

**Медицински университет  
„Проф. д-р П. Стоянов”  
Варна**

**Факултет по медицина  
Катедра по вътрешни болести  
УНС по кардиология и ревматология**

**Д-р МАРИЯ НЕГРИНОВА НЕГРЕВА**

**ДИНАМИКА В ОКСИДАТИВНИЯ СТАТУС  
ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПАРОКСИЗМАЛНО  
ПРЕДСЪРДНО МЪЖДЕНЕ**

Автореферат  
на дисертационен труд за присъждане на  
образователна и научна степен  
„Доктор”

Научна специалност Кардиология

Варна  
2014

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

ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА  
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ  
УНС ПО КАРДИОЛОГИЯ И РЕВМАТОЛОГИЯ

**Д-р Мария Негринова Негрева**

**ДИНАМИКА В ОКСИДАТИВНИЯ СТАТУС  
ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПАРОКСИЗМАЛНО  
ПРЕДСЪРДНО МЪЖДЕНЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

Научна специалност КАРДИОЛОГИЯ

Научни ръководители:  
доц. д-р Светослав Георгиев, д.м.  
доц. д-р Атанас Пенев, д.м.

Рецензенти:  
проф. д-р Федя Николов, д.м.н.  
проф. д-р Жанета Тянева, д.м.

Варна, 2014

Дисертационният труд съдържа 153 страници и е онагледен с 11 таблици и 41 фигури. Библиографията включва 239 литературни източника, от които 2 на кирилица и 237 на латиница. Проучването е извършено в Първа клиника по кардиология на МБАЛ „Св. Марина“-Варна.

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 .....2015г. от ..... 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
1.	Предсърдно мъждене – епидемиология и класификация .....	5
2.	Оксидативен статус – същност и показатели. Оксидативен стрес .....	6
3.	Основни изводи от клинични и експериментални проучвания върху оксидативния статус при предсърдно мъждене .....	11
II.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО .....	12
	ЦЕЛ .....	12
	ЗАДАЧИ .....	12
III.	МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ .....	13
1.	Участници в проучването .....	13
2.	Получаване и съхраняване на пробите. Изследвани показатели ....	15
3.	Аналитични методи .....	15
4.	Терапевтична схема, използвана за възстановяване на синусовия ритъм .....	16
5.	Ехокардиографски методи .....	16
6.	Статистически анализ на резултатите .....	17
7.	Предварителни проучвания .....	18
IV.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....	23
1.	Показатели, характеризиращи участниците в проучването .....	23
2.	Резултати.....	27
3.	Заклучително обсъждане .....	46
V.	ИЗВОДИ .....	51
VI.	НАУЧНИ ПРИНОСИ .....	52
VII.	ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....	54
	Пълнотекстови статии в чуждестранни списания .....	54
	Пълнотекстови статии в български списания .....	54
	Резюмета в чужди списания и сборници.....	54
	Участия в научни форуми и конгреси.....	55



## **ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ**

**АКФ** - активни кислородни форми

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - супероксиден анион радикал

**OH·** - хидроксиден радикал

**NO** - азотен оксид

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

**SOD** - супероксид дисмутаза

**CAT** - каталаза

**MDA** - малон диалдехид

**GSH** - глутатион

**GSH-Px** - глутатион пероксидаза

**GSH-Reductase** - глутатион редуктаза

**Glu-6-PhD** - глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа

**NADPH** - никотинамид аденин динуклеотид фосфат (редуцирана форма)

**Cu** - мед

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

### 1. ПРЕДСЪРДНО МЪЖДЕНЕ – ЕПИДЕМИОЛОГИЯ И КЛАСИФИКАЦИЯ

Предсърдното мъждане има богата история, която започва от древен Китай, Египет и Гърция. Легендарният император и лекар Huang Ti (2698-2598 пр. Хр.) описва: “когато пулсът е неправилен и треперещ, а ударите на сърцето се усещат на интервали, тогава импулсът за живот си отива”. В древна Гърция Galenus (129-200г.) отделя основно място на ритмичността на пулса и счита, че нарушенията в него са следствие на различни заболявания. По-късно през Средновековието артериалният пулс остава най-важния диагностичен и прогностичен метод при пациенти със сърдечни заболявания. Първата електрокардиограма, регистрираща предсърдно мъждане, е публикувана от Williem Einthoven (1860-1945г.) през 1906г., а през 1908г. Sir Thomas Lewis (1881-1945) записва ясни f-вълни, резултат от фибрилации на предсърдията. Gordon Moe (1915-1989) доказва, че ритмното нарушение е резултат от множество ориентри вълни на възбуждение. Alessi и Doud установяват електрическо ремоделиране на предсърдията и се заражда тезата, че “предсърдното мъждане поражда предсърдно мъждане”.

Въпреки големия клиничен интерес от векове наред, предсърдното мъждане в наши дни остава най-честото ритмно нарушение, засягащо >1% от общата популация. В Европа повече от 6 млн. души страдат от предсърдно мъждане и се очаква в следващите 50 години броят им да се удвои. Предвижда се до 2050г. то да засегне 15.9 млн. от населението на САЩ. *Данните за нарастващата заболяемост дават основание предсърдното мъждане да се определя като “новата незаразна епидемия”.* Същевременно то увеличава значимо сърдечно-съдовата заболяемост и смъртност, намалява физическия капацитет и когнитивната функция на пациентите. Обичайно има прогресиращ ход и при нелекувани пациенти рецидив на заболяването се наблюдава в около 50% от случаите още до края на първата година. Въпреки лечението, около 10% от пациентите също имат повторна изява на заболяването.

От клинична гледна точка е уместно предсърдното мъждане да бъде класифицирано според представянето и продължителността на епизода на аритмия, тъй като това определя терапевтичния подход и прогнозата на заболяването. Разграничават се пет типа предсърдно мъждане:

1. *Предсърдно мъждане диагностицирано за първи път, независимо от давността му.*
2. *Пароксизмално предсърдно мъждане - Давността на ритмното*

нарушение е не повече от 7 дни и притежава способност за самоограничаване. *Първите 48 часа на пароксизмалното предсърдно мъждене са клинично значими, тъй като позволяват остър опит за регуларизация на ритъма.*

3. *Персистиращо предсърдно мъждене* - Епизодът на аритмия е по-дълъг от 7 дни и изисква прекъсване чрез кардиоверсия (медикаментозна или електрическа).
4. *Продължително персистиращо предсърдно мъждене* - Давността на аритмията е по-голяма от 1 година. Въпреки това е приета стратегия за възстановяване на синусовия ритъм.
5. *Перманентно предсърдно мъждене* - Уместен е адекватен контрол на сърдечната честота при покой и физически натоварвания.

Терапевтичният подход при предсърдно мъждене предизвиква особен клиничен и изследователски интерес. Създадените до момента антиаритмични медикаменти, блокери на  $\beta$ -адренергични рецептори и/или на различни йонни канали, както и катетърната аблация, имат ограничена ефикасност. Поради тази причина експерименталните изследвания в последните години са насочени към откриване на интимните механизми, свързани с изявата и рецидивите на ритъмното нарушение.

## 2. ОКСИДАТИВЕН СТАТУС – СЪЩНОСТ И ПОКАЗАТЕЛИ.

### ОКСИДАТИВЕН СТРЕС

Човешкият организъм е аеробен организъм. В него естествено се генерират различни активни кислородни форми (АКФ), обуславящи нивото на прооксидантните процеси. Оксидативният статус на организма се определя *едновременно* от интензитета на *прооксидантните процеси* и състоянието на антиоксидантната защитна система. *Нарушеният баланс в организма между генериране на АКФ и способност на антиоксидантната защитна система адекватно да ги неутрализира, се нарича „оксидативен стрес“.* *За задълбочено и надеждно изследване на оксидативния статус е необходимо определяне както на прооксидантните, така и на антиоксидантните му компоненти.* Наличието на взаимовръзка между установени оксидативни промени при дадено заболяване и самото заболяване, е редно да се докаже чрез *изследване на показателите в динамика.*

*Оксидативният статус може да се изследва и оцени чрез:*

1. *Директно измерване **нивата на АКФ.***
2. *Изследване на **количеството биомолекули, променени под действието на АКФ.***

### 3. *Определяне на състоянието на антиоксидантната защитна система.*

Всеки един от тези показатели има своите специфични характеристики, които са разгледани по-долу.

#### **Активни кислородни форми (АКФ)**

АКФ са високо реактивни и нестабилни молекули, образувани вследствие на частична редукция на молекулния кислород ( $O_2$ ). Източниците на АКФ могат да бъдат ендогенни (митохондрии, NADPH-оксидаза, NO-синтетаза и др.) и екзогенни (UV-радиацията,  $\gamma$ -радиацията, редица храни, медикаменти и др.). В ниски до умерени количества АКФ са есенциални за много процеси в човешкия организъм. При повишена продукция, те реагират лесно с липиди, белтъци и ДНК молекули и нарушават тяхната структура. Това води до възникване на клетъчни увреди и оксидативен стрес.

Директното измерване на АКФ е един от методите за определяне на оксидативния статус. *Повечето АКФ обаче са изключително високореактивни, с нестабилна химическа структура и много кратък полуживот. Всичко това затруднява изследването им в клиничната практика и го прави по-приложимо в експериментални условия. Ето защо при оценка на оксидативния статус обичайно не се изследват АКФ, а ефектите от тяхното действие върху организма.*

#### **Биомолекули, модифицирани под действието на АКФ. Липидна пероксидация**

Ключови биологични молекули като ДНК, протеини и липиди, могат да бъдат неблагоприятно повлияни от АКФ. От тях изключително податливи на действието им са липидните биомолекули. Процесът на окисление се нарича липидна пероксидация и по настоящем се смята за основния молекулен механизъм, отговорен за оксидативните увреди на организма. *Продуктите на липидна пероксидация се използват като биомаркери за оценка на прооксидантните процеси в организма, респективно за оценка на оксидативния статус.* Малон диалдехидът (MDA) е основният и най-изучаван продукт на вторичното разграждане на полиненаситените мастни киселини. Той е един от най-често използваните биомаркери за определяне нивата на липидна пероксидация в човешкия организъм.

Въпреки, че продуктите от окислителното разграждане на различните биомолекули като ДНК, РНК, белтъци или липиди, характеризират индиректно прооксидантните процеси на организма, *изключителната им стабилност ги прави надеждни маркери за оценка на оксидативния статус*



## Превантивни антиоксиданти

### Церулоплазмин

Церулоплазминът представлява  $\alpha_2$ -гликопротеин, който свързва около 95% от общото количество циркулираща мед (Cu) в кръвта. Три от инкорпорираните седем атома Cu в молекулата му образуват т. нар. „тринуклеарен клъстер“, отговорен за ензимната активност на протеина. Независимо от „мед-транспортиращата функция“, *церулоплазминът е важен ензимен антиоксидант в плазмата. Активността му има висока чувствителност към нивата на Cu и освен като показател на антиоксидантната система, се използва и при определяне на медния статус.*

### Прихващащи (основни) антиоксиданти

Основните антиоксиданти се делят на две групи:

- ензимни (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза, глутатион редуктаза, глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа);
- неензимни (липорастворими -  $\alpha$ -токоферол и  $\beta$ -каротен; водоразтворими - *vitamin C*, тиолови съединения, флавоноиди).

### Супероксид дисмутаза (SOD)

SOD е основен ензим на антиоксидантната защитна система. *Активността му е определяща при елиминирането на супероксидния анион радикал ( $O_2^-$ )* (Фигура 3). Известно е, че именно  $O_2^-$  е инициалната АКФ, от която започва верижното генериране на всички останали. *Поради тази причина дисмутацията на  $O_2^-$  от SOD е от първостепенно значение за организма.*

### Каталаза (CAT)

*Заедно със SOD, CAT се определя като първа линия на антиоксидантна защита на организма.* Тя има водещо значение при елиминирането на водороден пероксид ( $H_2O_2$ ) (Фигура 3).

### Глутатион пероксидаза (GSH-Px)

GSH-Px катализира редуцирането на органични хидропероксидази и  $H_2O_2$  до съответните алкохоли или вода (Фигура 3). *Тя е изключително важен показател за оценка на оксидативния статус на организма. Промяна в активността ѝ е ранен белег за промяна в оксидативния баланс на организма.*

### Глутатион редуктаза (GSSG-Reductase)

Регенерирането на редуциран глутатион (GSH) се извършва от ензима GSSG-Reductase (Фигура 3), възможно единствено в присъствието на NADPH. NADPH се доставя основно от пентозофосфатния цикъл с участието на ензима глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (Фигура 3).

### Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа (Glu-6-PhD)

*Glu-6-PhD е основният за клетката източник на NADPH.* Възстановя-

ването на неензимния антиоксидант GSH, както и активността на CAT, са зависими от нивата на NADPH. Тези факти *определят съществената роля на Glu-6-PhD в антиоксидантната защитна система. Промени в активността ѝ се асоциират с промени в редокс състоянието на клетката.*

### **Глутатион (GSH)**

*GSH е изключително важна част от антиоксидантната защитна система на организма. Ролята му на ключова молекула се определя от два факта: GSH е основна съставна част на неензимната защита и същевременно задължителен ко-фактор и лимитиращ субстрат на един от основните антиоксидантни ензими в човешкия организъм GSH-Px. Нивото на GSH в плазма и еритроцити е един от основните индикатори за оксидативния статус на организма. Изчерпването му се асоциира с развитие на оксидативен стрес.*

### **Метални йони като ко-фактори на важни антиоксидантни ензими**

#### **Мед (Cu)**

Медта е есенциален микроелемент за човешкия организъм. Той участват в активния център на антиоксидантните ензими Cu/Zn-SOD и церулоплазмин. Дефицитът му би могъл да доведе до намаление на активността на тези ензими. Серумната или плазмената концентрация на медта е често използван лабораторен показател за оценка на медния статус.

