графика, като стойностите се изразиха като десетичен логаритъм (фигура 14). От фигура 14 се вижда еднопосочната динамика на покачване на изследваните сигнални молекули и маркера за колагенов синтез P1CP в пациентската група, съпоставени с платовидния ход на стойностите на показателите в контролната група.



Фиг. 14. Динамика в стойностите при пациенти и контроли изразени като десетичен логаритъм.

Анализирайки едновременно промените в изследваните показатели, както и факта за липсата на тежка съпътстваща патология, съответно заложените включващи и изключващи критерии на проучването, считаме, че се минимизира външното повлияване върху фиброзния процес. Въз основа на казаното до тук и в контекста на данните, изложени по-горе, можем да предположим, че нарастването на нивата на PICP и PHINP на 24 седмица се може да се дължи на предизвиканата от пейсмейкъра асинхронна камерна контракция.

3. Адекватност на обема на изследваните групи – анализ на мощността на t-критерий за промените в маркерите на фиброзната система

От особена важност за всяко изследване е обемът на извадката, който е определящ за представителността на направените изводи (Bland, 2000; Munro, 2005). Изследване на неправилна по размер извадка може да окаже неблагоприятно въздействие върху резултатите от проведеното проучване. Това изисква оценка на мощността на използвания статистически критерий (за представения дисертационен труд това е двустранен t-тест за независими извадки, използван за оценка на значимите разлики в нивата на сигналните молекули за фиброзна активност и маркера за колагенов синтез PICP) при зададено ниво на грешка от първи род (ниво на съгласие) в зависимост от

обема на извадките, средните стойности и стандартното отклонение (SD). Мощност под 0.75 се счита за недостатъчна при клинични изследвания. Това означава, че използваният статистически критерий има по-малко от 75% шанс да улови зададените разлики. Следователно, обичайно се приема, че мощността трябва да бъде >0.75, за да се счита за задоволителна (Fitzner & Heckinger, 2010).

По-долу в Таблица 3 е представена мощността на t-критерия за тестване на хипотезата за равенство на средните стойности (при пациенти и контроли) на изследваните показатели на фиброзната система след 24 седмици от проследяването при зададено ниво на грешка от първи род (ниво на съгласие) от 0.05. Резултатите показват, че има много добра статистическа мощност на t-критерия (>0.75) при използвания от нас размер на извадката (обем на пациентската и контролната група), освен в случая с плазмените нива на PICP, където мощността е на граничния праг (0.76).

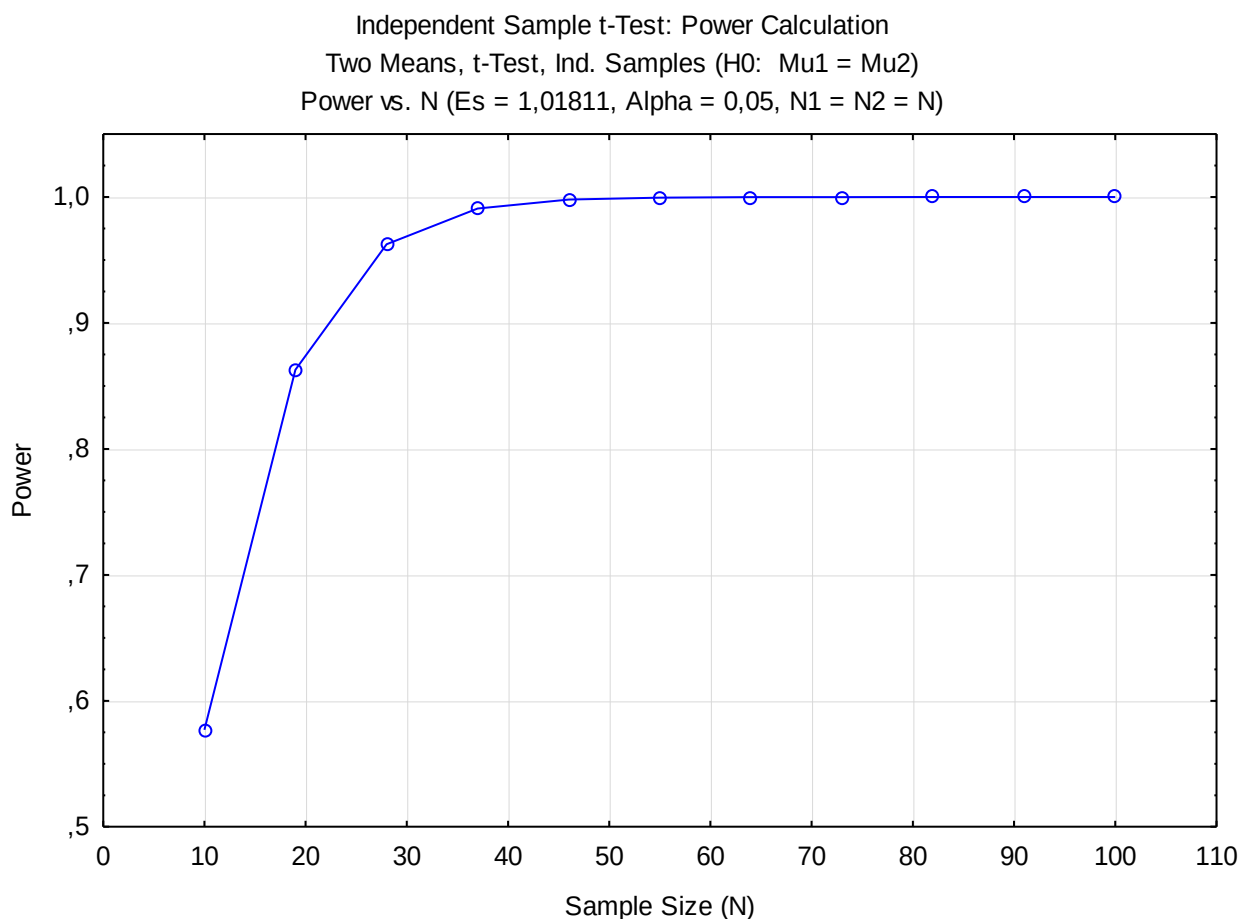
Табл 3. Мощност на t-критерия за две независими извадки при представените средни стойности и SD на изследваните фиброзни показатели на 24 седмица (V3/V3c)

Фиброзен показател	Ср. стойност $\pm$ SD при пациенти на V3	Ср. стойност $\pm$ SD при контроли на V3c	Мощност на критерия
CTGF	400.83 $\pm$ 78.60	324.74 $\pm$ 92.00	0.99
TGF beta1	748.28 $\pm$ 257,77	359.55 $\pm$ 166,38	0.95
PICP	161,35 $\pm$ 83.12	85,26 $\pm$ 31.13	0.76

За нагледност на методиката анализ на мощността, представяме изчисленията (Таблица 4) и графиката (Фигура 15) относно показателя CTGF, направени от използвания статистически пакет STATISTICA 13.3.0, StatSoft Inc., USA

Табл. 4. Изчисления със статистически пакет STATISTICA 13.3.0, StatSoft Inc., USA
Power Calculation (FIBR.sta) Two Means, t-Test, Ind. Samples H0: Mu1 = Mu2

	Value
Population Mean Mu1	400.83
Population Mean Mu2	324.74
Population S.D. (Sigma)	78.60
Standardized Effect (Es)	1,0181
Sample Size N1	40,0000
Sample Size N2	46,0000
Type I Error Rate (Alpha)	0,0500
Critical Value of t	1,9886
Power	0,9965



Фиг. 15. Графика на зависимостта между обем на извадката и големина на мощността на *t*-теста за двете независими извадки от стойности за плазмени нива на CTGF

В обобщение, направеният анализ на мощността показва, че броят на селектираните участници за всяка група е достатъчен и адекватен при получените средни стойности и SD на изследваните фиброзни показатели. Представените резултати и направени изводи са надеждни и описват коректно промените в маркера за колагенов синтез и сигналните молекули на фиброзна активност в изследваните популации, а не са случайна находка или резултат от експериментална грешка.