*Изследването на антиоксидантната система е индиректен, но надежден начин за оценка на оксидативния статус на организма. Предвид многокомпонентната същност на антиоксидантната защита, правилната оценка на оксидативното състояние изисква едновременно определяне на няколко нейни компоненти.*

***Като обобщение на специфичните характеристики на показателите на оксидативния статус е редно да подчертаем, че директното измерване на АКФ в клиничната практика е „непрактично“. Обичайно оценка на оксидативния статус се прави въз основа на: състояние на антиоксидантната система и биомолекули, модифицирани от АКФ - най-често нива на липидна пероксидация.***

Нарушен оксидативен статус е установен при редица автоимунни и неопластични заболявания. Известно е също така, че оксидативният стрес има отношение към развитието на ендотелната дисфункция, руптурата на атеросклеротични плаки, изявата на сърдечна недостатъчност, хеморагичния мозъчен инсулт и др. Клинични и експериментални проучвания са проведени и върху оксидативния баланс при прердсърдно мъждене.

### **3. ОСНОВНИ ИЗВОДИ ОТ КЛИНИЧНИ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ОКСИДАТИВНИЯ СТАТУС ПРИ ПРЕДСЪРДНО МЪЖДЕНЕ**

1. Натрупани са данни за развитие на оксидативен стрес при предсърдно мъждене. За тях обаче е необходимо да се отбележи следното:
  - 1.1. Значителна част от резултатите са получени в условия *in vitro*, и не могат механично да бъдат пренесени за човешкия организъм.
  - 1.2. Проучванията при хора анализират основно персистиращо и/или перманентно предсърдно мъждене, а изследваните популации са предимно с придружаващи заболявания, които се асоциират с оксидативен стрес.
  - 1.3. Единични и недостатъчни са проучванията върху пароксизмално предсърдно мъждене при хора. Оксидативните показатели са изследвани едновременно. Най-често те са единични и характеризират оксидативния статус едностранно (прооксидантни процеси или антиоксидантна защитна система).
2. Липсва клинично проучване върху оксидативния статус на пациенти в ранните часове от изявата на предсърдното мъждене.
3. Липсва клинично изследване на оксидативния статус в динамика (по време на ритъмното нарушение и след възстановяването на синусов ритъм), което комплексно да анализира прооксидантната и антиоксидантната система.

Направените изводи са аргумент в полза на необходимостта от комплексно проучване на оксидативния статус в динамика при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене.



## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО

### ЦЕЛ

Да се проучи оксидативния статус при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене и се проследят промените в него след възстановяване на синусовия ритъм.

### ЗАДАЧИ

За постигане на тази цел бяха набелязани следните задачи:

1. Да се изследват прооксидантните процеси по време на предсърдно мъждене, двадесет и четири часа и двадесет и осем дни след възстановяване на синусовия ритъм, като се определят нивата на липидна пероксидация в плазма и еритроцити (PI-MDA; Er-MDA).
2. Да се проучи състоянието на антиоксидантната защитна система по време на предсърдно мъждене, двадесет и четири часа и двадесет и осем дни след възстановяване на синусов ритъм чрез:
  - A. Определяне плазмени и еритроцитни нива на основния неензимен антиоксидант GSH (PI-GSH; Er-GSH).
  - Б. Измерване в еритроцити активността на основните антиоксидантни ензими SOD, CAT, GSH-Px и Glu-6-PhD.
  - В. Определяне активността на церулоплазмина – основен ензимен антиоксидант в плазмата и серумните нива на медта – негов ко-фактор.

### III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

#### 1. УЧАСТНИЦИ В ПРОУЧВАНЕТО

Проучването беше проведено в Интензивно кардиологично отделение на Първа клиника по кардиология към МБАЛ “Св. Марина” – Варна за периода 10.2010г. – 05.2012г. след одобрение от Комисията по етика на научните изследвания (№35/29.10.2010) към същата болница и в съответствие с изискванията на Хелзинкската декларация. Участниците в него бяха включени след предварително подписване на информирано съгласие за участие.

Скринирани бяха само пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене с давност < 48 часа до момента на хоспитализация, което позволява остър медикаментозен опит за регуларизация на ритъма. Давността на ритъмното нарушение беше прецизирана въз основа на подробно снета анамнеза. За проучването бяха скринирани само пациенти, които ясно можеха да определят началото на заболяването. Диагнозата „предсърдно мъждене“ беше приемана едва след обективизирането ѝ от електрокардиографско изследване, направено при хоспитализацията на пациентите.

От общо 338 скринирани пациенти (*в тази бройка не са включени пациентите от предварителните проучвания*), поради изключващи критерии (*виж изкл. критерии*), от проучването отпаднаха 259 пациенти. При останалите 79 пациенти бе направен медикаментозен опит с *propafenone* за прекъсване на ритъмното нарушение. От тях 56 (31 мъже, 25 жени) възстановиха и трайно задържаха синусовия ритъм до дехоспитализацията.

Впоследствие бяха извършени два контролни прегледа – на седми - десети ден, както и на двадесет и осми ден след прекъсване на аритмията. Бяха регистрирани ЕКГ записи и пациентите подробно разпитвани за повторна поява на „сърцебиене“ или подобно усещане. Не бяха установени рецидиви на ритъмното нарушение.

За изравняване на половата структура бяха последователно селектирани 51 пациенти (26 мъже и 25 жени) на средна възраст  $59.84 \pm 1.60$  г. (31-77 г.).

При сформирание на контролната група бяха приложени идентични изключващи критерии, както при пациентската група (*виж по-долу*). По отношение на факторите, за които е известно, че оказват влияние върху оксидативния стрес, а именно: пол, възраст (по декади), body mass index (BMI), вредни навици, придружаващи заболявания и провеждано за тях лечение, контролната група беше създадена като идентична на пациентската. Така от общо 169 скринирани (*в тази бройка не са включени контролите от*

предварителните проучвания), 52 бяха селектирани като контроли за проучването. Средната им възраст беше  $59.50 \pm 1.46$  г. (30-76 г.), като мъжете и жените бяха по равен брой 26 (50%). До момента на проучването контролите нямаха анамнестични или електрокардиографски данни за предсърдно мъждене.

*Подборът на участниците в проучването (пациенти и контроли) целеше в максимална степен да елиминира или изравни между двете групи факторите, оказващи влияние върху оксидативния статус.*

### **Исключващи от проучването критерии:**

1. сърдечно-съдови заболявания: ИБС; хронична сърдечна недостатъчност; неконтролируема хипертонична болест; имплантиран дивайс за лечение на ритъмно-проводни нарушения; възпалителни заболявания на сърцето; вродени сърдечни пороци; умерени или тежки придобити клапни пороци; кардиомиопатии;
2. други заболявания: бъбречна или чернодробна недостатъчност; заболявания на ЦНС; възпалителни и инфекциозни заболявания през последните три месеца; неопластични или автоимунни заболявания; хронични белодробни страдания; заболявания на ендокринната система (с изключение на захарен диабет тип 2, неинсулинозависим, с добър контрол, неналагащ промяна в лечението му); затлъстяване с  $\text{BMI} > 35$ ;
3. прием на хормонозаместителна терапия или контрацептиви, бременност, системен прием на аналгетици в т.ч. и НСПВС;
4. персистиране на ритъмното нарушение след 24 часовата схема на приложение на *propafenone*; възстановяване на синусов ритъм чрез електрическо кардиоверсио; рецидив на предсърдно мъждене до края на проучването.

От сформирания вече пациентска група бяха последователно селектирани 33 пациенти (17 мъже, 16 жени, средна възраст  $60.03 \pm 1.93$ ) за изследване на два от показателите – активност на церулоплазмин и серумни нива на мед. Като контролна група бяха използвани 33 участници (17 мъже, 16 жени, средна възраст  $59.27 \pm 1.72$ г.) от създадената вече контролна група от 52 участници. Критериите за сформирането ѝ бяха идентични на вече описаните.

## 2. ПОЛУЧАВАНЕ И СЪХРАНЯВАНЕ НА ПРОБИТЕ. ИЗСЛЕДВАНИ ПОКАЗАТЕЛИ

Количеството кръв вземано за всяка кръвна проба беше 8 мл, разпределено по равно в два вакутейнера (хепаринов вакутейнер-VACUETTE/4.0 ml/Li Нер и серумен вакутейнер- VACUETTE/4.0/Serum Sep). Плазма, еритроцити и серум бяха получени, замразени и съхранени съобразно използваните методики.

При всеки един от участниците (пациент или контрола) бяха изследвани десет показатели. В плазма бяха определени *MDA*, *GSH* и *активност на церулоплазмин*, а в серум – *нива на мед*. В 5%-на еритроцитна суспензия също бяха определени нивата на *MDA* и *GSH*, както и активността на ензимите *SOD*, *CAT*, *GSH-Px* и *Glu-6-PhD*.

В пациентската група показателите бяха изследвани трикратно – непосредствено след постъпване в отделението (начални стойности), двадесет и четири часа и двадесет и осем дни (4 седмици) след възстановяване на синусовия ритъм. В контролната група показателите бяха определени еднократно.

## 3. АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ

Количеството хемоглобин (Hb) в еритроцити (g/100 ml) беше определяно спектрофотометрично по изискванията на Mercotest 3317.

Количеството белтък в плазма (mg/ml) беше определяно спектрофотометрично по метода на Lowry et al.

Липидната пероксидация беше определяна спектрофотометрично по метода на Gilbert, а получените стойности на MDA в плазма и еритроцити съответно изразявани като nmol/mg protein или nmol/mg Hb.

Нивата на общ глутатион в плазма и еритроцити бяха определяни спектрофотометрично по метода на Tietze, а резултатите представени съответно в ng/mg protein или ng/mg Hb.

Активността на SOD беше определяна спектрофотометрично по метода на Beauchamp & Fridovich и изразена в U/mg Hb.

Определяне активността на ензима CAT беше направено спектрофотометрично по метода на Aebi и изразена в  $E_{240}/\text{min}/\text{mg Hb}$ .

Активността на ензима GSH-Px беше измервана спектрофотометрично по метода на Gunzler et al и представена в nmol/min/mg Hb.

Активността на GSH-Px беше определена спектрофотометрично по метода на Cartier et al и представена в nmol NADP<sup>+</sup>/min/mg Hb.

Активността на церулоплазмин беше определяна спектрофотометрично по метода на Ravin и изразена като A<sub>530</sub>/mg Hb.

Определяне на мед в серум беше извършено чрез атомноабсорбционна спектрометрия с пламъков атомизатор.

#### **4. ТЕРАПЕВТИЧНА СХЕМА, ИЗПОЛЗВАНА ЗА ВЪЗСТАНОВЯВАНЕ НА СИНУСОВИЯ РИТЪМ**

За възстановяване на синусовия ритъм беше прилаган *propafenone* по установената за медикамента схема: i.v. 2 mg/kg болус, последван от инфузия в доза 0.0078 mg/kg/min за 120 мин. При персистиране на ритъмното нарушение, лечението с *propafenone* беше продължавано р.о. в доза 300 mg трикратно през интервал от 8 часа. Общата продължителност на използваната схема е максимално 24 часа. След възстановяване на синусовия ритъм до края на проучването (28 дни след възстановяване на ритъма) всички пациенти преминаваха на поддържаща доза р.о. *propafenone* 150 mg трикратно дневно. До момента няма данни за въздействие на *propafenone* върху оксидативния статус на пациенти с предсърдно мъждене.

В хода на регуларизация на ритъма с *propafenone*, при дванадесет от пациентите беше приложен *metoprolol succinate* 25 или 50 mg od или *bisoprolol fumarate* 2.5 или 5 mg od. Приемът на медикаментите продължи до края на проучването. *Metoprolol succinate* и *bisoprolol fumarate* не оказват ефект върху оксидативния статус на организма.

#### **5. ЕХОКАРДИОГРАФСКИ МЕТОДИ**

Едноразмерна (M-mode), двумерна (B-mode) и Doppler ехокардиография на всички участници в проучването беше извършена с помощта на апарат Aloka ProSound SSD-4000. Всички използвани ехокардиографски методи и направените с тях измервания са съгласно действащите препоръки за оценка сърдечните кухини, предложени и описани от European Association of Cardiovascular Imaging към *Европейското дружество по Кардиология*.

## 6. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

За изчисляване на средни стойности, относителни дялове и централна тенденция (Мо=мода) беше използвана дескриптивна статистика. Тестването на хипотези за равенство на средни стойности и на показатели за относителен дял беше направено чрез t-критерий на Стюdent. Използван беше двустранен t-тест за независими (несдвоени) извадки при ниво на значимост  $p=0.05$ . При получаване на стойности  $p<0.05$  се отхвърля хипотезата за равенство и се потвърждава хипотезата, че разликата между средните е статистически значима.

Използван беше и логистичен регресионен модел, който позволи сред изследваните от нас показатели да се идентифицират статистически значимите, прогностични за поява на пароксизмално предсърдно мъждене, както и да се пресметне прогнозната вероятност, с която при дадена стойност на фактора се очаква да настъпи усложнение.

### Накратко относно модела:

Вероятността за поява или не на усложнение (пароксизмално предсърдно мъждене) зависи от линейната функция:

$$d(x) = B_0 + B_1 x_1 + B_2 x_2 + \dots + B_n x_n$$

където “ $x(x_1, x_2, \dots, x_n)$ ” е вектор от стойности на  $n$ -те изследвани фактора, а “ $B_0$ ” и “ $B_i$  ( $i=1, 2, \dots, n$ )” са коефициентите на модела, които се определят статистически, базирайки се на данните за факторите от извадката, с която разполагаме. След определянето на “ $B_0$ ” и “ $B_i$ ” се получава конкретен вид на линейната функция и чрез нея се **определя вероятността за изява на пароксизмално предсърдно мъждене при зададени стойност на факторите като се използва логистичната функция:**

$$p(d) = \frac{e^d}{1 + e^d},$$

където “ $e$ ” е константа  $e \approx 2,718$  (т. нар. Неперово число).

Чрез нея се дефинира odds ratio (OR):

$$\text{odds ratio} = \left[ \frac{p(d)}{1 - p(d)} \right]$$

което представлява отношение на шансовете за попадане в едната или другата категория (поява или не на усложнението).

Анализът на всички данни беше извършен със специализиран за статистически анализи пакет STATISTICA, Version 10.0, 2010 (StatSoft, Inc., Tulsa,

OK, USA). Резултатите бяха представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната аритметична ( $\bar{x} \pm SEM$ ) или n(%).

## 7. ПРЕДВАРИТЕЛНИ ПРОУЧВАНИЯ

Направеният литературен обзор върху оксидативния статус при пациенти с предсърдно мъждене породи въпроса: има ли ранни промени в показателите на про- и антиоксидантната система при тези пациенти и ако има, какъв е техният характер? Това наложи провеждане на предварително проучване, в което бяха включени 14 участника (7 пациенти и 7 контроли) при описаните по-горе включващи и изключващи критерии. Показателите на оксидативния статус бяха изследвани трикратно: непосредствено след хоспитализацията на пациентите (начални стойности), двадесет и четири часа и седем дни след възстановяване на синусовия ритъм. Промените при постъпване на пациентите в отделението са значими и не търпят съществена промяна до седмия ден след дехоспитализацията (Фигури 12, 16, 18)<sup>2</sup>. Това породи идеята за второ предварително проучване с по-продължителен период на наблюдение – четиринадесет дни след прекъсване на аритмията. В него също бяха включени 7 пациенти и 7 контроли при идентични на описаните вече критерии за подбор на участниците. Резултатите от това проучване показаха тенденция към възстановяване на оксидативния баланс (Фигури 13, 17, 19). *Това бе основание да заложим по-дълъг период на наблюдение (двадесет и осем дни) в основното проучване на дисертационния труд, който би очертал по-ясно характера на установените промени.*

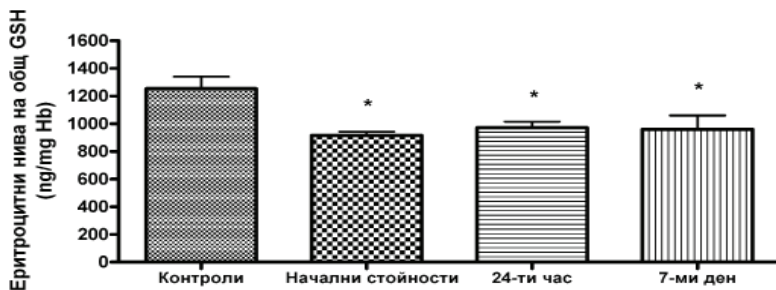


**Фиг. 12.** Предварително проучване - динамика в еритроцитните нива на MDA до седми ден (\* -  $p < 0.05$ ).

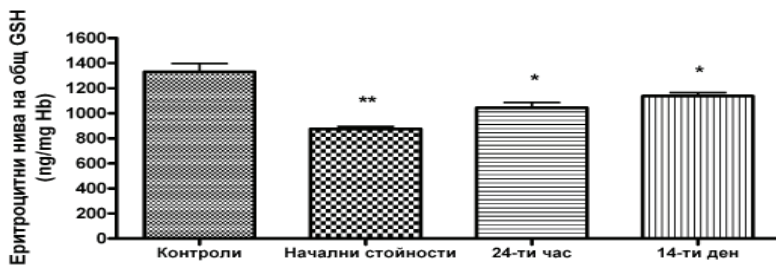
2 Подробно резултатите от предварителните проучвания са изложени в дисертационния труд в глава „Предварителни проучвания“. Номерата на всички показани фигури съответстват на тези в дисертационния труд.



Фиг. 13. Предварително проучване - динамика в еритроцитните нива на MDA до четиринадесети ден (\* -  $p < 0.05$ ).

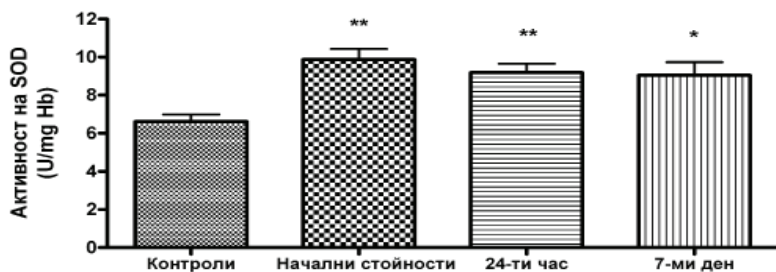


Фиг. 16. Предварително проучване - динамика в еритроцитните нива на общ GSH до седми ден (\* -  $p < 0.05$ ).

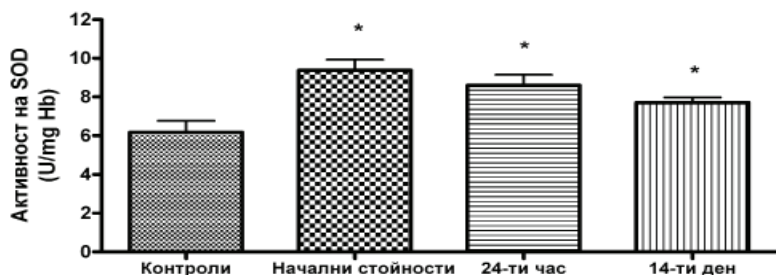


Фиг. 17. Предварително проучване - динамика в еритроцитните нива на общ GSH до четиринадесети ден (\* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.001$ ).





Фиг. 18. Предварително проучване - динамика в активността на SOD до седми ден (\* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.001$ ).



Фиг. 19. Предварително проучване - динамика в активността на SOD до четиринадесети ден (\* -  $p < 0.05$ ).

Конкретните стойности на изследваните показатели при контроли и пациенти (начални стойности, двадесет и четвърти час, седми или четиринадесети ден) от предварителните проучвания, както и нивото на статистическа значимост на установените промени (р-стойности) са представените в Таблица 1 и Таблица 2.

**Таблица 1.** Показатели от предварително проучване, проведено до седмия ден след възстановяване на синусовия ритъм

Изследван показател	Контроли	Начални стойности	P*	24-ти час	P*	7-ми ден	P*
Плазмени нива на MDA (nmol/mg protein)	0.109 ±0.014	0.157 ±0.013	0.03	0.141 ±0.007	0.06	0.140 ±0.008	0.06
Еритроцитни нива на MDA (nmol/mg Hb)	0.460 ±0.089	1.149 ±0.152	0.01	0.818 ±0.064	0.02	0.878 ±0.064	0.01
Плазмени нива на общ GSH (ng/mg protein)	77.800 ±3.818	62.760 ±3.511	0.01	65.060 ±2.377	0.02	62.510 ±5.059	0.03
Еритроцитни нива на общ GSH (ng/mg Hb)	1254.009 ±85.982	916.321 ±27.461	0.01	973.313 ±43.851	0.03	961.298 ±99.668	0.04
Активност на SOD (U/mg Hb)	6.615 ±0.371	9.874 ±0.546	<0.001	9.188 ±0.466	0.0007	9.047 ±0.688	0.01
Активност на CAT (E <sub>240</sub> /min/mg Hb)	4.633 ±0.247	6.842 ±0.564	0.01	6.500 ±0.339	0.0004	6.293 ±0.411	0.01
Активност на GSH-Px (nmol/min/mg Hb)	33.589 ±1.603	24.903 ±1.644	0.01	28.381 ±1.368	0.03	27.571 ±2.168	0.04
Активност на Glu-6-PhD (nmol NADP <sup>+</sup> /min/mg Hb)	2.859 ±0.238	2.173 ±0.0775	0.03	2.014 ±0.213	0.03	2.013 ±0.302	0.04
Активност на церулоплазмин (A <sub>530</sub> /mg protein)	0.067 ±0.004	0.043 ±0.009	0.04	0.043 ±0.009	0.0005	0.047 ±0.002	0.01

*Таблица 2. Показатели от предварително проучване, проведено до четиринадесетия ден след възстановяване на синусовия ритъм*

Изследван показател	Контроли	Начални стойности	P*	24-ти час	P*	14-ти ден	P*
Плазмени нива на MDA (nmol/mg protein)	0.119 ±0.011	0.151 ±0.009	0.03	0.147 ±0.015	0.14	0.136 ±0.011	0.27
Еритроцитни нива на MDA (nmol/mg Hb)	0.492 ±0.089	1.374 ±0.199	0.01	0.896 ±0.106	0.02	0.740 ±0.049	0.04
Плазмени нива на общ GSH (ng/mg protein)	78.991 ±1.535	59.564 ± 4.557	0.01	67.139 ±3.086	0.01	70.523 ±3.599	0.04
Еритроцитни нива на общ GSH (ng/mg Hb)	1331 ±67.293	875.899 ±20.623	<0.001	1044.003 ±42.292	0.01	1138.005 ±28.573	0.04
Активност на SOD (U/mg Hb)	6.171 ±0.596	9.386 ±0.544	0.01	8.604 ±0.541	0.01	7.717 ±0.254	0.04
Активност на САТ (E <sub>240</sub> /min/mg Hb)	4.427 ±0.326	7.577 ±0.384	<0.001	5.737 ±0.500	0.04	5.880 ±0.468	0.02
Активност на GSH-Px (nmol/min/mg Hb)	32.967 ±2.319	24.193 ±1.654	0.01	24.000 ±1.808	0.01	27.093 ±1.142	0.04
Активност на Glu-6-PhD (nmol NADP <sup>+</sup> /min/mg Hb)	2.796 ±0.233	1.978 ±0.164	0.02	1.988 ±0.202	0.03	2.197 ±0.148	0.04
Активност на церулоплазмин (A <sub>530</sub> /mg protein)	0.074 ±0.004	0.035 ±0.004	<0.001	0.043 ±0.004	<0.001	0.058 ±0.007	0.04

*P\** - статистическа значимост на разликата между средните стойности на показателите на контроли и на пациенти при хоспитализацията им, двадесет и четири часа и седем или четиринадесет дни след възстановяване на синусовия ритъм

## IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. ПОКАЗАТЕЛИ, ХАРАКТЕРИЗИРАЩИ УЧАСТНИЦИТЕ В ПРОУЧВАНЕТО

По показателите брой, средна възраст и полова структура, пациентската група беше сравнима с контролната ( $p > 0.05$ ) (Таблица 3). По отношение на придружаващи заболявания, дислипидемия и провеждано лечение (*до момента на хоспитализация*), както и по честота на вредни навици и ВМІ, групата на болните с пароксизмално предсърдно мъждене беше статистически идентична с тази на контролите ( $p > 0.05$ ) (Таблица 4 и 5).

Липсата на статистически значима разлика в лечението между контроли и пациенти при хоспитализацията им, е основание да приемем, че началните промени в оксидативния статус при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене не са следствие на медикаментозното лечение. Нещо повече, в хода на проучването при пациентската група не бяха включвани нови медикаменти, влияещи върху оксидативния баланс на организма (*виж „Терапевтична схема, използвана за възстановяване на синусовия ритъм“*).

Данните от трансторакалното ехокардиографско изследване също не показва статистически значими различия в изследваните показатели между пациенти и контроли ( $p > 0.05$ ) (Таблица 6).

*Считаме, че сформирването на контролна група, идентична на пациентската по посочените показатели (Таблицы 3-6), прави съпоставянето между групите максимално обективно. Това е единственият начин да се елиминира потенциалния „принос“ на: възраст, пол, ВМІ, вредни навици, придружаващи заболявания и провежданото за тях лечение върху оксидативния статус, и да се даде коректа възможност за отчитане на „нето“ ефекта на пароксизмалното предсърдно мъждене върху оксидативния баланс.*

**Таблица 3.** Демографска характеристика на пациентска и контролна група

	Пациенти с ПІМ	Контролна група	P стойности
<b>Брой участници в група</b>	51	52	$p=0.89$
<b>Средна възраст (години)</b>	$59.84 \pm 1.60$	$59.50 \pm 1.46$	$p=0.87$
<b>Мъже/Жени</b>	26/25	26/26	$p=1/p=0.93$

**Таблица 4.** Придружаващи заболявания, дислипидемия и провеждано за тях лечение при пациенти и контроли

	Пациенти с ППМ брой (%)	Контролна група брой (%)	P стойности
<b>Придружаващи заболявания</b>			
Хипертонична болест	37 (72.54%)	34 (65.38%)	p=0.44
Захарен диабет тип 2	3 (5.88%)	2 (3.84%)	p=0.62
Язвена болест на стомаха в ремисия	2 (3.92%)	0	p=0.15
Състояние след хистеректомия*	2 (3.92%)	1 (1.92%)	p=0.54
Доброкачествена простатна хипертрофия	1 (1.96%)	0	p=0.32
<b>Дислипидемия</b>	4 (7.84%)	3 (5.77%)	p=0.69
<b>Класове медикаменти за лечение на хипертонична болест, дислипидемия и захарен диабет</b>			
Бета-блокери (bisoprolol, metoprolol)	19 (37.25%)	17 (32.69%)	p=0.62
АСЕ-инхибитори (enalapril, ramipril, lisinopril)	15 (29.41%)	14 (26.92%)	p=0.78
Сартани (telmisartan, valsartan)	11 (21.57%)	9 (17.31%)	p=0.58
Калциеви антагонисти или диуретици	11(21.56%)	15 (28.84%)	p=0.43
Статини (simvastatin, atorvastatin, rosuvastatin)	4 (7.84%)	3 (5.77%)	p=0.69
Metformin	3 (5.88%)	2 (3.84%)	p=0.62

\*Хистеректомията е извършена преди повече от 2 години и пациентите не провеждат хормонална терапия.