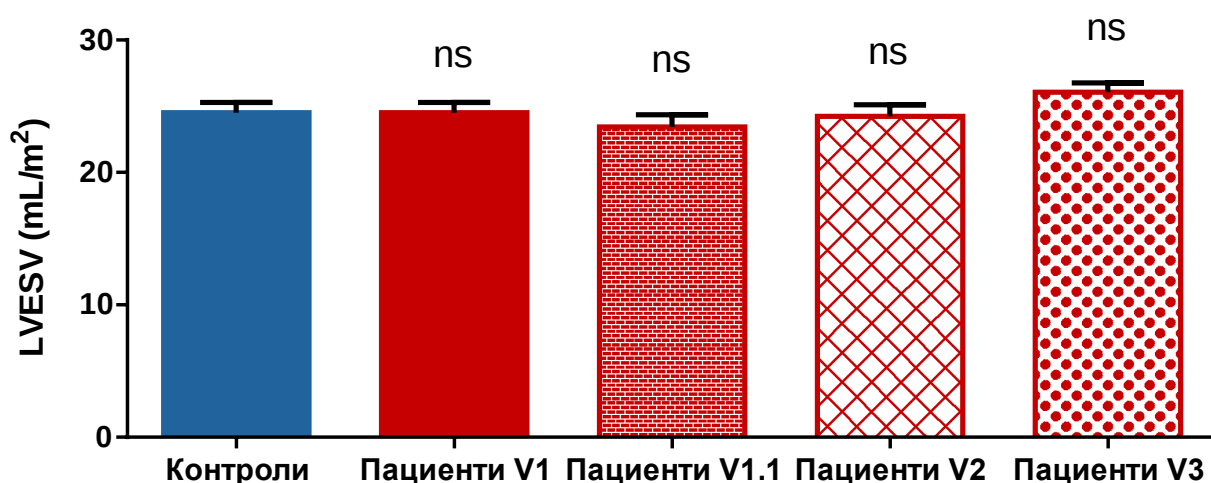
4. Отклонения в изследваните ехокардиографски показатели

За целите на проучването бяха проследени следните показатели: LAVI, LVEDV, LVESV и се изчисли фракцията на изтласкване (EF%- ejection fraction). От таблица 5 се вижда, че няма разлика между изходните стойности на LVEDV при пациентите и тези на контролната група ($p > 0.05$). Също така не се наблюдава значима разлика в стойностите при пациентите спрямо контролите при проследяване на 6-та седмица (пациенти V1.1) ($p > 0.05$), 12-та седмица (пациенти V2) ($p > 0.05$) и 24-та седмица (пациенти V3) ($p > 0.05$).

Табл. 5. Резултати от трансторакална ехокардиография

ЕхоКГ показател	Контроли	Пациенти V1	Р-ст.	Пац. V1.1	Р-ст.	Пац. V2	Р-ст.	Пац. V3	Р-ст.
LAVI (mL/m ²)	16.69 ±0.23	20.03 ±0.71	<0.001	25.48 ±1.33	<0.001	27.42 ±1.34	<0.001	27.05 ±1.51	<0.001
LVEDV (mL/m ²)	52.17 ±1.65	51.98 ±1.97	>0.05	51.95 ±1.95	>0.05	51.94 ±1.63	>0.05	51.62 ±1.81	>0.05
LVESV (mL/m ²)	24.52 ±0.76	24.50 ±0.77	>0.05	23.45 ±0.90	>0.05	24.23 ±0.88	>0.05	26.05 ±0.72	>0.05
EF (%)	55.98 ±0.33	57.36 ±0.66	>0.05	56.16 ±0.79	>0.05	56.23 ±0.65	>0.05	56.13 ±0.69	>0.05

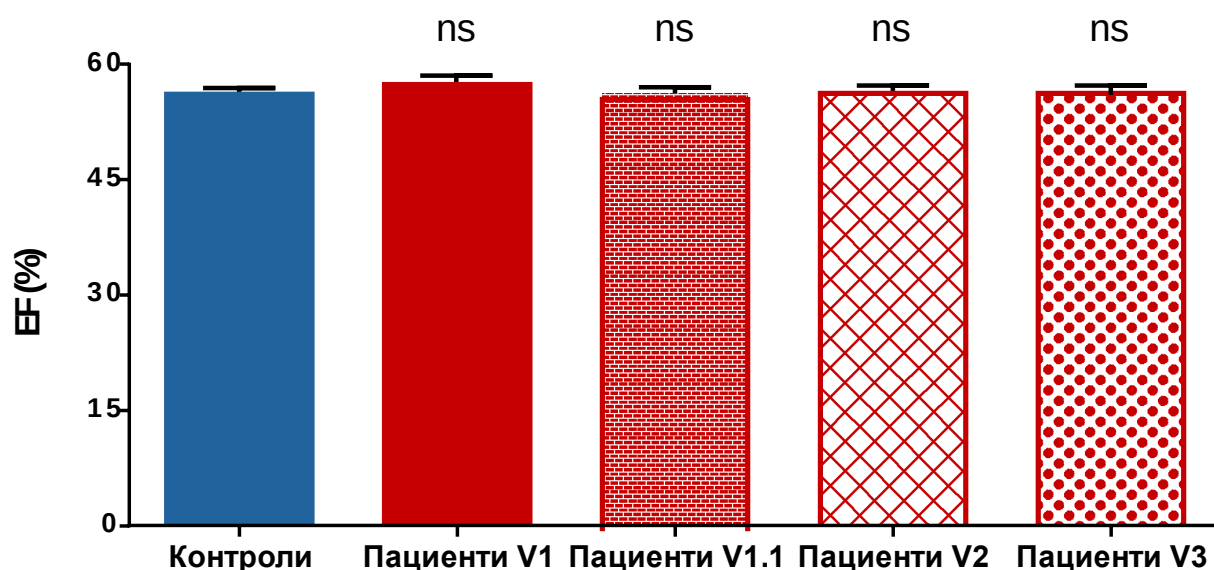
От фигура 16 се вижда, че липсваше разлика между изходните стойности на LVESV при пациенти (V1) и контроли (24.50±0.77 vs 24.52±0.76 ml/m², p>0.05). На 6-та и 12-та седмица (пациенти V1.1 и пациенти V2) също не се наблюдава сигнификантна разлика между данните за пациентите, спрямо тези на контролите (23.45±0.90 vs 24.52±0.76 ml/m², p>0.05; 24.23±0.88 vs 24.52±0.76 ml/m², p>0.05). На 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС се наблюдава тенденция за повишаване на стойностите при пациентите спрямо контролите, но тази разлика не достига сигнификантна значимост (26.05±0.72 vs 24.52±0.76 ml/m², p>0.05) (*p=0.15*)



Фиг. 16. Съпоставяне на стойностите на LVESV при пациенти спрямо изходните стойности на показателя в контролната група (Контроли V1) (пациенти V1- изходни стойности; пациенти V1.1 – стойности на 6-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти V2 - стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3 - стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; * - *p*<0.05; ** - *p*<0.001; ns- статистически незначима разлика)