**Таблица 5. Вредни навици и ВМІ при пациенти и контроли**

	<b>Пациенти с ППМ брой (%)</b>	<b>Контролна група брой (%)</b>	<b>P стойности</b>
<b>Вредни навици</b>			
Тютюнопушене**	8(15.69%)	7(13.46%)	p=0.75
Прием на алкохол***	7(13.72%)	6(11.53%)	p=0.74
ВМІ (kg/m <sup>2</sup> )	23.85±0.46	24.95±0.45	p=0.09

\*\*Включените в проучването пушачи определяха себе си като “пушачи при повод” - пушеха не повече от половин кутия цигари седмично. Хоспитализираните болни не бяха пушили минимум 24-48 часа преди началото на аритмията. Изследванията върху контролите, както и тези на 28-мия ден, бяха взети след 48 часов период без тютюнопушене.

\*\*\*Участниците в проучването, съобщаващи за прием на алкохол, приемаха 1-2 питиета/седмично. Хоспитализираните болни не бяха приемали алкохол минимум 48 часа преди началото на аритмията. Изследванията върху контролите, както и тези на 28-мия ден, бяха взети след 48-часов период без прием на алкохол.

**Таблица 6. Резултати от трансторакална ехокардиография**

	<b>Пациенти с ППМ</b>	<b>Контролна група</b>	<b>P стойности</b>
<b>Ехокардиографски показатели</b>			
LVEDD (mm)	52.57±0.58	52.29±0.57	p=0.73
LVESD (mm)	34.43±0.56	34.73±0.48	p=0.69
EF (%)	62.98±0.70	61.54±0.58	p=0.12
IVS (mm) - крайна диастола	10.37±0.23	9.92±0.26	p=0.20
PW (mm) - крайна диастола	10.24±0.21	9.73±0.28	p=0.16
LA обем (ml/m <sup>2</sup> )	22.81±0.45	23.82±0.48	p=0.13
RVEDD (mm)	30.54±1.58	29.17±1.52	p=0.18

Направеният статистически анализ върху давността на предсърдното мъждене до момента на хоспитализация показва, че всички 51 пациенти бяха хоспитализирани между втори и двадесет и четвърти час след началото на аритмията, а най-често на петия час (Мо=5; 10 от всички 51 пациенти).

Нито един от пациентите не беше хоспитализиран след 24-я час. Средната продължителност на епизодите на предсърдно мъждене до момента на хоспитализация беше  $8.14 \pm 0.76$  часа (минимум 2 часа до максимум 24 часа).

Характеристиката на пациентска и контролна група, които бяха сформирани с цел изследване на церулоплазминова активност и серумни нива на мед (33 контроли и 33 пациенти), е представена на Таблица 7. Двете групи бяха статистически идентични по отношение на представените в таблицата показатели ( $p > 0.05$ ). Статистическият анализ показва, че средната продължителност на предсърдното мъждене до хоспитализацията на пациентите беше  $8.64 \pm 1.03$  (от 2 до 24 часа).

*Таблица 7. Пациентска и контролна група, използвани при изследването на церулоплазминова активност и серумни нива на мед*

	Пациенти с ППМ брой (%)	Контролна група брой (%)	Р стойности
Брой участници в група	33	33	p=1
Средна възраст (години)	$60.03 \pm 1.93$	$59.27 \pm 1.72$	p=0.77
Мъже/Жени	17/16	17/16	p=1
<b>Придружаващи заболявания</b>			
Хипертонична болест	21 (63.64%)	24 (73.73%)	p=0.38
Захарен диабет тип 2	1 (3.03%)	1 (3.03%)	p=1
Дислипидемия	3 (9.09%)	1 (3.03%)	p=0.30
<b>Вредни навици</b>			
Тютюнопушене**	4 (12.12%)	7 (21.21%)	p=0.32
Прием на алкохол**	4 (12.12%)	6 (18.18%)	p=0.49
ВМІ (kg/m <sup>2</sup> )	$23.86 \pm 2.84$	$23.98 \pm 2.75$	p=0.86

Нямаше статистически значима разлика между двете групи и по отношение на провежданото лечение за хипертонична болест, дислипидемия и захарен диабет ( $p > 0.05$ ) (Таблица 8).

**Таблица 8.** Медикаментозно лечение на придружаващите заболявания при пациентска и контролна група, използвани за изследване активността на церулоплазмин и серумни нива на мед

	Пациенти с ППМ брой (%)	Контролна група брой (%)	Р стойности
<b>Класове медикаменти за лечение на хипертонична болест, дислипидемия и захарен диабет</b>			
Бета-блокери (bisoprolol, metoprolol)	8 (24.24%)	10 (30.30%)	p=0.58
АСЕ-инхибитори (enalapril, ramipril, lisinopril)	10 (30.30%)	7 (21.21%)	p=0.40
Сартани (telmisartan, valsartan)	5 (15.15%)	6 (18.18%)	p=0.74
Калциеви антагонисти или диуретици	8 (24.24%)	13 (39.39%)	p=0.19
Статини (simvastatin, atorvastatin, rosuvastatin)	2 (6.06%)	1 (3.03%)	p=0.55
Metformin	1 (3.03%)	1 (3.03%)	p=1

## 2. РЕЗУЛТАТИ

### 2.1. Стойности на Hb в 5%-на еритроцитна суспензия и на белтъка в плазмата

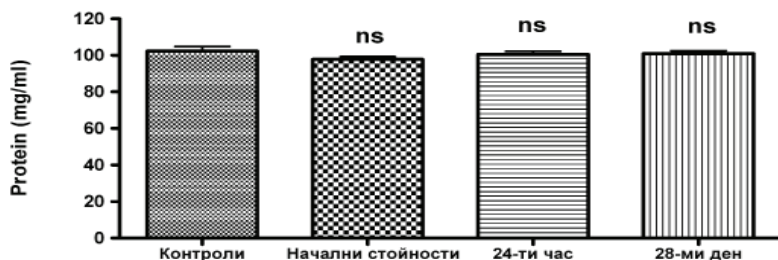
Фигура 28 представя липсата на статистически значима разлика в стойностите на Hb в 5%-на еритроцитна суспензия между контроли и пациенти, съответно при хоспитализацията им, двадесет и четири часа и двадесет и осем дни след възстановяване на синусовия ритъм ( $0.91 \pm 0.03$  vs  $0.93 \pm 0.03$  g/100 ml,  $p=0.63$ ;  $0.91 \pm 0.03$  vs  $0.93 \pm 0.03$  g/100 ml,  $p=0.67$ ;  $0.90 \pm 0.02$  vs  $0.93 \pm 0.03$  g/100 ml,  $p=0.33$ ).





**Фиг. 28** Стойности на Hb в 5%-на еритроцитна суспензия, използвани при изчисляване на показателите в еритроцити (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). ns – статистически незначима разлика.

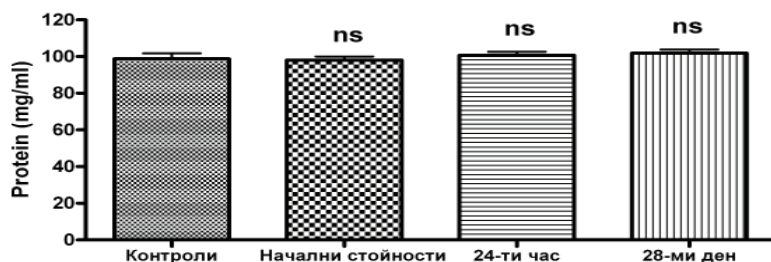
От Фигура 29 е видно, че няма статистически достоверна разлика между стойностите на белтъка в плазмата между контроли и пациенти, измерени при постъпване в отделениято, двадесет и четири часа и двадесет и осем дни след регуларизиране на ритъма ( $97.71 \pm 1.56$  vs  $102.4 \pm 2.41$  mg/ml,  $p=0.11$ ;  $100.50 \pm 1.67$  vs  $102.40 \pm 2.41$  mg/ml,  $p=0.52$ ;  $100.90 \pm 1.62$  vs  $102.40 \pm 2.41$  mg/ml,  $p=0.33$ ).



**Фиг. 29** Стойности на белтъка (protein) в плазмата, използвани при изчисляване на показателите в плазма (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). ns – статистически незначима разлика.

Стойностите на белтъка в плазмата на контролна и пациентска група, използвани при определяне активността на церулоплазмин (Фигура 30), също не показват разлика при хоспитализацията, двадесет и четири часа и

двадесет и осем дни след прекъсване на ритъмното нарушение ( $98.03 \pm 1.97$  vs  $98.79 \pm 3.01$  mg/ml,  $p=0.83$ ;  $100.6 \pm 2.05$  vs  $98.79 \pm 3.01$  mg/ml,  $p=0.61$ ;  $101.9 \pm 2.01$  vs  $98.79 \pm 3.01$  mg/ml,  $p=0.40$ ).

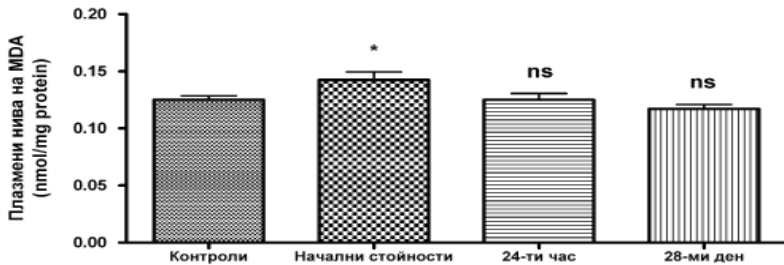


**Фиг. 30** Стойности на белтъка (protein) в плазмата, използвани при измерване активността на церулоплазмин в плазма на 33 пациенти и 33 контроли (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). ns – статистически незначима разлика.

*Показателите на оксидативния статус, съобразно използваните методи на изследване, бяха определяни спрямо стойностите на Hb в 5%-на еритроцитна суспензия или на белтъка в плазмата. Липсата на статистически значима разлика между контроли и пациенти (начални стойности, стойности на двадесет и четвърти час и двадесет и осми ден) не наложи корекции на стойностите на показателите спрямо тези на Hb и protein.*

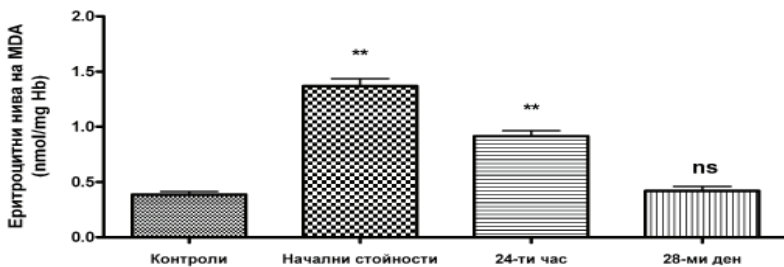
## 2.1. Нива на липидна пероксидация в плазма и еритроцити

От Фигура 31 е видно, че плазмените нива на MDA (PI-MDA) при постъпване на пациентите в отделението бяха повишени спрямо тези на контролите ( $0.143 \pm 0.007$  vs  $0.125 \pm 0.004$  nmol/mg protein,  $p=0.02$ ). Двадесет и четири часа след възстановяване на синусовия ритъм, измерените стойности на PI-MDA бяха понижени и не се различаваха статистически от нивата на PI-MDA при контролите ( $0.125 \pm 0.005$  vs  $0.125 \pm 0.004$  nmol/mg protein,  $p=0.98$ ). Двадесет и осем дни след регуларизация на ритъма, отново липсваше значима разлика в стойностите на пациенти и контроли ( $0.117 \pm 0.004$  vs  $0.125 \pm 0.004$  nmol/mg protein,  $p=0.13$ ).



**Фиг. 31** Динамика в плазмените нива на MDA (nmol/mg protein) при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). \* -  $p < 0.05$ , ns – статистически незначима разлика.

Фигура 32 показва завишени изходни стойности на еритроцитните нива на MDA (Er-MDA) при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене сравнено с контролите ( $1.368 \pm 0.069$  vs  $0.386 \pm 0.027$  nmol/mg Hb,  $p < 0.001$ ). Двадесет и четири часа след възстановяване на синусовия ритъм нивата на изследвания показател останаха значимо по-високи ( $0.916 \pm 0.047$  vs  $0.386 \pm 0.027$  nmol/mg Hb,  $p < 0.001$ ). На двадесет и осмия ден те не се различаваха статистически от контролните ( $0.419 \pm 0.039$  vs  $0.386 \pm 0.027$  nmol/mg Hb,  $p = 0.49$ ).



**Фиг. 32** Динамика в еритроцитни нива на MDA (nmol/mg Hb), измерени при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). \*\* -  $p < 0.001$ ; ns – статистически незначима разлика.