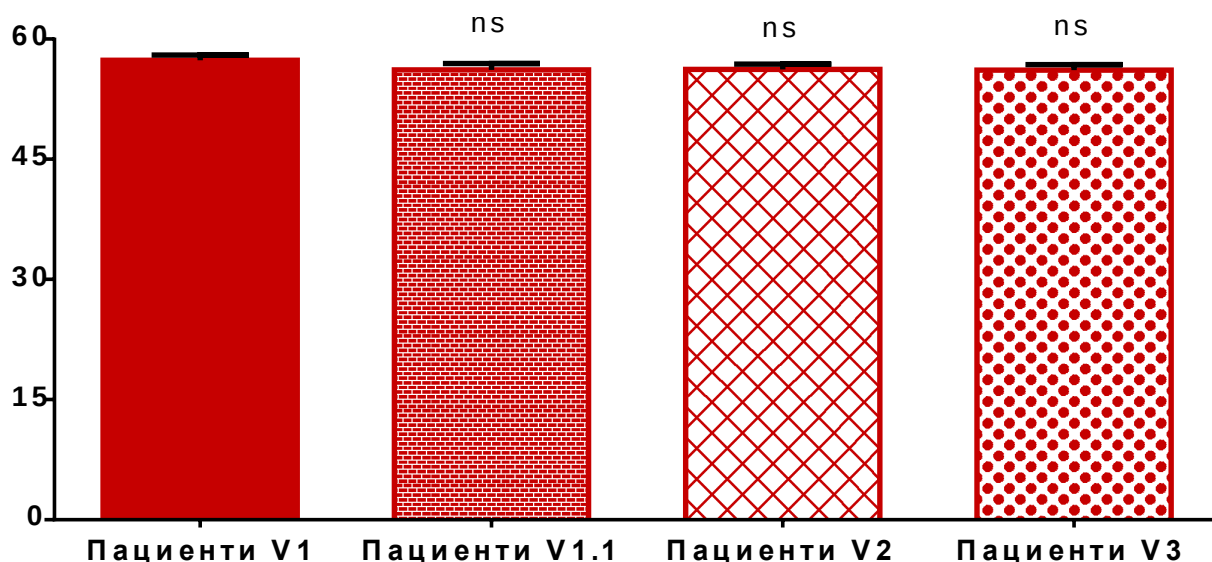
Фигура 17 показва, че няма сигнификантна разлика между изходната EF% при пациенти (V1) и контроли (57.36±0.66 vs 55.98±0.33%, p>0.05). На последващите визити на 6-та (пациенти V1.1) и 12-та седмица (пациенти V2), също не се отчита сигнификантна разлика спрямо изходните стойности при контролната група (56.16±0.79 vs 55.98±0.33%,

$p>0.05$) и (56.23 ± 0.65 vs $55.98\pm0.33\%$, $p>0.05$). На 24-та седмица след имплантацията не се наблюдава значима разлика в EF% при пациентите спрямо изходните стойности в контролната група (56.13 ± 0.69 vs $55.98\pm0.33\%$, $p>0.05$).



Фиг. 17. Съпоставяне на стойностите на EF% при пациенти спрямо изходните стойности на показателя в контролната група (Контроли V1) (пациенти V1- изходни стойности; пациенти V1.1 – стойности на 6-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти V2 - стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3 - стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; *- $p<0.05$; ** - $p<0.001$; ns- статистически незначима разлика)

При проследяване на EF в пациентската група (фигура 18) се вижда, че на последващите визити на 6-та (пациенти V1.1) и 12-та седмица (пациенти V2) също не се отчита сигнификантна разлика спрямо изходните (56.16 ± 0.79 vs $57.36\pm0.66\%$, $p>0.05$; 56.23 ± 0.65 vs $57.36\pm0.66\%$, $p>0.05$). На 24-та седмица след имплантацията се наблюдава тенденция към понижаване на EF при пациентите спрямо изходните стойности, като разликата не достига сигнификантна значимост (56.13 ± 0.69 vs $57.36\pm0.66\%$, $p>0.05$) (Фигура 18).



Фиг. 18. Динамика в стойностите на EF% в пациентската група: (пациенти V1- изходни стойности на показателя; Пациенти V1.1 – стойности на 6-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; *- $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$; ns- статистически незначима разлика)

Разкриването на етиологията на подлежащата сърдечна дисфункция е в основата на диагностицирането на сърдечната недостатъчност, като лечението се основава на специфична патологична причина. Най-често сърдечната недостатъчност се дължи на миокардна дисфункция, която може да е систолна, диастолна, както и комбинирана. Левокамерната фракция на изтласкване е най-използваният белег за класифициране на сърдечната недостатъчност. На базата на стойностите на EF се базират заключенията на клиничните проучвания, оценява се ефектът от медикаментозното лечение и се определя степента на реимбурсация от здравната застрахователна система в повечето държави (Lam & Solomon, 2014). Стойностите на нормалната фракция на изтласкване остават спорни, като според проучването EchoNoRMAL долната граница е от 49 до 57% в зависимост от възрастта, пола и етническата принадлежност (Poppe et al., 2015)

Според Американското дружество по ехокардиография (American Society of Echocardiography) и Европейската асоциация по сърдечносъдова образна диагностика (European Association of Cardiovascular Imaging) се възприемат за нормални граници от 62% (52–72%) при мъже и 64% (54–74%) при жени (Lang et al. 2015). Според стойностите на EF, пациентите със сърдечна недостатъчност се класифицират според Европейското дружество по кардиология (European Society of Cardiology-ESC) в три групи: такива със запазена EF >50%, такива с леко намалена EF от 40-49% и такива с намалена EF под 40% (Ponikowski et al, 2016).

Негативният ефект върху помпената функция на сърцето при апикалната деснокамерна стимулация е вече категорично доказан (Zhang 2008). Утвърди се, че апикалната стимулация над 40% от времето се свързва категорично с повишен риск от развитие на прояви на сърдечна недостатъчност (Khurshid et al, 2014). Също така е доказана линейната зависимост между честотата на пейсиране на дясната камера и риска от левокамерна дисфункция (Kiehl et al, 2016).

Според дизайна на нашето проучване, при скринирането бяха включени пациенти с пълен атриовентрикуларен блок с над 80% апикална деснокамерна стимулация през целия период на проследяване. Резултатите показаха, че EF на лявата камера в пациентската група не претърпя сигнификантни промени спрямо контролната група към края на 24-седмичния период на проследяване. От фигура 17 се вижда, че на визита 3 има тенденция за намаляване на стойностите на ФИ при пациентите спрямо тези в контролната група (Фигура 17). Също така се установява увеличаване на стойностите на телесистолния обем на лявата камера (LVESV) при пациентите спрямо контролите на визита 3, макар тази разлика също да не достига сигнификантна значимост, но има гранична стойност на $p=0.15$ (Фигура 16). Това съответства на установената тенденция за намаляване на фракцията на изтласкване на лявата камера.

Въпреки че нашите резултати не показват сигнификантен спад в помпената функция на лявата камера, трябва да се отбележи, че наличието на начална тенденция за нейното намаляване не трябва да се подценява. Данни от редица проучвания, проведени до момента, категорично показват повишен риск от развитие на систолна дисфункция след имплантация на ПЕКС и апикална деснокамерна стимулация. Проучването на Zhang et al. (2008) при голяма група пациенти показва сравнително късно проява на систолна дисфункция на лявата камера при пациенти с изходно нормални помпени параметри. Резултатите показват, че при 26% от пациентите се регистрира спад във EF на лявата камера, като при повечето от тях това се случва след третата година след имплантацията. Трябва да се отбележи, че част от включените пациенти имат съпътстващи заболявания като ИБС и ЗД, които допълнително могат да допринесат за развитие на сърдечна недостатъчност. Това може да обясни сравнително високата честота на засегнати пациенти, тъй като най-често данните от други подобни студии показват развитие на систолна дисфункция при апикална деснокамерна стимулация при около 20% от пациентите (Dreger et al., 2012).