Резултатите от нашето изследване показаха еднопосочни промени в

началните стойности на плазмени и еритроцитни нива на MDA (Фигура 31 и Фигура 32). Установи се, че и двата показателя са значимо повишени ( $p=0.02$ ;  $p<0.001$ ). Като надежден маркер за оценка на липидната пероксидация, високите нива на MDA *определят засилена оксидативна увреда на липидните биомолекули и са индиректен белег за повишени нива на АКФ в организма*. На фона на тези данни, получените от нас резултати ни дават основание да приемем, че при пациенти с клинична изява на пароксизмално предсърдно мъждене са налице засилени прооксидантни процеси. Нещо повече, тук е редно да подчертаем факта, че промените в PI-MDA и Eg-MDA бяха измерени още в ранните часове от клиничната изява на ритъмното нарушение – до 24-я час от началото на аритмията (средно 8.14 часа). Именно ранното установяване на тези отклонения е сериозна предпоставка, която ни позволява да допуснем, че промените най-вероятно са тясно свързани с интимните механизми на инициране на аритмията.

Идентични отклонения в нивата на MDA при пациенти с предсърдно мъждене установяват редица други автори. Включените в тези изследвания популации обаче са със значително по-голяма давност на аритмията (от седем дни до месеци) и често са тежко коморбидни. *Нашето изследване е първото клинично изследване, което установява повишени нива на липидна пероксидация още до 24-я час на предсърдното мъждене*.

Специфични по своето съдържание са резултатите, получени двадесет и четири часа след прекъсване на ритъмното нарушение. Стойностите на Eg-MDA се запазват повишени ( $p<0.001$ ). Сам по себе си този факт е изключително важен, тъй като показва, че дори при възстановен синусов ритъм, липидната пероксидация в еритроцитите остава силно активирана. Оказва се, че *прооксидантните процеси са засилени не само по време на клиничната изява на аритмията, но и след това*.

Прави впечатление, че стойностите на PI-MDA (Фигура 31), измерени двадесет и четири часа след възстановяване на синусовия ритъм, за разлика от стойностите на Eg-MDA (Фигура 32), не се различават статистически от тези на контролната група ( $p=0.98$ ). Считаме, че на този етап всеки опит за категорично обяснение на резултата би имал спекулативен характер. Бихме искали само да подчертаем, че еритроцитите са по-податливи на оксидативни увреди, поради високото съдържание на полиненаситени мастни киселини в клетъчната им мембрана и високата концентрация на кислород в тях. Ето защо би могло да се очаква по-голяма сензитивност на Eg-MDA при повишени нива на АКФ.

Двадесет и осем дни след прекъсване на ритъмното нарушение, стойностите и на двата изследвани показателя на оксидативна увреда (PI-MDA

и Et-MDA) са намалени спрямо началните и не се различават от контролните ( $p=0.13$ ;  $p=0.49$ ). Възстановяването на синусовия ритъм се асоциира във времето с намаление на прооксидантните процеси.

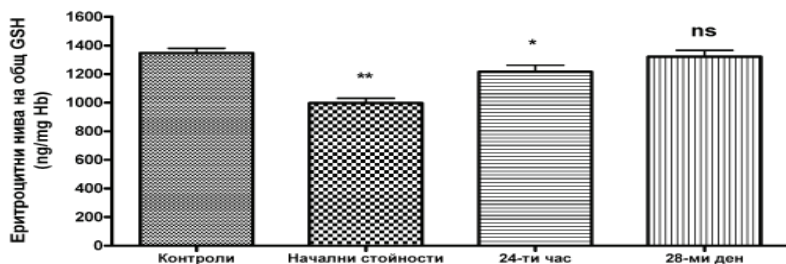
### 2.3. Промени в плазмените и еритроцитните нива на общ GSH

При хоспитализацията на пациентите в отделението, стойностите на общия GSH в плазма (Pl-GSH) (Фигура 33) бяха по-ниски сравнено с контролите ( $64.966\pm 1.281$  vs  $75.001\pm 1.392$  ng/mg protein,  $p<0.001$ ). Измерени двадесет и четири часа след възстановяване на синусовия ритъм те все още бяха значимо намалени ( $68.784\pm 1.318$  vs  $75.001\pm 1.392$  ng/mg protein,  $p=0.01$ ). На двадесет и осмия ден след регуларизиране на ритъма, стойностите на Pl-GSH при пациенти се доближаваха до тези на контролите ( $73.958\pm 1.926$  vs  $75.001\pm 1.392$  ng/mg protein,  $p=0.66$ ).



**Фиг. 33** Динамика в плазмените нива на общия GSH (ng/mg protein) при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). \* -  $p<0.05$ ; \*\* -  $p<0.001$ ; ns – статистически незначима разлика.

Начално измерените еритроцитни нива на общия GSH (Er-GSH) (Фигура 34) бяха значимо намалени сравнено с контролите ( $997.004\pm 32.603$  vs  $1347.002\pm 32.613$  ng/mg Hb,  $p<0.001$ ). Двадесет и четири часа след регистриране на синусовия ритъм те останаха по-ниски ( $1215.003\pm 46.709$  vs  $1347.002\pm 32.613$  ng/mg Hb,  $p=0.02$ ). На двадесет и осмия ден стойностите на Er-GSH вече не се различаваха статистически от тези на контролите ( $1321.003\pm 44.574$  vs  $1347.002\pm 32.613$  ng/mg Hb,  $p=0.64$ ).



**Фиг. 34** Динамика в стойностите на общия GSH в еритроцити (ng/mg Hb) при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждане (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.001$ ; ns – статистически незначима разлика.

Подобно на MDA, общият GSH също показва значими промени в нивата си както в плазма (PI-GSH), така и в еритроцити (Er-GSH). Измерените начални стойности на PI-GSH и Er-GSH при пациенти са намалени спрямо контролните ( $p < 0.001$ ). Известно е, че нивата на общия GSH в кръвта са добър индикатор за оксидативния статус на пациентите. Ниските стойности са израз на понижено ниво на неензимната антиоксидантна система. Същевременно те създават условия за оксидативното въздействие на  $H_2O_2$  и други пероксиди и за нарушаване баланса между прооксидантни и антиоксидантни процеси. Ето защо намалените нива на GSH са един от показателите за развитие на оксидативен стрес.

Нивата на общ GSH са изследвани при редица заболявания, за които се смята, че протичат с нарушение в оксидативния статус. Установени са понижени стойности на GSH при злокачествени заболявания, невродегенеративни заболявания, белодробна фиброза, чернодробни заболявания, следствие на системен прием на алкохол и др.

GSH е най-добрият неензимен буфер за АКФ, както на системно ниво (плазма), така и на клетъчно ниво. Общият GSH (кумулятивното количество GSH и GSSG) е ключов показател за клетъчния окислително-редукционен потенциал. Изследван в хистологични проучвания, той показва намалени стойности при постоперативно предсърдно мъждане и персистиращо предсърдно мъждане.

В нашето проучване, еднопосочните значими промени в PI-GSH и Er-GSH ни дават основание да приемем, че *ранните часове (до 24-я час)* на

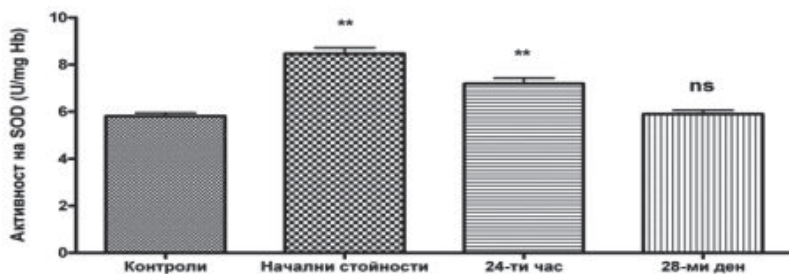
*пароксизмалното предсърдно мъждене се характеризират с намалени неензимни антиоксидантни механизми. Същевременно, както вече стана ясно, процесите на липидна пероксидация са засилени, за което говорят повишените нива на PI-MDA и Et-MDA (Фигура 31 и Фигура 32). Запазването на оксидативния баланс налага компенсаторно активиране на антиоксидантната система в случай на засилени прооксидантни процеси. Нашите резултати показват точно обратното – активирана липидна пероксидация на фона на намалени нива на основния неензимен антиоксидант. Разглеждайки комплексно началните стойности на PI-MDA, Et-MDA, PI-GSH и Et-GSH можем да кажем, че е налице оксидативен дисбаланс, следствие на промени както в прооксидантната, така и в антиоксидантната защитна система.*

Двадесет и четири часа след прекъсване на ритъмното нарушение, нивата на PI-GSH и Et-GSH остават по-ниски сравнено с контролните ( $p=0.01$ ;  $p=0.02$ ). Възстановяването на синусовия ритъм не се асоциира с възстановяване на неензимната антиоксидантна защита. Както вече показахме, персистиращи и засилените процеси на липидна пероксидация (Фигура 32). Оказва се, че *нарушението в оксидативния баланс се задържа след регуларизиране на ритъма. Този факт логично позволява да допуснем, че влиянието му върху организма, и в частност върху електрофизиологичното и структурно ремоделиране на предсърдията, също персистира.*

Двадесет и осем дни след регистриране на синусовия ритъм, няма статистически значима разлика в измерените стойности на PI-GSH и Et-GSH ( $p=0.66$ ;  $p=0.64$ ). Нивата на неензимна антиоксидантна защита са възстановени.

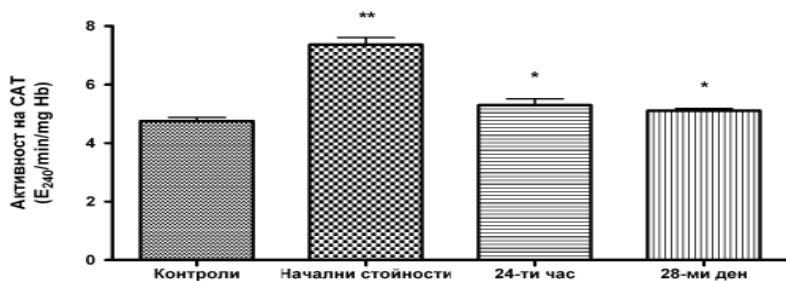
#### **2.4. Промени в основните антиоксидантни ензими супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза и глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа**

На Фигура 35 са представени промените в активността на SOD, която при постъпване на пациентите в отделението беше завишена сравнено с контролите ( $8.463\pm 0.255$  vs  $5.808\pm 0.135$  U/mg Hb,  $p<0.001$ ). Тази разлика бе запазена и на двадесет и четвъртия час след възстановяване на синусовия ритъм ( $7.191\pm 0.247$  vs  $5.808\pm 0.135$  U/mg Hb,  $p<0.001$ ). Двадесет и осем дни след прекъсване на аритмията, липсваше статистически значима разлика спрямо контролите ( $5.899\pm 0.156$  vs  $5.808\pm 0.135$  U/mg Hb,  $p=0.66$ ).



**Фиг. 35** Динамика в активността на SOD (U/mg Hb) в еритроцити при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). \*\* -  $p < 0.001$ ; ns – статистически незначима разлика.

От Фигура 36 е видно, че изходните стойности на ензимната активност на САТ бяха също значимо повишени ( $7.362 \pm 0.251$  vs  $4.760 \pm 0.121$   $E_{240}/\text{min}/\text{mg Hb}$ ,  $p < 0.001$ ). Двездесет и четири часа след регуларизиране на ритъма активността на ензима беше все още по-висока спрямо контролната ( $5.300 \pm 0.214$  vs  $4.760 \pm 0.121$   $E_{240}/\text{min}/\text{mg Hb}$ ,  $p = 0.03$ ). Двадесет и осем дни по-късно, независимо от подчертаната тенденция към редуциране на активността, тя остана значимо по-висока спрямо тази при контролите ( $5.109 \pm 0.079$  vs  $4.760 \pm 0.121$   $E_{240}/\text{min}/\text{mg Hb}$ ,  $p = 0.02$ ).

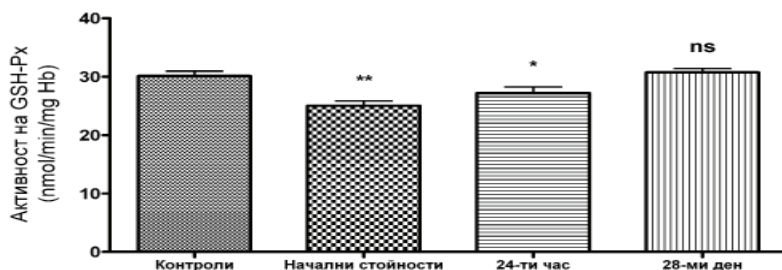


**Фиг. 36** Динамика в активността на САТ ( $E_{240}/\text{min}/\text{mg Hb}$ ) в еритроцити при пароксизмално предсърдно мъждене (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията).

\* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.001$ .



Изследваната активност на GSH-Px в еритроцити (Фигура 37) при постъпване на пациентите в отделениято беше силно намалена ( $25.004 \pm 0.814$  vs  $30.114 \pm 0.854$  nmol/min/mg Hb,  $p < 0.001$ ). Двадесет и четири часа след прекъсване на аритмията, тя остана по-ниска ( $27.198 \pm 1.043$  vs  $30.114 \pm 0.854$  nmol/min/mg Hb,  $p = 0.03$ ). На двадесет и осмия ден вече не се различаваше от контролната група ( $30.724 \pm 0.674$  vs  $30.114 \pm 0.854$ ,  $p = 0.58$ ).



**Фиг. 37** Динамика в активност на GSH-Px (nmol/min/mg Hb) в еритроцити при пароксизмално предсърдно мъждене (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.001$ ; ns – статистически незначима разлика.