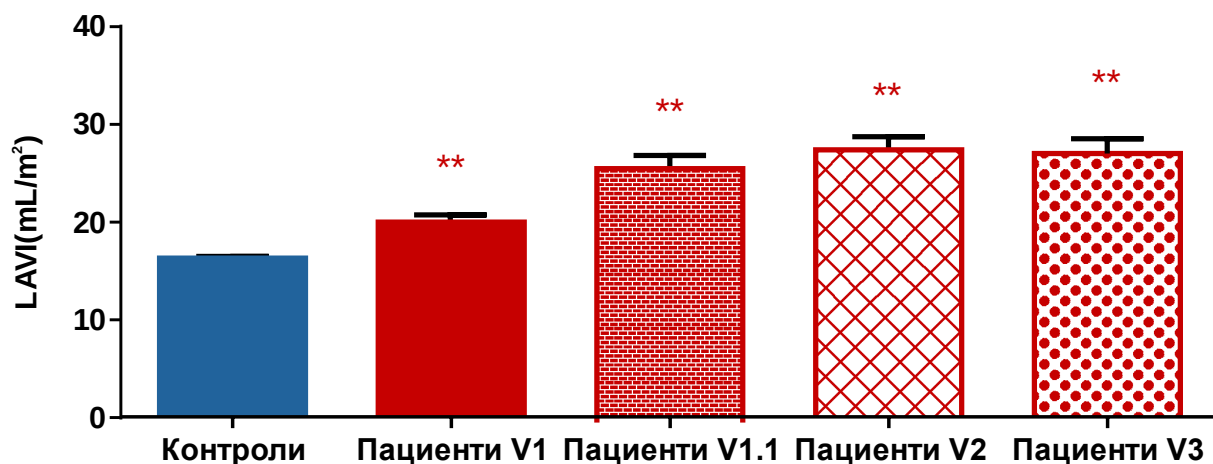
От друга страна, в BLOCK HF Trial, например, се установява изключително ранно спадане на помпените показатели на сърцето още след 6 месеца след имплантацията (Curtis et al., 2013). Важно е да се отбележи обаче, че включените пациенти в това

проучване са с гранична или умерено намалена EF и с налична съпътстваща патология като исхемична болест, хронично бъбречно заболяване, захарен диабет и други. Рандомизираните пациенти се проследяват за период от около 2 години. Сравнява се ефекта на бивентрикуларната стимулация със CRT и деснокамерната апикална стимулация, като резултатите са в полза на ресинхронизиращите устройства по отношение на смъртност и изява на сърдечна недостатъчност. Интересен резултат от това проучване е, че увеличаването на телесистолния обем на лявата камера (LVESV) се свързва със значително повишен релативен риск за смърт и хоспитализация поради сърдечна недостатъчност.

Други изследвания показват развитие на систолна дисфункция при 12,3% от пейсираните пациенти след период от 4,3 години, като средният спад във EF е 24% (Kiehl et al., 2016). Поради липса на данни от последващи визити, обаче, не е ясно на какъв етап от времето започва да се регистрира спадът в помпените показатели на лявата камера.

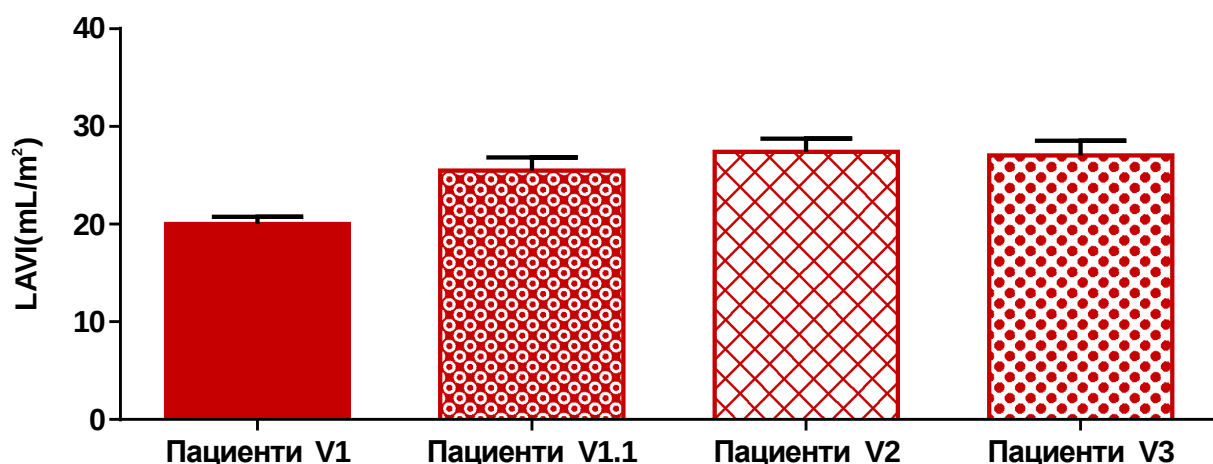
Подобни резултати се извеждат и от екипа на Bansal et al. (2019), където пациентите се проследяват за период от 14,5 месеца и се установява новопоявила се систолна дисфункция при 13,8% от пациентите с постоянна апикална деснокамерна стимулация. От казаното до тук можем да заключим, че в проведеното от нас проучване се установява тенденция на спад в помпените параметри на лявата камера в пациентската група в сравнение с контролната. Това, че тези промени не достигат сигнификантна значимост, може да се предположи, че се дължи на сравнително краткия период на проследяване от 6 месеца. От друга страна, не трябва да се пренебрегва фактът, че селектираните от нас пациенти са без съпътстваща сърдечно-съдови патология, освен до I степен добре контролирана артериална хипертония. С така заложения дизайн, ние целехме да минимизираме влиянието на допълнителни фактори и състояния, които да повлияят на ремоделирането на лявата камера.

От фигура 19 става ясно, че изходните стойности на LAVI са сигнификантно високи спрямо тези на контролите (20.03 ± 0.71 vs. 16.69 ± 2.23 ml/m², $p < 0.001$). На последващите визити, съответно на 6-та, 12-та и 24-та седмици, се установява сигнификантно увеличение на стойностите спрямо тези в контролната група (Фигура 19) (25.48 ± 1.33 vs. 16.69 ± 2.23 ml/m², $p < 0.001$; 27.42 ± 1.34 vs. 16.69 ± 2.23 ml/m², $p < 0.001$; 27.05 ± 1.33 vs. 16.69 ± 2.23 ml/m², $p < 0.001$).



Фиг. 19. Съпоставяне на стойностите на LAVI при пациенти спрямо изходните стойности на показателя в контролната група (Контроли V1) (пациенти V1- изходни стойности; пациенти V1.1 – стойности на 6-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти V2 - стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3 - стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; *- $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$; ns- статистически незначима разлика)

При проследяване на LAVI в пациентската група (Фигура 20) се вижда, че на проследяващите визити съответно на 6-та, 12-та и 24-та се установява сигнификантно повишаване на стойностите спрямо изходните ($25,48 \pm 1.33$ vs $20,03 \pm 0.71$ mL/m², $p < 0.001$; $27,42 \pm 1.34$ vs $20,03 \pm 0.71$ mL/m², $p < 0.001$; $27,05 \pm 1.33$ vs $20,03 \pm 0.71$ mL/m², $p < 0.001$).



Фиг. 20. Динамика на LAVI в пациентската група – (пациенти V1- изходни стойности на показателя; пациенти V1.1 – стойности на 6-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; *- $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$; ns- статистически незначима разлика)

Лявото предсърдие има важно значение за ефективността на сърдечния цикъл, като осигурява адекватно левокамерното пълнене (Obokata et al., 2013). По време на резервоарната фаза, ЛПП получава кръв от пулмоналните вени и, като увеличава своя обем благодарение на своята комплайнс, осигурява нормално налягане за пълнене на ЛК. Резервоарната фаза на ЛПП също се влияе от левопредсърдната релаксация,

левопредсърдния контрактилитет, както и от апикалното изместване на базата на лявата камера по време на систола (Goette et al., 2017). Във фазата на ранната диастола след отваряне на митралната клапа, кръвта от лявото предсърдие пасивно навлиза в лявата камера в резултат на създадения градиент на налягането между двете кухини. След диастазата или фазата на бавното камерно пълнене, когато предсърдието играе ролята на връзка между пулмоналните вени и ЛК, последва контракция на ЛП, с което камерата се допълва (Rossi et al., 2014).