**Фиг. 38** Динамика в активността на Glu-6-PhD (nmol NADP<sup>+</sup>/min/mg Hb) в еритроцити при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). \* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.001$ ; ns – статистически незначима разлика.

Резултатите на Фигура 38 показват намалена начална активност на Glu-6-PhD ( $2.499 \pm 0.102$  vs  $2.903 \pm 0.149$  nmol NADP<sup>+</sup>/min/mg Hb,  $p=0.03$ ). Двадесет и четири часа след възстановяване на синусовия ритъм персистираще по-ниска активност на ензима ( $2.413 \pm 0.088$  vs  $2.903 \pm 0.149$  nmol NADP<sup>+</sup>/min/mg Hb,  $p=0.01$ ). На двадесет и осмия ден не беше установена значима разлика спрямо контролите ( $2.634 \pm 0.080$  vs  $2.903 \pm 0.149$  nmol NADP<sup>+</sup>/min/mg Hb,  $p=0.12$ ).

Известно е, че SOD, CAT, GSH-Px и Glu-6-PhD са основните ензими на антиоксидантната защитна система. SOD улеснява конверсията на  $O_2^-$  до  $H_2O_2$ , който на свой ред се метаболизира от CAT до  $H_2O$ . Тези два ензима са „ключови“ при елиминирането на основните АКФ, а именно  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  в човешкия организъм. *Тяхната повишена активност е важен индиректен белег за засилени прооксидантни увреди.* Както става ясно от по-горе представените Фигура 35 и Фигура 36, ензимната активност на SOD и CAT е значимо повишена при хоспитализацията на пациентите в отделението. Предвид основните им субстрати, имаме основание да приемем, че установените промени са адаптивен отговор към повишена продукция на АКФ, и по-точно към  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ . *Клиничната изява на пароксизмалното предсърдно мъждене се асоциира със засилени прооксидантни процеси,* факт, който се потвърждава и от описаните вече повишените нива на PI-MDA и Eg-MDA (Фигура 31 и Фигура 32).

Засилена дисмутация на  $O_2^-$  под действието на SOD е установена при редица състояния, асоцииращи се с развитие на оксидативен стрес, а именно: терминална бъбречна недостатъчност, паранеопластична пневмония в хода на провеждано химиотерапевтично лечение за белодробен карцином и др.

Ензимната антиоксидантна система е изключително сложна. *За да елиминира увреждащото действие на АКФ и балансира успешно прооксидантните процеси е необходима тясна взаимовръзка между всичките ѝ компоненти. Ефективната антиоксидантна защита изисква еднопосочно и допълващо се действие на участващите в нея ензими.* Park et al. (2007) установяват, че дисбалансът между активността на ензимите SOD и GSH-Px има пряко отношение към инициране и задълбочаване на оксидативния стрес. Подобни наблюдения правят A.Aguiló et al (2005). Индуцираният от тях оксидативен стрес, следствие на екстремно физическо натоварване, се характеризира с повишена активност на SOD и намалена активност на GSH-Px.

Предвид водещата роля, която GSH-Px изпълнява при елиминирането на  $H_2O_2$  и липидни пероксиди, и в съответствие с установените от нас

засилени оксидативни увреди, се очаква повишена активност на GSH-Px. Ето защо измерената ниска начална активност на този ензим при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене (Фигура 37) е в противовес на повишената активност на SOD и CAT. *Известно е, че намалената GSH-Px активност е ранен белег за нарушен баланс между прооксидантни и антиоксидантни процеси и израз на редуциран потенциал на ензимната антиоксидантна система.* Тя е предпоставка за доминиране на прооксидантните процеси над антиоксидантната защита. Възможна причина за установените промени в GSH-Px са дискутираните вече понижени нива на нейния кофактор GSH (Фигура 33 и Фигура 34).

В този смисъл следва да се разглежда и динамиката на Glu-6-PhD. Ензимът има индиректен, но важен антиоксидантен ефект. *Частичното му или пълно инхибиране прави клетките изключително податливи на оксидативна увреда.* Така например, Pandolfi et al. (1995) показват, че създадена от тях клетъчна линия, лишена от Glu-6-PhD, е с висок процент клетъчна смъртност при ниски нива на оксиданти. В проучване на Xu et al. (2004), намалената активност на същия ензим у плъхове е свързана с развитие на оксидативен стрес, следствие на намалени нива на NADPH и GSH.

Резултатите от нашето изследване показват, че при хоспитализацията на пациентите активността на Glu-6-PhD е значимо намалена (Фигура 38). Разгледани в контекста на изложените по-горе литературни данни, установените от нас ниски начални стойности на Glu-6-PhD активност по същество отразяват идентични промени в ензимната антиоксидантна система. Като единствен източник на NADPH в еритроцити, ензимът е есенциален за поддържане еритроцитните нива на GSH и съответно неензимната антиоксидантна защита. Ето защо промените в Glu-6-PhD биха могли да обяснят намаленото количество на Eг-GSH (Фигура 34).

Промените в началните стойности на всички ензимни антиоксиданти свидетелстват за *намалена и неефективна антиоксидантна защита* (Фигури 35-38).

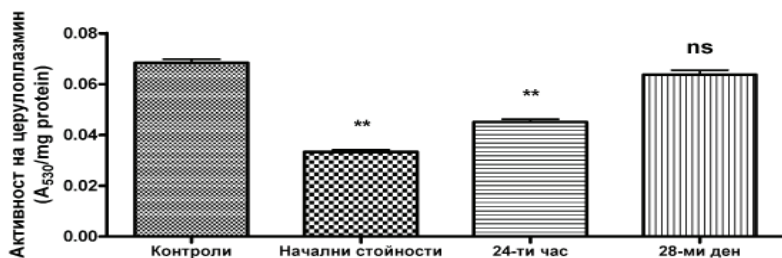
Двадесет и четири часа след възстановяване на синусовия ритъм, начално установените промени в антиоксидантните ензими персистират. Активността на SOD и CAT има ясна тенденция към понижаване, видно от абсолютните им стойности, но остава по-висока сравнено с контролната група ( $p < 0.001$ ;  $p = 0.03$ ) (Фигура 35 и Фигура 36). Тези резултати са показателни за персистиране на засилената продукция на АКФ и след епизода на аритмия. GSH-Px и Glu-6-PhD запазват намалената си активност ( $p = 0.03$ ;  $p = 0.01$ ). Ензимната антиоксидантна защита на организма не е възстановена. *Задържане на промените както в прооксидантната, така и в антио-*

ксидантната система показва, че състоянието на оксидативен стрес е факт дори при наличие на синусовия ритъм. Изследването в динамика на показателите на оксидативния статус безспорно доказва, че оксидативният стрес при пароксизмално предсърдно мъждене, както и произтичащите от това последици, не са едновременно явление в клиничния ход на заболяването. Това неминуемо поражда въпроса за количествена взаимовръзка между хистологично-установените оксидативни увреди в предсърдния миокард при пациенти с предсърдно мъждене и вероятността за повторна изява на заболяването.

Двадесет и осем дни след прекъсване на аритмията активността на SOD, GSH-Px и Glu-6-PhD не се различава от контролната ( $p=0.66$ ;  $p=0.58$ ;  $p=0.12$ ). Персистира само повишена активност на САТ ( $p=0.02$ ), като се запазва тенденцията за намаляване на активността ѝ (Фигура 36). Възстановяването на синусовия ритъм води след себе си до възстановяване на ензимната антиоксидантна система – процес, който изисква време.

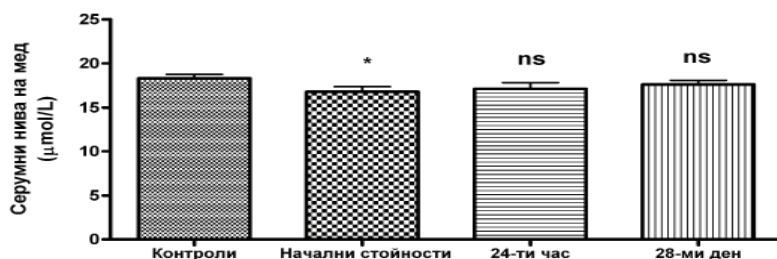
## 2.5. Активност на церулоплазмин и серумно ниво на медта (Cu) - негов кофактор

Фигура 39 представя значимо намалена активност на церулоплазмина при постъпване на пациентите в отделението ( $0.033\pm 0.001$  vs  $0.068\pm 0.001$   $A_{530}/\text{mg protein}$ ,  $p<0.001$ ). Двадесет и четири часа след възстановяване на синусовия ритъм, тя остана силно намалена спрямо контролите ( $0.045\pm 0.001$  vs  $0.068\pm 0.001$   $A_{530}/\text{mg protein}$ ,  $p<0.001$ ). Двадесет и осем дни по-късно активността на церулоплазмина не се различаваше значимо от тази на контролите ( $0.064\pm 0.002$  vs  $0.068\pm 0.001$   $A_{530}/\text{mg protein}$ ,  $p=0.06$ ).



**Фиг. 39** Динамика в активността на церулоплазмин ( $A_{530}/\text{mg protein}$ ) при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). \*\* -  $p<0.001$ ; ns – статистически незначима разлика.

На Фигура 40 са представени промените в серумните нива на  $\text{Cu}$ , които бяха понижени при постъпване на пациентите в отделението ( $16.770 \pm 0.594$  vs  $18.304 \pm 0.448$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p=0.04$ ). На двадесет и четвъртия час и двадесет и осмия ден нивата на мед, измерени при пациенти, не бяха статистически значимо различни от контролните (съответно  $17.109 \pm 0.705$  vs  $18.304 \pm 0.448$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p=0.16$ ;  $17.613 \pm 0.479$  vs  $18.304 \pm 0.448$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p=0.29$ ).



**Фиг. 40** Серумни нива на  $\text{Cu}$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене (начални стойности - веднага след хоспитализацията на пациента, 24-ти час - 24 часа след прекъсване на аритмията; 28-ми ден - 28 дни след прекъсване на аритмията). \* -  $p < 0.05$ ; ns – статистически незначима разлика.

Освен транспорта на мед, церулоплазминът притежава и друга изключително важна за хомеостазата на човешкия организъм функция – участие в регулиране на оксидативния баланс. Церулоплазминът е един от основните и най-ефективни антиоксиданти в плазма, следствие на способността му да секвестрира медните йони, отстранява  $\text{O}_2^-$ , инхибира липидната пероксидация и проявява фероксидазна активност. Разгледан в този аспект, той показва значимо намалена активност при хоспитализиране на пациентите ( $p < 0.001$ ) (Фигура 40). Установеното отклонение е основание да приемем, че е налице нарушение в плазмената ензимна антиоксидантна защита в ранните часове на клиничната изява на пароксизмалното предсърдно мъждене. Същевременно намалената активност на церулоплазмина благоприятства образуването на АКФ и развитието на оксидативен стрес.

Понижение е установено и в серумните нива на медта ( $p=0.04$ ) (Фигура 39). Въпреки, че те не оказват влияние върху синтеза и секрецията на апопротеина, недостигът им по време на чернодробния синтез води до нестабилност на протеина и намалена или липсваща фероксидазна активност. В

съответствие с тези факти, интраперитонеалното инжектиране на мед при лабораторни животни води до покачване нивата на ензимно активния хо-лоцеруплазмин в рамките на двадесет и четири до четиредесет и осем часа след инжектирането.

*Оксидазната активност на церулоплазмина е мед-зависима.* Предвид горепосочените факти, смятаме, че променената активност на ензима би могла да се обясни с установеното в същия момент намалено ниво на медта в серума.

Медта е кофактор в активния център и на друг важен антиоксидантен ензим, а именно Cu/Zn-SOD. Понижените му стойности не се съгласуват с повишената ензимна активност на SOD. Възможно обяснение на този факт е силно повишена субстратна концентрация на SOD. От друга страна обмяната на еритроцити в кръвта е по-бавна от тази на плазмените протеини. В този смисъл промени в активността на SOD настъпват след продължителен меден дефицит.

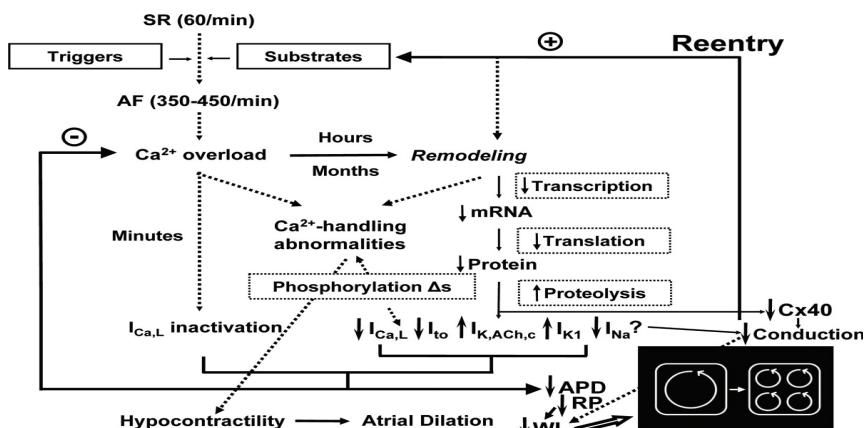
Двадесет и четири часа след прекъсване на ритъмното нарушение, промените в антиоксидантната система в плазмата персистират, за което свидетелства все още понижената оксидазна активност на церулоплазмина ( $p < 0.0001$ ). Серумните нива на мед обаче вече не се различават от контролните ( $p = 0.16$ ), макар и абсолютните им стойности да остават долногранични ( $17.109 \pm 0.705$  vs  $18.304 \pm 0.448$   $\mu\text{mol/L}$ ). Бързото им покачване най-вероятно е следствие на строгите регулаторни механизми на медния статус в човешкия организъм. Тези механизми определят изключителна стабилност на медните нива в серума и възможността лекият меден дефицит бързо да бъде компенсиран. Персистиране на промените в церулолазмина биха могли да се обяснят с високата чувствителност на ензимната активност към граничните медни нива.