Лявото предсърдие е изключително чувствително към обемно и пресорно натоварване в резултат на повишено левокамерно налягане за пълнене (Dernellis et al., 1998). Също така нарушаването на функцията на ЛП води до ремоделиране на пулмоналните съдове, както и до намаляване на техния комплайнс, което води до деснокамерно пресорно натоварване и пулмонална хипертония. Поради тези причини, ранната детекция на дисфункцията на ЛП играе важна роля в оценката на редица сърдечни заболявания (Sugimoto et al., 2017).

При наличие на пълен атриовентрикуларен блок се нарушава последователността на предсърднокамерното куплиране, което компрометира адекватното камерно пълнене (Appleton et al., 1991). В ранния период на пълния атриовентрикуларен блок се наблюдава обемно и пресорно обременяване на предсърдията, което е резултат от два процеса. Първо, има пълна асинхронност между предсърдната и камерната контракция, което в някакъв момент води до съкращаване на предсърдията срещу затворените атриовентрикуларни клапи. Като резултат се наблюдава рязко повишаване на тяхното налягане и кръвта се насочва ретроградно съответно към пулмоналните и системните вени. От друга страна, при пълен атриовентрикуларен блок се наблюдава диастолна митрална и трикуспидална регургитация поради закъсняване или липса на камерна систола, която да последва предсърдната контракция. След предсърдната систола следва редукция на предсърдното налягане, което води до появата на малък обратен градиент и до частично затваряне на митралната клапа. За да се затворят напълно митралната и трикуспидалната клапи, е необходимо да настъпи камерна систола, и ако това не се случи, както е при наличие на високостепенен AV-блок, се стига до диастолна митрална и трикуспидална регургитация (Rokey et al., 1986).

Резултатите на нашето проучване показаха, че изходните стойности на LAVI при пациентите са значително по-високи в сравнение с тези на контролната група (Фигура 20). Съгласно заложения дизайн на проучването, включените пациенти имат нормални ехокардиографски показатели според приетите критерии (Lang et al., 2015) и нямат значителни клапни патологии. На базата на този факт можем с голяма вероятност да

предположим, че изходно повишеният обем на лявото предсърдие при пациентите спрямо контролната група е резултат от хемодинамичното обременяване, произтичащо от атриовентрикуларния блок.

Увеличаването на обема на лявото предсърдие е един от най-често използваните показатели за оценка на неговата функция и служи като косвен индикатор за оценка на теледиастолното налягане в лявата камера (Lang et al., 2015). Ремоделирането на лявото предсърдие е резултат на множество фактори, включително тахиаритмии при предсърдно мъждене, обемно и пресорно натоварване вследствие на клапна патология, изменения в стифнеса на левокамерната стена при исхемична сърдечна болест, артериална хипертония и други (Gottdiener et al., 2006; Owan et al., 2006).

Деснокамерното апикално стимулиране довежда до електрическа и механична асинхрония в лявата камера, което води до развитие на левокамерна дисфункция и повишено налягане на пълнене (Delgado et al., 2009; Puggioni et al., 2004). Нефизиологичното активиране на миокарда предизвиква асинхрония в систолата на камерата, нарушава нейната релаксация, намалява степента на лонгитудинално съкращение и циркулярното усукване (Tops et al., 2007; Tops et al., 2009). Тези промени оказват влияние върху функцията и структурата на лявото предсърдие, което може да доведе до развитие на аритмии и други усложнения (Matsuoka et al., 2009). Допълнително, деснокамерното апикално стимулиране предизвиква диастолна дисфункция на лявата камера и увеличава следнотоварването на лявото предсърдие (Xie et al., 2012 a). Този процес увеличава атриалото налягане и допринася за разширяването на лявото предсърдие още в ранния следоперативен период, както показват резултатите от изследването на Xie et al 2012 a).

В проведеното от нас проучване се вижда значително повишаване на LAVI при пациентите в сравнение с изходните стойности още след 6-та седмици след имплантацията (фигура 20). Това потвърждава изключително ранното настъпване на промените в налягането в ЛП, в резултат на провокираната асинхронна сърдечна контракция, което води и до нарастване на обема му. Подобни резултати са изнесени и при сравняване на група пациенти с апикална деснокамерна стимулация и такива с НВР (His Bundle Pacing), където сърдечната контракция се осъществява в резултат на електрическо активиране на нативната проводна система. На 6-тия месец след имплантацията се наблюдава значително повишаване на LAVI в групата с апикална деснокамерна стимулация и намаляване в групата с НВР (Michalik et al., 2021). Силно впечатление прави също, че ЛП обем продължава да нараства при липса на други ЕхоКГ нарушения, поради което считаме, че е свързано с променената синхронност на ЛК и

ремоделирането на ЛП не е едномоментно явление (Фигура 20). Данните от MOST (MOfde Selection Trial), изнесени още преди 10 години, категорично асоциират деснокамерното пейсиране с новоизявила се ПМ (Sweeney et al., 2003). Проучването доказва, че за всеки 1% деснокамерна стимулация, риска от ПМ се увеличава с 1%, като тази зависимост запазва линеен характер с времето до достигане на 85% стимулация. Подобни резултати има и от други студии, където ЛП обременяването при апикалната деснокамерна стимулация води до повишаване на риска от новоизявило се ПМ (Sanalaga et al., 2011; Xie et al., 2012b).

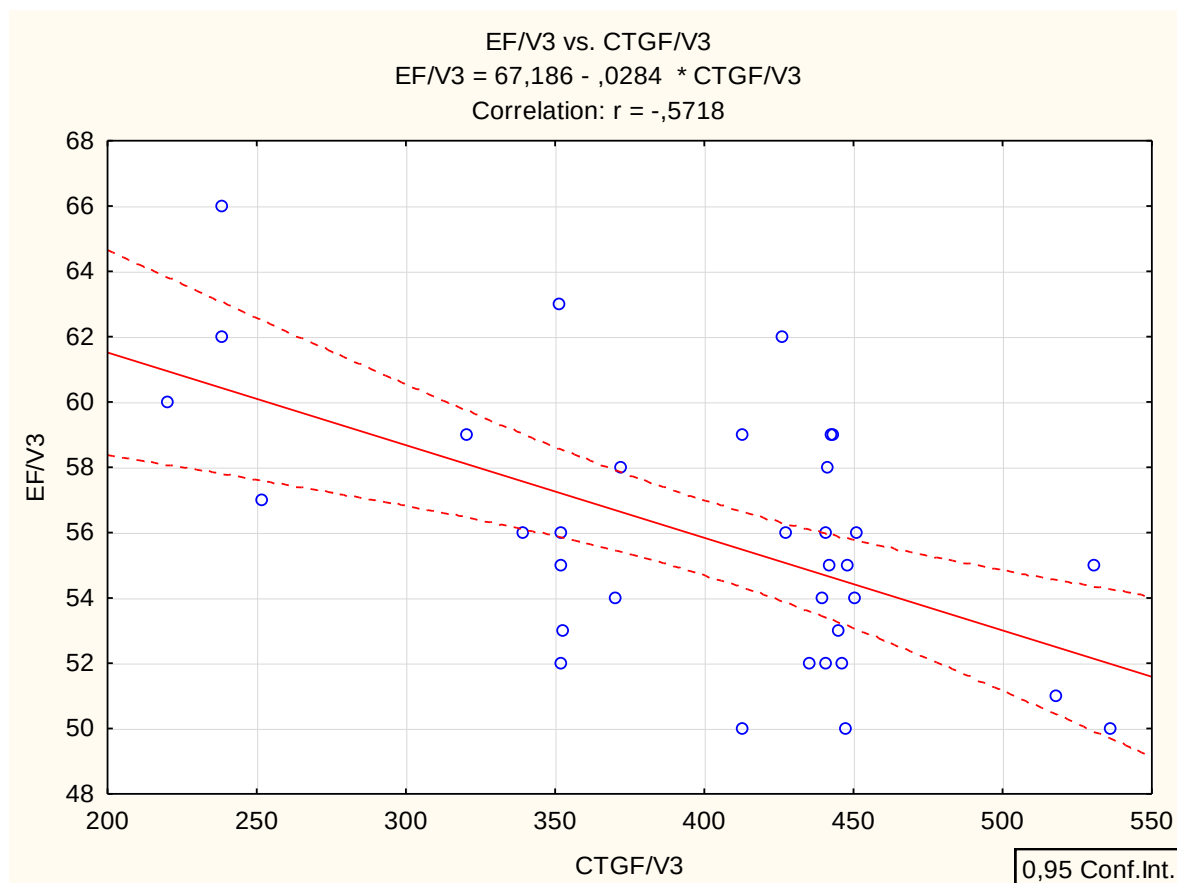
Това изнася на преден план значимостта от проследяване на обемите на ЛП при пациенти с имплантиран кардиостимулатор и стратифициране на риска от предсърдна аритмия.

5. Зависимост на промените в ехокардиографските показатели от маркерите за фиброзна активност

В настоящия дисертационен труд беше използвана проста линейна регресия за моделиране на връзката между показателите CTGF и EF, CTGF и LAVI, TGF и EF, TGF и LAVI, PICP и EF, както и между EF и QRS. Използвайки уравнението на простата линейна регресия с един предиктор, създадохме модели за прогнозиране на промените в изследваните показатели в зависимост от регистрираните ехокардиографски показатели. Оценката на адекватността на тези модели беше извършена чрез получените коефициенти r (корелационен коефициент) и r^2 (коефициент на детерминация).

След проведения анализ беше установена добра линейна зависимост ($r = -0.57$; $r^2 = 0.33$) между стойностите на CTGF и EF (фигура 21). Адекватността на модела се потвърждава от получените p -стойности за коефициентите: $p(b_0) < 0,05$ и $p(b_1) < 0,05$.

Коефициентът на корелация е $r = -0,57$, което означава, че зависимостта е обратно пропорционална (намаляваща). От коефициента на детерминация $r^2 = 0,33$ следва, че 33% от измененията в EF могат да бъдат обяснени от съответните изменения в CTGF.



Фиг. 21. Графичното представяне на моделната зависимост получена с проста линейна регресия за стойностите на CTGF и EF при трета визита

Въпреки че фините механизми за диастолната дисфункция на лявата камера не са напълно изяснени, увеличаването на сърдечната фиброза и цитокиновата активация са доказани фактори за развитие и прогрес на нейната изява (Schelbert et al, 2014).

Сред изследваните цитокини и фиброзни маркери, CTGF и TGF- β 1 се открояват като едни от най-представителните и през последните години са таргет при терапевтичното повлияване на сърдечната фиброза (Dai et al., 2011).

Повишените стойности на CTGF са приет биомаркер за систолна дисфункция при пациенти с хронична сърдечна недостатъчност (Koitabashi et al., 2008). Проведени изследвания доказват сигнификантна корелация между нивата на CTGF и BNP с тези на ехокардиографският индекс на левокамерното налягане на пълнене в ранната диастолна фаза (E/E') при пациенти с прояви на сърдечна неостатъчност.

Тези резултати се потвърждават и от нашето проучване, където установихме значима обратно пропорционална корелация между нивата на CTGF и промените EF на лявата камера (фигура 21). Въпреки липсата на сигнификантна динамика в EF при проследяване на стойностите в пациентската група е важно да се отбележи

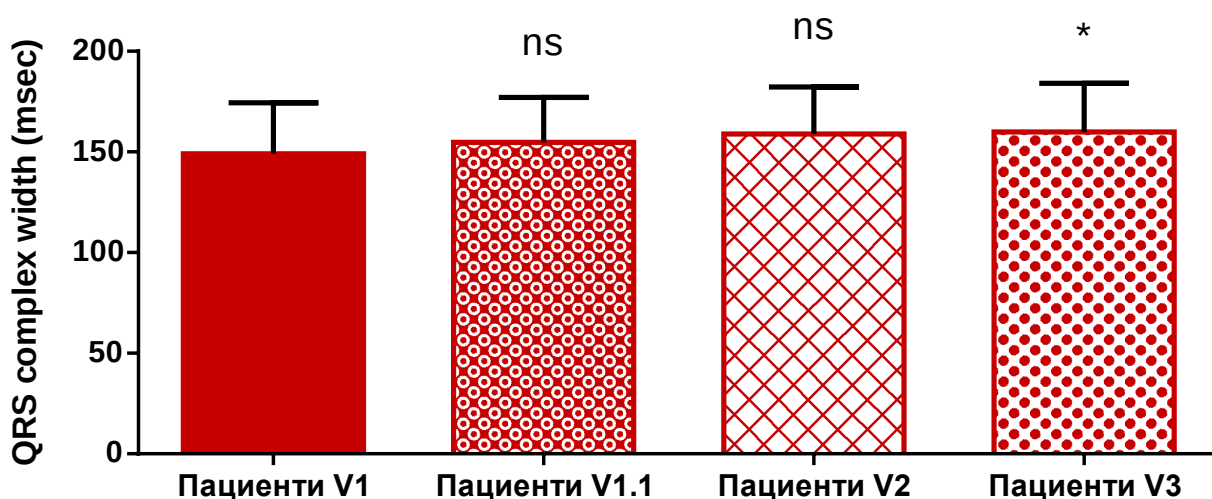
необходимостта от провеждане на по-продължително изследване за потвърждаване на тези начални промени.

Данни от други изследвания също демонстрират позитивна корелация между нивата на CTGF и екстрацелуларния обем, определен с помощта на ядрен магнитен резонанс, при пациенти с умерено намалена и запазена фракция на изтласкване (Behnes et al., 2014).

Тези резултати, заедно с данните от нашето проучване, потвърждават, че CTGF е надежден биомаркер за оценка на сърдечната фиброза и нейното въздействие върху сърдечната функция при изследваните пациенти.

6. Промени в ширината на пейсирания QRS комплекс.

От фигура 22 става ясно, че няма сигнификантна разлика в ширината на пейсирания QRS комплекс между стойностите на 6 седмица (V1.1) и изходните (V1) ($154,80 \pm 3,37$ vs $149,00 \pm 3,80$ msec, $p > 0,05$). На последващата визита, на 12-та седмица (V2), се регистрира повишение на стойностите в сравнение с изходните, но разликата не достига статистическа значимост ($158,89 \pm 3,52$ vs $149,00 \pm 3,80$ msec, $p > 0,05$). При проследяване на 24-та седмица проследяване, величината се повишава и разликата достига статистическа значимост в сравнение с изходните стойности ($159,92 \pm 3,83$ vs $149,00 \pm 3,80$ msec, $p < 0,05$).



Фиг. 22. Съпоставяне на стойностите на QRS в пациенската група: (пациенти V1- изходни стойности на показателя; пациенти V1.1 – стойности на 6-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти V2- стойности на 12-та седмица след имплантацията на ПЕКС; пациенти – V3- стойности на 24-та седмица след имплантацията на ПЕКС; *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$; ns- статистически незначима разлика)

Резултатите от нашето изследване показаха, че след имплантация на ПЕКС с електрод в апекса на ДК се установява тенденция на разширяване на пейсирания QRS комплекс, регистриран с повърхностна ЕКГ по време на последващите визити. На 12-та седмици след имплантацията, QRS комплексът е с увеличена продължителност в сравнение с изходните стойности, но без статистическа значимост ($p=0.06$). На 24-та седмици, тенденцията към нарастване се поддържа, и разликата с изходните стойности вече с гранична стойност на p ($p=0.048$).