На двадесет и осмия ден след регуларизиране на ритъма липсва статистически значима разлика в ензимната активност на церулоплазмина ( $p = 0.29$ ). *Основните антиоксидантни механизми в плазма са възстановени.*

Не трябва да се забравя и факта, че нивата на медта в серума и активността на церулоплазмина отразяват и медния статус на организма. Еднопосочните им промени при хоспитализацията на пациентите дават основание да приемем, че *клиничната изява на пароксизмалното предсърдно мъждене се характеризира с нарушение в медния баланс. Наблюдава се меден дефицит, който е преходен и се възстановява до двадесет и осмия ден след регуларизиране на ритъма.* Неминуемо се поражда въпроса за връзката му както с ритъмното нарушение, така и с установените промени в оксидативния статус.

Relling et al. (2007) откриват, че *граничното съдържание на мед в хранителния дневен прием води до нарушение в контрактилната функция и  $[Ca^{2+}]$  хомеостаза на кардиомиоцитите.*

Известно е, че при предсърдно мъждане атриалните кардиомиоцити отговарят на бързата предсърдна стимулация основно с редукция на  $Ca^{2+}$  инфлукс, следствие на намален  $I_{CaL}$  (насочен навътре  $Ca^{2+}$  поток). Това води до намаляване продължителността на акционния потенциал, а при персистиране на аритмията и до хипоконтрактилитет на предсърдните кардиомиоцити и атриална дилатация (Фигура 41). В този смисъл установеният меден дефицит може да допринесе за електрофизиологичното и структурното ремоделиране на предсърдията.



**Фиг. 41.** Механизми на предсърдното ремоделиране (схема по Nattel S et al. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2008 Apr;1(1):62-73).

Представените от нас резултати налагат необходимостта от бъдещи проучвания относно значението на меда за развитието и рецидивите на предсърдното мъждане. На този етап, считаме, че ранната изява на меден дефицит в клиничния ход на ритъмното заболяване позволява да се допусне тясна взаимовръзка с инициращите механизми на заболяването. Уместно е в бъдещи проучвания да се изследва ефекта от приложението на медни препарати върху профилактиката (първична и вторична) на предсърдното мъждане.

## 2.6. Моделиране на данните от изследваните показатели чрез логистична регресия (непубликувани данни)

Предвид голямата социална значимост на пароксизмалното предсърдно мъждене, предиктори на заболяването са търсени в редица лабораторни показатели, вкл. и в оксидативни показатели. MDA и SOD са определени като предиктори на предсърдното мъждене, но изследваната популация е хетерогенна по отношение на давността на ритъмното нарушение. Kim et al. (2008) установяват, че NADPH оксидазната активност е предиктивна за изязата на постоперативно предсърдно мъждене, а  $E_n$ GSH (съотношението окислен/редуциран GSH) и  $E_n$ CuSH (съотношението окислен/редуциран цистеин) - при лечението на персистиращо предсърдно мъждене.

В настоящия дисертационен труд на логистичен регресионен анализ бяха подложени 10 (n=10) показатели (фактора). Първоначално бяха разглеждани едномерни логистични модели

$$d(x) = B_0 + B_1 x$$

за всеки от тях. Резултати от направения анализ показват, че стойностите на шест от показателите са прогностични за изязата на пароксизмално предсърдно мъждене ( $p < 0.05$ ) (Таблица 9).

*Таблица 9. Стойност на p-ниво на показателите на оксидативен стрес за клинична изява на пароксизмално предсърдно мъждене и коректност на статистическия модел за класифициране на наблюденията*

*(OR; CI за OR)*

	<b>p стойности</b>	<b>OR</b>	<b>95% Confidential Interval (CI)</b>
PI-MDA	<b>0.03</b>	2.14	1.33-30.23
Er-MDA	<b>&lt;0.0001</b>	23.28	6.31-73.71
PI-GSH	<b>&lt;0.0001</b>	4.39	1.37-17.68
Er-GSH	0.65		
SOD	<b>&lt;0.0001</b>	24.92	13.16-49.90
CAT	<b>&lt;0.0001</b>	50.53	29.34-110.16
GSH-Px	<b>0.0002</b>	4.50	1.51-48.18
Glu-6-PhD	0.95		
Ceruloplasmin	0.59		
Cu	0.0508		



**Таблица 10.** Стойности на регресионните коефициенти  $B_1$  и  $B_0$  за предиктивните фактори за пароксизмално предсърдно мъждене

	$B_0$	$B_1$
PI-MDA	-1.70	10.26
Er-MDA	-6.84	9.42
PI-GSH	7.89	-0.11
SOD	-10.07	1.47
CAT	-10.09	1.74
GSH-Px	3.91	-0.14

PI-MDA е прогностичен фактор за развитие на пароксизмално предсърдно мъждене ( $p=0.03$ ), като с покачване на стойностите му расте вероятността за изява на усложнението ( $B_1=10.26$ ). Използваният модел класифицира коректно 59.22% от наблюдаваните в нашата извадка случаи (OR 2.14, 95%CI 1.33-30.23).

Същият показател (MDA) в еритроцити (Er-MDA) е отново прогностичен за развитие на усложнението ( $p<0.0001$ ), като вероятността нараства с нарастване стойностите на фактора ( $B_1=9.42$ ). Коректно предсказаните случаи с използвания модел са 93.14% (OR 23.28, 95%CI 6.31-73.71).

Обобщавайки резултатите представени по-горе от логистичния регресионен модел се установява, че завишените стойности на изследваните прооксидантните показатели се асоциират с повишена вероятност за наличие на пароксизмално предсърдно мъждене.

Показателите на антиоксидантната система също имат статистически значима предиктивна стойност. Така например, логистичният модел показва, че с намаляване нивата на основния неензимен антиоксидант GSH в плазма ( $p<0.0001$ ;  $B_1=-0.11$ ) расте вероятността за наличие на ритъмното нарушение. С този модел коректно са предсказани 67.65% от наблюдаваните в извадката случаи (OR 4.39, 95% CI 1.37-17.68).

Активността на два от основните ензимни антиоксиданти SOD и CAT е също прогностична за изява на аритмията ( $p<0.0001$ ). С нарастване на активността им нараства и вероятността за ритъмно нарушение ( $B_1=1.47$ ;  $B_1=1.74$  съответно). С тези модели коректно се предсказват съответно 82.52% и 87.38% от диагностицираните случаи (OR=24.92, 95%CI 13.16-49.90; OR=50.53, 95%CI 29.34-110.16).

Промени в активността на GSH-Px са ранен белег за промени в оксидативния статус. Ето защо определяне активността на ензима като предиктив-

на за развитието на пароксизмално предсърдно мъждане е изключително важно ( $p=0.0002$ ). Намаляването ѝ се асоциира с повишена вероятност за развитие на ритъмното нарушение ( $B_1=-0.14$ ), а полученият модел класифицира коректно 67.96% от наблюденията (OR 4.50, 95%CI 1.51-48.18).

Останалите четири фактора, а именно нива на Er-GSH, активност на Glu-6-PhD и церулоплазмин, както и серумни нива на Cu, нямат прогностична стойност, тъй като  $p>0.05$  ( $p=0.65$ ;  $p=0.95$ ;  $p=0.59$ ;  $p=0.0508$  съответно).

За всеки един от прогностичните фактори получената линейната функция

$$d(x) = B_0 + B_1x \text{ има вида:}$$

$$d(PI-MDA) = -1.70 + 10.26(PI-MDA)$$

$$d(Er-MDA) = -6.84 + 9.42(Er-MDA)$$

$$d(PI-GSH) = 7.89 - 0.11(PI-GSH)$$

$$d(SOD) = -10.07 + 1.47(SOD)$$

$$d(CAT) = -10.09 + 1.74(CAT)$$

$$d(GSH-Px) = 3.91 - 0.14(CAT)$$

Заместването в нея със съответната стойност на показателя и изчисляване след това на  $p(d)$  (виж “Статистически анализ на резултатите”), ще позволи в клиничната практика определяне на вероятността за развитие на пароксизмално предсърдно мъждане при всяка измерена стойност на прогностичните показатели.

Едномерният логистичен анализ определя Er-MDA, PI-GSH, SOD и CAT като най-силни предиктори за пароксизмално предсърдно мъждане (OR=23.28, 95%CI 6.31-73.71; OR=4.39, 95%CI 1.37-17.68; OR=24.92, 95%CI 13.16-49.90; OR=50.53, 95%CI 29.34-110.16), а създаденият модел за Er-MDA има най-висока коректност при класифициране на случаите - над 90%. Покачване на стойностите на Er-MDA, SOD и CAT, и понижаване тези на PI-GSH се асоциират с повишаване на риска от пароксизмално предсърдно мъждане.

След едномерните логистични модели, беше построен многомерен логистичен модел за поява на пароксизмално предсърдно мъждане. В някои случаи статистическата значимост на даден фактор, определена в едномерния анализ може да отпадне от многомерния. Това дава основание прогностичната му стойност за изява на усложнението (в случая пароксизмално предсърдно мъждане) да бъде подложена на дискусия. В нашия многомерен модел всичките шест фактора запазиха значимостта си, установена от едномерния модел ( $p=0.006$ ) и той има вида:

$$d(x) = -9,069 + 10,26(PI-MDA) + 9,42(Er-MDA) + 9,42(Er-MDA) - 0,11(PI-GSH) + 1,47(SOD) + 1,74(CAT) - 0,14(CAT)$$

Заместването в него със съответната стойност на показателите и изчисляване след това на  $p(d)$  (виж “Статистически анализ на резултатите”), ще позволи в клиничната практика определяне на вероятността за развитие на пароксизмално предсърдно мъждене.

Установените прогностични фактори, както и създадените конкретни математически модели за изчисляване вероятността за поява на пароксизмално предсърдно мъждене, биха могли да се използват в клиничната практика както за оценка ефективността на провежданото лечение, така и за прецезиране необходимостта от такова.

### 3. ЗАКЛЮЧИТЕЛНО ОБСЪЖДАНЕ

Обобщеният анализ на получените резултати би позволил да се добие по-пълна представа за оксидативния статус на пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене. Особено значение при интерпретиране на резултатите имат следните факти:

- Оксидативният статус е проучен изключително рано (още до двадесет и четвъртия час) след изявата на предсърдното мъждене.
- Пациентите са изследвани по време на ритъмното нарушение и в синусов ритъм, което позволи да се улови динамика в оксидативния им статус.
- Определени бяха достатъчен брой показатели, което даде възможност едновременно да се анализират прооксидантните процеси и антиоксидантната защитна система.

За хода на цялото проучване изключително значение имаше фактът, че началните стойности на всички изследвани показатели бяха значимо променени. Беше установено, че нивата на PI-MDA ( $p=0.02$ ) и Er-MDA ( $p<0.001$ ), както и активността на SOD ( $p<0.001$ ) и CAT ( $p<0.001$ ) са силно повишени. Същевременно значимо са намалени стойностите на PI-GSH и Er-GSH ( $p<0.001$ ), както и активността на ензимите GSH-Px ( $p<0.001$ ), Glu-6-PhD ( $p=0.03$ ), церулоплазмин ( $p<0.001$ ) и серумни нива на мед ( $p=0.04$ ). Тези промени са убедително доказателство за нарушение на оксидативния статус при пароксизмално предсърдно мъждене. Развива се оксидативен стрес още до двадесет и четвъртия час от началото на аритмията вследствие от засилени прооксидантни и понижени антиоксидантни процеси. Редно е също така да отбележим, че отклоненията в антиоксидантната система имат изключително комплексен характер и те засягат ензимните и неензимните

й компоненти.

Особен интерес представляват резултатите, получени двадесет и четири часа след прекъсване на ритъмното нарушение. Осем от изследваните десет показатели, а именно Er-MDA ( $p < 0.001$ ), Pl-MDA ( $p = 0.01$ ), Er-GSH ( $p = 0.02$ ), SOD ( $p < 0.001$ ), CAT ( $p = 0.03$ ), GSH-Px ( $p = 0.03$ ), Glu-6-PhD ( $p = 0.01$ ) и церулоплазмин ( $p < 0.001$ ), остават променени спрямо стойностите на контролите. Само Pl-MDA ( $p = 0.98$ ) и серумни нива на мед ( $p = 0.16$ ) не показват статистически значима разлика. *Комплексният анализ на показателите дава основание да заключим, че оксидативният стрес, установен при клиничната изява на пароксизмалното предсърдно мъждене, се задържа и след ЕКГ регистриране на синусовия ритъм.* Персистират както засилените прооксидантни процеси, така и понижените нива на неензимна и ензимна антиоксидантна система.

Резултатите от двадесет и осмия ден не показват статистически значима разлика в стойностите на показателите, изследвани при пациенти и контроли ( $p > 0.05$ ). Изключение прави само активността на CAT ( $p = 0.02$ ). Възстановяването на синусовия ритъм се асоциира с намаляване на оксидативния стрес. Процесът настъпва бавно във времето, в подкрепа на което са и данните от предварителното проучване. Това е показателно за сложните регулаторни механизми, отговорни за поддържане на равновесието между прооксиданти и антиоксиданти. *След възстановяване на синусовия ритъм прооксидантните процеси се понижават и нивата на антиоксидантна защита се покачват, което води до баланс в оксидативния статус.*

Ранните промени в изследваните показатели (още до двадесет и четвъртия час след началото на ритъмното нарушение), както и специфичната динамика, установена при проследяването им, са основание да приемем с висока вероятност, че оксидативният стрес играе съществена роля в патогенезата на предсърдното мъждене.