Пейсирането от апекса на дясната камера води до деполяризация на сърдечния мускул, като импулсът се предава по кардиомиоцитите, а не по проводната система на сърцето, което води до забавяне и асинхронна левокамерна контракция. Провеждането по нативната проводна система се осъществява за средно около 80 мсек, като за норма се приемат стойности от 92.7 ± 9.3 мсек за мъже и 87.1 ± 8.7 мсек за жени (Macfarlane & Lawrie, 1989). Миокардната контракция в резултат на електрическото активиране на деснокамерния апекс е достатъчна за поддържане на ударния обем и стабилизиране на хемодинамиката при пациенти с пълен атриовентрикуларен блок, но не е механично физиологична. Това поставя пациентите в риск от развитие на левокамерна дисфункция, диссинхротия и PICM (pacemaker induced cardiomyopathy) (Lee et al. 2019). Данни от проследяване на пациенти с постоянна апикална деснокамерна стимулация сочат, че разширяването на пейсирания QRS комплекс над 150 мсек се свързва с нарастнала необходимост от хоспитализация, по повод декомпенсирана СН и спад във фракцията на изтласкване на лявата камера (Khurshid et al., 2016). Тази група пациенти е проследена за период от средно 3.4 години, като редуцията във фракцията на изтласкване на лявата камера се регистрира средно след втората година. Важно е да отбележим, че в нашето изследване се регистрира изключително ранна тенденция на разширяване на продължителността на пейсирания QRS комплекс, което може да стои в основата на редуцията на помпените параметри в по-дългосрочен план. Развитието на левокамерна дисфункция след имплантация на ПЕКС е индикация за реимплантация с надграждане към система за ресинхронизираща терапия (CRT) (Glikson et al. 2021). Данни от проследяване на пациенти с PICM показват, че имплантацията на CRT води до обратно възстановяване на левокамерната дисфункция при над 70% от пациентите в рамките на 1 година (Khurshid et al., 2018). *Това потвърждава тезата, че пейсмейкър индуцираната асинхронна камерна контракция играе основна роля в развитието на систолна дисфункция на лявата камера.*

7. Заключениено обсъждане

Обобщеният анализ на получените резултати ще позволи да се анализира промяната във фиброзния статус и как това се отразява на сърдечната функция при пациенти след имплантация на двукухинен електрокардиостимулатор. При интерпретиране на резултатите се акцентира върху следните факти:

- Фиброзната активност се проследява за период от 6 месеца, което позволи да се характеризира в динамика промяната в показателите при пациенти след имплантиран двукухинен електрокардиостимулатор.
- Изследвани бяха, както сигнални молекули, отговорни за отключване на профиброзното състояние, така и маркери за колагенов синтез. И четирите изследвани показатели са с доказана представителност по данни от публикации в литературата до момента.
- Фиброзната активност се проследи в динамика както в пациентската така и в контролната групи. Това позволи да се съпоставят двете групи като се взима под внимание и ефекта на естествените процеси на стареене на организма върху цитокиновата активност и колагеновия синтез. Също така всички селектирани за проучването пациенти бяха без тежка съпътстваща патология, като така се минимизираха външните фактори, които могат да активират фиброзната система.
- Проследиха се ехокардиографски показатели, доказали своята информативност за оценка на сърдечната систолна и диастолна функция. Динамиката в изследваните ехокардиографски параметри може да се използва за индиректна оценка на ефекта на повишеното колагеново отлагане в миокарда върху сърдечната функция при пациенти след имплантиран ПЕКС.

За хода на цялото проучване изключително значение има фактът, че изходно нямаше разлика в стойностите на изследваните показатели между пациенти и контроли. При проследяване на серумните нива на изследваните молекули се регистрира изключително рано повишаване спрямо изходните при CTGF ($p < 0.001$), TGF- $\beta 1$ ($p < 0.001$), PICP ($p < 0.05$) и PIIINP ($p < 0.001$) още на 12-та седмица след имплантация на ПЕКС. Резултатите на 24-та седмица показаха задържане на повишените стойности на сигнификантно по-високо ниво при CTGF ($p < 0.001$), TGF- $\beta 1$ ($p < 0.001$) и PICP ($p < 0.001$). Тези на PIIINP също бяха по-високи от изходните, но разликата не достигна сигнификантна значимост ($p > 0.05$). Това ни дава основание да предположим, че

имплантацията на двукухинен електрокардиостимулатор провокира активация на фиброзната система, което настъпва рано още на 12-та седмица след процедурата и се задържа до 6 месеца след това.

За правилната интерпретация на резултатите е важно да се отбележи, че включените пациенти в изследването нямаха тежка съпътстваща патология. Това минимизира риска от външно въздействие върху фиброзната система и евентуално повлияване от странични фактори.

В съвременната популация артериалната хипертония е изключително често срещано заболяване, като с напредване на възрастта се увеличава нейното превалиране до над 50% в Световен мащаб (Mills & Stefanescu, 2020). Поради това при включените пациенти в проучването се допусна наличие на до I степен добре контролирана артериална хипертония според съвременните препоръки (Williams et al., 2018). След селектирането им за изследването при всички участници се модулира наличната антихипертензивна терапия. За контрол на артериалното налягане се назначиха хидрохлоротиазид, амлодипин и метилдопа в необходимите дози. По този начин се минимизира ефекта на антихипертензивната терапия върху РААС и съответно фиброзната система в организма. Това позволява да се предположи, че промяната в стойностите на изследваните показатели най-вероятно е провокирано от имплантацията на ПЕКС.

За да се оцени ефекта на апикалната деснокамерна стимулация върху функцията на сърцето се проследиха няколко ехокардиографски показатели а именно LVESV, LVEDV, EF и LAVI, както и се регистрира динамиката в ширината на пейсирания QRS комплекс от повърхностната ЕКГ.

При анализ на резултатите се вижда, че има тенденция на увеличаване на стойностите на LVESV ($p=0.15$) (Таблица 5) и намаляване на EF ($p>0.05$) (Таблица 5), но тези промени не достигат сигнификантна значимост. Като причина за това може да се предположи сравнително краткият период на проследяване, за да се провокира сигнификантно структурно ремоделиране на лявата камера.

Резултатите от проследяване на LAVI обаче, показва изключително ранното му увеличаване в сравнение с изходните стойности още на шестата седмица след имплантацията на ПЕКС ($p<0.001$), като това увеличение се задържа до шестия месец. Обемът на лявото предсърдие е доказан и надежден показател отразяващ повишеното налягане на пълнене на ЛК при липса на сигнификантна клапна патология (Lang et al., 2015). Пейсирането от апекса на ДК провокира асинхронна камерна контракция, като това води до непълноценно изпразване на ЛК, функционална митрална регургитация,

прояви на диастолна дисфункция и увеличаване на следното варварането на лявото предсърдие (Xie et al., 2012 a). Въз основа на това може да се предположи, че това стои в основата на установеното от нас изключително ранно сигнификантно увеличаване на обема на ЛП още на шестата седмица при пациентите след имплантация на ПЕКС.

Анализът на ширината на QRS комплекса в динамика при пациентите след имплантацията на ПЕКС в проведеното от нас проучване показва категорична тенденция на увеличаване, като на 24-тата седмица то достига статистическа значимост спрямо изходните стойности ($p < 0.05$).

Данните за разширен QRS комплекс при пациенти с налична сърдечна патология е надежден маркер за предикция на усложнения, като е лесно приложим и с ниска вариабилност на резултата (Shamim et al., 2002). Също така, според други проучвания, има категорична връзка между разширения QRS комплекс и наличието на дифузна миокардна фиброза (Nazarian et al., 2010). *Това позволява да се предположи при изследваните пациенти наличие на връзка между асинхронната камерна контракция провокирана от деснокамерната апикална стимулация, обременяването на лявото предсърдие и активирането на фиброзната каскада.*

Същевременно доколкото нашето проучване установи активиране на колагеновия синтез и начални белези за развитие на сърдечна дисфункция, се поставя въпросът за възможностите за терапевтично повлияване с цел подобряване на прогнозата на тази група пациенти.

През последните години се търсят активно алтернативи на деснокамерното апикално стимулиране поради категоричните данни за негативното му влияние върху структурата и функцията на сърцето. Въпреки това към момента пласирането на електрода в апекса на ДК е най-широко приложимо. Този метод все още се предпочита от операторите по цял свят поради факта, че техниката е лесно изпълнима и стабилността на параметрите на електрода в дългосрочен план са се доказали във времето. Поради това се явява въпросът за медикаментозно повлияване на фиброзната и предотвратяване на изявата на сърдечна дисфункция при пациентите с ПЕКС.

Към момента няма специфичен антифиброзен медикамент, който да се използва рутинно в клиничната практика, но някои известни молекули за лечение на СН показват обещаващи резултати в тази насока. Такива са представителите на инхибиторите на ангиотензин-конвертиращият ензим (Brilla et al., 2000), бримковият диуретик тораземид (Lopez et al., 2007), минералкортикоидните рецепторни антагонисти (Gueret et al., 2016), наприлизиновият инхибитор сакубитрил (Pfau et al., 2019) и др. Също така, някои от наличните лекарства, които не са предназначени специално за сърдечни заболявания,

имат потенциална роля като антифиброзни агенти, които влияят върху миокардната фиброза (Neuber et al., 2021).

От друга страна данни от метанализ на над 40 проучвания проведени при пациенти с СН и запазена EF (HFpEF) показват противоречиви резултати относно ефекта на лечението с бета-блокери и РААС инхибитори върху смъртността и хоспитализациите (Martin et al., 2018). Данните сочат, че лечението с MRA и ARNI води до умерена редукция на риска от хоспитализация по повод прояви на СН, а лечението с бета-блокери намалява риска от сърдечносъдова смъртност. Подобни резултати обаче не се доказват при лечение с ARB и ACE инхибитори. Сходни резултати има и от други проучвания, където лечението с MRA води до намаляване на риска от прояви на HFpEF и редукция на плазмените нива на маркерите за колагенов синтез PIIINP и PICP (Xiang et al., 2019).

Тези противоречиви резултати могат да се дължат на факта, че както развитието на интерстициална фиброза, така реализирането на HFpEF са с комплексна етиология. Като пример може да се даде резултатът от неотдавна проведено изследване, където се установява, че един от седем пациента с прояви на HFpEF е с доказан див тип на транстеритинова амилоидоза (Gonzalez-Lopez 2015). Това налага прецизен анализ на фенотипната изява и подлежащата патология, за да се оптимизира медикаментозното лечение.

В заключение бихме могли да кажем, че след имплантацията на ПЕКС се наблюдава активиране на фиброзната каскада и усилен колагенов синтез. Регистрират се индиректни данни за развитие на диастолна дисфункция и обременяване на лявото предсърдие, най-вероятно провокирани от асинхронната камерна контракция в резултат на апикалната деснокамерна стимулация. Към момента няма конкретна терапевтична стратегия при тази група пациенти и те се третират според препоръките за поведение при сърдечна недостатъчност. Предвид риска от развитие на съредечна дисфункция, може би е оправдано стриктно ехокардиографско проследяване на пациентите с имплантиран ПЕКС и данни от телеметрията за ДК стимулация над 20 %, за да се моделира терапевтичното поведение своевременно.

V. ИЗВОДИ

1. Настоящото проучване е проведено върху добре балансирани пациентска и контролна група. Това е основание да допуснем, че установената специфична динамика в изследваните показатели с голяма вероятност е тясно свързана с имплантацията на ПЕКС.
2. Основните регулаторни молекули отговорни за колагеновия синтез, TGF- β 1 и CTGF, търпят еднопосочни значими промени в периода на проследяване – силно покачване на стойностите на 12-та седмици след интервенцията, налично и на 24-та седмици след нея.
3. Серумните нива на PICP показват стабилна тенденция на покачване 24 седмици след имплантация на ПЕКС и свидетелстват за засилващ се синтез на специфичния за сърдечния интерстициум колаген тип I през този период.
4. PIIINP се характеризира със специфична динамика в стойностите - значимо покачване рано след интервенцията и възстановяване до изходните нива 6 месеца след нея. Тя е предпоставка да допуснем периперативната тъканна травма като възможен източник за повишения синтез на колаген тип III.
5. Обемът на пациентската извадка е адекватен, за което свидетелства високата статистическа мощност на t-критерий при проверка хипотезата за равенство на средните стойности на изследваните показатели в серум.
6. Обемът на ЛП нараства постепенно в периода на проследяване, видно от четирикратно измерените стойности на показателя.
7. Пейсираният QRS комплекс се удължава, което представя задълбочаваща се електрическа асинхрония и забавяне на скоростта на провеждане в миокарда.

VI. НАУЧНИ ПРИНОСИ

Получените резултати имат оригинален характер.

1. Проведено е първо по рода си клинично проучване върху фиброзния процес след имплантация на ПЕКС, като са изследвани едновременно и в динамика сигнални профиброзни молекули и маркери за колагенов синтез.
2. За първи път са представени директни обективни доказателства за усиляване на колагеновия синтез след имплантация на ПЕКС със значимо активиране на основни регулаторни механизми отговорни за него.
3. Установена е специфична динамика в нивата на TGF- β 1, CTGF, PICP и PIIINP, представяща доказателства за миокардния произход на усиления колагенов синтез след имплантация на ПЕКС.
4. Доказано е, че рано (до 6-я месец) след имплантация на ПЕКС започва развитие на структурни и електрофизиологични промени в миокарда.
5. Прецизирани са регулаторни молекули на усиления колагенов синтез след имплантацията на ПЕКС, което предоставя възможност за търсене на нови терапевтични възможности за повлияване на миокардното ремоделиране.

Ограничения на проучването, очертаващи перспективи за бъдещи изследвания

1. Необходимост от провеждане на проучване, където да се обективизира промяната в миокардната фиброза с провеждане на ЯМР при пациенти след имплантиран ПЕКС и как това корелира с динамиката в маркерите за колагенов синтез и регулация.
2. Необходимост от провеждане на проучване за изследване на промяната във фиброзната активност след имплантация на електрокардиостимулатор, където контролната група да са пациенти подложени на сходна малка оперативна интервенция. Така ще се елиминира ефекта на периперативната травма върху динамиката в изследваните маркери.
3. Необходимост от по-дълъг период на проследяване за обективизиране на промените в ехокардиографските показатели.

VII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Пълнотекстови статии

1. **Yoncheva I**, Biserov D, Negreva M. Pacemaker associated reduction of left ventricle systolic function. World Journal of Advanced Research and Reviews, 2021;12(02):048-054
2. **Yoncheva I**, Biserov D, Negreva M. Changes in profibrotic activity in cardiovascular diseases. World Journal of Advanced Research and Reviews, 2021;11(2):093-099
3. Vitliyanova K, Negreva M, **Yoncheva I**, Prodanova K. Relationship between Echocardiographic Characteristics and NT-proBNP in Patients with Dual Chamber Pacemaker: A Prospective Follow up Study. Merit research journal of medicine and medical sciences 2023;11(4):86-9
4. **Yoncheva I**, Negreva M. Relationship between CTGF levels and echocardiographic parameters in patients after permanent pacemaker implantation. World Journal of Advanced Research and Reviews.2023; 20 (3): 1357-1365

2. Участия в конгреси, симпозиуми, конференции

- Участие в “Venice Arrhythmias 2022”- Октомври 2022, Венеция, Италия на тема” TGFBI plasma levels in patients after permanent pacemaker insertion”
- Участие в постерна сесия на конгреса на ДКБ 2022 г. на тема:” Левокамерна дисфункция след имплантация на ПЕКС”.
- Участие в “VII Национален Конгрес по Кардиостимулация и Електрофизиология” 27-29 Октомври 2023 с изнесена презентация на тема:
- “Промени във фиброзната активност след имплантация на постоянен електрокардиостимулатор”.