Както вече стана ясно, установените от нас повишени нива на MDA (Фигура 31 и Фигура 32), както и повишената активност на ензимите SOD (Фигура 35) и CAT (Фигура 36) са доказателство за засилена продукция на АКФ. Тя е налице не само по време на епизода на ритъмното нарушение (свидетелство, за което са началните стойности на тези показатели), но и след това. Както е известно оксидативният стрес води до констиляция от йонни аномалии, а именно повишаване на късния  $\text{Na}^+$  поток и L-тип  $\text{Ca}^{2+}$  поток, намаляване на пиковия  $\text{Na}^+$  поток и SERCA-медирано SR  $\text{Ca}^{2+}$  улавяне. От друга страна АКФ участват в модулирането на митоген-активирани протеин-киназни субфамилии, включващи екстрацелуларна сигнал-регулирана киназа, c-Jun N терминална киназа и p38 киназа. Те индуцират равитието

на атриална фиброза, която забавя провеждането на електрически импулси. *Електрофизиологичните и морфологичните промени, които АКФ могат да индуцират, създават предпоставка за възникване на re-entry механизми на възбуждане в предсърдния миокард, за инициране и задържане на предсърдно мъждене.* В този смисъл персистиращите промени в Ег-MDA, SOD и CAT след възстановяване на синусов ритъм **свидетелстват за генериране на оксидативни увреди и след прекъсване на ритъмното нарушение.** Кумулирането им във времето повишава вероятността за рецидив и хронифициране на предсърдното мъждене. Този факт потвърждава необходимостта от бързо възстановяване на синусовия ритъм. Това ще даде възможност за прекъсване на т. нар. „порочен кръг на самоподдържащото се предсърдно мъждене“.

Същевременно доколкото нашето проучване установи, че повишените нива на АКФ са следствие на едновременно засилени прооксидантни процеси и намалена антиоксидантна защита, то *ефективното повлияване на оксидативните увреди на миокарда несъмнено налага паралелно терапевтично повлияване на прооксидантни и антиоксидантни процеси.*

Съвременните антиаритмични медикаменти, блокери на йонните канали, както и катетърната аблация, имат ограничен успех при лечението на предсърдно мъждене. Основна причина за това се смята липсата на насочено повлияване на патогенетичните механизми на заболяването, на субстратите, свързани с инициране и задържане на предсърдното мъждене. В този смисъл през последните години се провеждат редица проучвания, в насока към ограничаване оксидативните увреди на предсърдния миокард чрез приложение на медикаменти с антиоксидантно действие. Резултатите са неубедителни и противоречиви, най-вероятно поради факта, че използваните антиоксиданти са с един и същ механизъм на действие - инхибиране източниците на АКФ или директно елиминиране на самите АКФ (Таблица 11).

Нашите резултати правят актуален въпроса за необходимостта от създаване на нов клас антиоксидантни средства, които за разлика от досега използваните, да притежават комплексен механизъм на действие, инхибиращ установените вече основни източници на АКФ при предсърдно мъждене и директно стимулиращ антиоксидантната защита.

Важен момент в нашето изследване е фактът, че шест от показателите са определяни в еритроцитите. Те имат високо кислородно съдържание, което ги прави изключително податливи на оксидативен стрес. Ето защо еритроцитите са едни от първите клетки, чиито оксидативен баланс се променя при нарушение в оксидативния статус на човешкия организъм. Това е

основание да считаме, че получените резултати се характеризират с висока сензитивност.

**Таблица 11.** Механизъм на действие на използваните до момента медикаменти с антиоксидантно действие за лечението на предсърдно мъждене

Наименование на медикамента	Механизъм на действие
<i>Vitamin C</i>	директен редуктор на АКФ (особен афинитет към пероксинитритните аниони в клетката); участва във възстановяване на редуциращия потенциал на <i>vitamin E</i>
<i>Vitamin E</i> ( $\alpha$ -токоферол)	синергично действие с <i>vitamin C</i> (оxygen до $\alpha$ -токофероксил, <i>vitamin E</i> в присъствието на <i>vitamin C</i> , се окислява до антиоксидантно ефективната си форма $\alpha$ -токоферол)
<i>N-acetylcystein</i>	метаболизира се до <i>cysteine</i> – прекурсор в синтеза на GSH; директно улавя АКФ
<i>Statins</i>	инхибират NADPH-зависимата продукция на АКФ чрез “ <i>down regulation</i> ” активността на Rac1
<i>ACE-инхибитори</i> <i>Сартани</i>	инхибират синтеза или блокират действието на angiotensin II, който има способността да стимулира NADPH-зависимата (NOX 2/4) АКФ продукция

Редно е също така да подчертаем, че активността на церулоплазмина и серумните нива на мед са основни показатели на медния статус и специфичната им динамика неминуемо поставя въпроса за значението на медния дефицит за изявата и рецидивите на предсърдното мъждене, както и за взаимовръзката между промените в медния и оксидативния статус.

В заключение бихме могли да кажем, че оксидативният статус при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене се характеризира със специфична динамика. Развива се оксидативен стрес още до двадесет и четвъртия час след клиничната изява на ритъмното нарушение. Той персистира след възстановяване на синусовия ритъм, като равновесие между прооксидантни и антиоксидантни процеси настъпва бавно във времето (до двадесет и осмия ден след прекъсване на ритъмното нарушение). Резултатите дават сериозно основание да предположим, че оксидативният стрес е тясно свързан с инициращите механизми на пароксизмално предсърдно мъжде-

не и неговите рецидиви. Същевременно те налагат необходимостта да се обмисли нов подход в антиоксидантната терапия, базиран едновременно на понижаване нивата на АКФ и стимулиране на антиоксидантната система.

## V. ИЗВОДИ

1. В настоящото проучване началните стойности на всички показатели са изследвани за първи път между втори и двадесет и четвърти час от клиничната изява на пароксизмалното предсърдно мъждене и показват значимо нарушение в оксидативния статус. Именно ранните промени в него са основание да допуснем тясната им взаимовръзка с интимните механизми на инициране на ритъмното нарушение.
2. Началните стойности на PI-MDA и Eg-MDA са силно повишени, което е показателно за активиране на липидната пероксидация още в първите часове след изявата на пароксизмалното предсърдно мъждене.
3. Намалените нива на GSH в плазма и еритроцити, установени при хоспитализацията на пациентите, свидетелстват за бързо редуциране на потенциала на неензимната антиоксидантна защита.
4. Повишената активност на SOD и CAT, установена при приема на болните в отделението, е индиректен белег за повишена продукция на АКФ в ранните часове на пароксизмалното предсърдно мъждене.
5. Понижената активност на GSH-Px, Glu-6-PhD и церулоплазмин, доказана при хоспитализацията на пациентите, отразява намалена възможност на ензимната антиоксидантна система да балансира прооксидантните процеси на този етап от заболяването.
6. След прекъсване на епизода на пароксизмално предсърдно мъждене, промените в оксидативния статус се възстановяват бавно във времето (всички показатели, с изключение на PI-MDA, остават значимо променени двадесет и четири часа след регуларизация на ритъма; на двадесет и осмия ден - само CAT запазва повишена активност).
7. При постъпване в отделението серумните нива на мед и активността на церулоплазмин са намалени и се възстановяват съответно до двадесет и четвърти час и двадесет и осмия ден след регуларизиране на ритъма. Динамиката в тези показатели отразява промени не само в оксидативния, но и в медния статус на пациентите с пароксизмално предсърдно мъждене.



## VI. НАУЧНИ ПРИНОСИ

Получените резултати имат оригинален характер.

1. Проведено е първо по рода си клинично проучване върху пароксизмално предсърдно мъждене с изследване в динамика на десет показатели на оксидативния статус, които позволяват да се оценят едновременно както прооксидантните процеси, така и антиоксидантната защитна система.
2. За първи път при пациенти с пароксизмално предсърдно мъждене е установено развитие на оксидативен стрес в първите часове от клиничната изява на заболяването (между втори и двадесет и четвърти час), резултат от засилени прооксидантни процеси и намалени неензимни и ензимни антиоксидантни механизми.
3. Доказано е, че възстановяването на синусов ритъм след епизод на пароксизмално предсърдно мъждене се асоциира с намаляване на оксидативния стрес и възстановяване на оксидативния баланс бавно във времето - до двадесет и осмия ден след епизод на ритъмно нарушение.
4. Установено е, че нивата на PI-MDA, Et-MDA и PI-GSH, както и активността на SOD, CAT и GSH-Px са предиктори за клинична изява на пароксизмално предсърдно мъждене. Изследването им в клиничната практика ще даде възможност за определяне вероятността за поява на пароксизмално предсърдно мъждене, както и за оценка на провежданото лечение.
5. Установените специфични промени в оксидативния статус убедително поставят въпроса за необходимостта от създаване на нов клас антиоксидантни средства в лечението на пароксизмално предсърдно мъждене, с комплексен механизъм на действие, потискащ прооксидантните процеси и активиращ антиоксидантната защитна система.
6. За първи път е установен меден дефицит при пароксизмално предсърдно мъждене и изказано предположение за участието му в инициращите механизми на заболяването.

### **Ограничения на проучването, очертаващи перспективи за бъдещи изследвания**

1. Няма информация за предварителния оксидативен статус на болните и доколко той би могъл да бъде свързан с инициращите механизми на ритъмното нарушение.
2. Няма информация за нивата и динамиката на оксидативния статус в случаите на чести рецидиви на предсърдно мъждене.

## **VII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **ПЪЛНОТЕКСТОВИ СТАТИИ В ЧУЖДЕСТРАННИ СПИСАНИЯ**

1. **Negreva MN**, Penev AP, Georgiev SJ, Alexandrova AA. Changes in Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity in Paroxysmal Atrial Fibrillation. *J Cardiobiol.* 2014;2(1): 5.
2. **Negreva MN**, Georgiev SJ, Penev AP, Prodanova K, Georgieva RB, Alexandrova AA. Assessment of Copper Status in Patients with Paroxysmal Atrial Fibrillation. *J Cardiobiol.* 2014;2(2): 5. (под печат)

### **ПЪЛНОТЕКСТОВИ СТАТИИ В БЪЛГАРСКИ СПИСАНИЯ**

1. **Negreva MN**, Penev AP, Georgiev SJ, Alexandrova AA. Paroxysmal atrial fibrillation: dynamics of the main antioxidant enzymes – superoxide dismutase and catalase. *Folia Medica* 2014; 56(2): 96-101.
1. **Negreva MN**, Georgiev SJ, Penev AP, Alexandrova AA. Dynamics of oxidative status in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Scripta Scientifica Medica.* 2014; 46. (под печат)

### **РЕЗЮМЕТА В ЧУЖДИ СПИСАНИЯ И СБОРНИЦИ**

1. Penev A, **Negreva M**, Aleksandrova A. Lipid peroxidation disorders in patients with recent-onset atrial fibrillation. *Europace.* 2013;15(suppl 2): ii16-ii41. IF:2.765.
2. **Negreva M**, Penev A, Aleksandrova A. Plasma copper homeostasis in patients with recent-onset atrial fibrillation and structurally normal hearts. *Europace.* 2013;15(suppl 2): ii122-ii167. IF:2.765.
3. **Negreva M**, Georgiev S, Penev A, Aleksandrova A. Dynamics of antioxidant defense system indicators in patients with atrial fibrillation. *JAFIB.* October, 2013 (special Issue): 148.
4. **Negreva M**, Penev A, Georgiev S, Aleksandrova A, Georgieva R, Angelov A. Status of selenium and selenoprotein glutathione peroxidase in patients with recent-onset atrial fibrillation. *JAFIB.* October, 2013 (special Issue): 147.

## УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ И КОНГРЕСИ

1. Пнев А, **Негрева М**, Александрова А. Оксидативен стрес при пациенти с пристъпно предсърдно мъждане и структурно здрави сърца. - Тринадесети Национален конгрес по кардиология, София, 04-07.10.2012. (*постерна сесия*)
2. Penev A, **Negreva M**, Aleksandrova A. Lipid peroxidation disorders in patients with recent-onset atrial fibrillation. - Congress of European Heart Rhythm Association, Athens, 23-26.06.2013. (poster presentation)
3. **Negreva M**, Penev A, Aleksandrova A. Plasma copper homeostasis in patients with recent-onset atrial fibrillation and structurally normal hearts. - Congress of European Heart Rhythm Association, Athens, 23-26.08.2013. (poster presentation)
4. **Negreva M**, Georgiev S, Penev A, Aleksandrova A. Dynamics of antioxidant defense system indicators in patients with atrial fibrillation. - 13<sup>th</sup> Edition of VeniceArrhythmias, Venice, 27-29.10.2013. (poster presentation)
5. **Negreva M**, Penev A, Georgiev S, Aleksandrova A, Georgieva R, Angelov A. Status of selenium and selenoprotein glutathione peroxidase in patients with recent-onset atrial fibrillation. - 13<sup>th</sup> Edition of VeniceArrhythmias, Venice, 27-29.10.2013. (poster presentation)

*Изказвам благодарности на научните си ръководители  
доц. д-р Светослав Георгиев, дм  
и доц д-р Атанас Пенев, дм,  
и на целия колектив  
от Интензивно кардиологично отделение.*

*Благодаря на семейството ми  
за подкрепата им и търпението!*