

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ- СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Ректор: проф д-р Бойчо Ланджов, дм

**КАТЕДРА ПО СЪРДЕЧНО-СЪДОВА ХИРУРГИЯ И ИНВАЗИВНА
КАРДИОЛОГИЯ**

Ръководител: проф. д-р Димитър Петков - д.м.н.

УМБАЛ “Св.Екатерина” – София

Директор: проф. д-р Димитър Петков - д.м.н.

д-р Камен Петев Станев

**Ефект на триметазидина върху исхемичната реперфузионна
увреда при on pump коронарна хирургия**

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна

степен „Доктор”

Професионално направление 7.1.Медицина

Научна специалност Сърдечно-съдова хирургия

Научен ръководител: проф. д-р Димитър Петков - д.м.н.

Научен консултант: проф. д-р Генчо Начев - д.м.н.

гр. Пловдив, 2025 г.

Съдържание:

I. Въведение.....	3
II. Литературен обзор.....	6
III. Цел и задачи.....	34
IV. Материали и методи.....	35
V. Резултати.....	46
VI. Обсъждане.....	89
VII. Изводи.....	103
VIII. Научни приноси във връзка с дисертационния труд.....	103
IX. Библиография.....	105
X. Приложения.....	123

Списък на използваните съкращения:

АТФ - аденозин трифосфат
АХ - артериална хипертония
ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина
ЕКГ - електрокардиограма
ЕКК - екстракорпорално кръвообращение
МДА - малондиалдеhid
ИБС - исхемична болест на сърцето
САН - систолно артериално налягане
СЗО - Световна Здравна Организация
ФИ - фракция на изтласкване
ХОББ - хронична обструктивна белодробна болест
АКІ - остро бъбречно увреждане
АLАТ - аланин аминотрансфераза
ANOVA - *ANalysis Of VAriance* - Дисперсионен анализ
ASA - ацетилсалицилова киселина
ASAT - аспартат аминотрансфераза
САВG - коронарна хирургия
СРК - креатин фосфокиназа
СРВ - кардиопулмонален байпас
СРК-МВ/СК-МВ - креатин фосфокиназа - фракция МВ
СVVHDF- продължителна вено-венозна хемодиафилтрация
ЕСМО - екстракорпорална мембранна оксигенация
ELISA - ензимно свързан имуносорбентен анализ
HD - хемодиализа
IR - исхемия-реперфузия
NYHA - New York Heart Association
MDA - малондиалдеhid
POAF - постоперативно предсърдно мъждене
PTCA - перкутанна транслуменална ангиопластика
PUFA - полиненаситени мастни киселини
RNOS/ROS - реактивни азотни и кислородни съединения
SOD - супероксид дисмутаза
TMZ - триметазидин
TrT - тропонин T

I. Въведение

Концепцията, че реперфузията с кислород в исхемичния миокард причинява значителна увреда е отдавна известно [1]. Добре установено е и това, че оксидативният стрес е един от основните инициатори на увреждане на миокарда по време на исхемия и реперфузия [2]. Коронарната хирургия обикновено включва сърдечно-белодробен байпас с кардиоплегичен арест и предизвикана глобална исхемия на сърцето. Погледнато от изследователска гледна точка това може да се разглежда като модел за оценка на потенциалното увреждане, предизвикано от оксидативен стрес по време на исхемията и последващата реперфузия, тъй като при тази клинична ситуация (и необичайно за повечето исхемични състояния) времето за начало и продължителност на исхемията, както и реперфузията са контролирани.

Това означава, че са възможни проучвания при пациенти, подложени на операция с дизайн, подобен като този на експерименталните изследвания с участието на животински модели. В експериментални изследвания върху плъхови сърца, исхемията и реперфузията генерират свободни радикали, получени от кислород; използването на електронно спин-резонансни техники позволяват директното откриване на реактивни кислородни форми, образувани при реперфузията на исхемичния миокард [3] и също така показва, че продукцията им може да бъде предотвратена чрез различни антиоксиданти или неутрализиращи агенти [4].

Голям брой експериментални изследвания, които симулират хирургична исхемия и реперфузия показват, че различни антиоксидантни агенти могат да намалят вредните ефекти на оксидативния стрес в резултат на исхемия и реперфузия и водят до подобряване на сърдечната функция след исхемията, когато агентите са добавени преди или по време на плегията, като съставка на кардиоплегичния разтвор [5,6].

Сърдечната хирургия също предизвиква „зашеметяване“ или stunning на миокарда (разглеждано като преходна сърдечна дисфункция) в първите няколко часа след реперфузията [7,8] и може да се очаква, че това също трябва да се подобри с прилагането на антиоксиданти. Така че може да се предположи, че оксидативния стрес индуциран по време на сърдечна операция, може да е фактор, върху който да се съсредоточим в стремежа си да подобрим постисхемичното възстановяване. Същевременно има съществена разлика между изследвания върху животински модели, обикновено със здрави сърца и клинични проучвания на пациенти с исхемична болест, нуждаещи се от сърдечна хирургия, чиито миокард е доста по-толерантен на увреда, поради активиране на ендогенни адаптационни механизми, като исхемичното прекондициониране. Приложението на медикамент, като триметазидина, чието действие върху оксидативния стрес има подобен ефект, може да има важна роля във възстановяването след сърдечна операция. Въпросът дали оксидативният стрес оказва влияние върху постоперативните резултати при пациенти след коронарна хирургия все още няма категоричен отговор. Пациентските модели трудно биват уеднаквявани и влиянието на много фактори, които могат да повлияят на резултатите, като придружаващи заболявания, възникнали усложнения, разлики в предоперативната и следоперативната терапия, не могат да бъдат пренебрегнати.

Интерпретацията на резултатите и направените изводи при тези условия, могат да бъдат подвеждащи. Стремежът в нашето изследване е да бъдат подбрани пациенти в групите с максимално близки изходни характеристики, подложени на една и съща хирургична процедура и медикаментозна терапия, за да бъдат избегнати в голяма степен тези негативи. Търсихме ефект на триметазидин в изследваната група изцяло следоперативно, тъй като в реалната практика коронарната хирургия често е в спешен или неотложен порядък и без условия за продължителна

предоперативна медикаментозна терапия, както е в предходните изследвания на други автори.

II. Литературен обзор

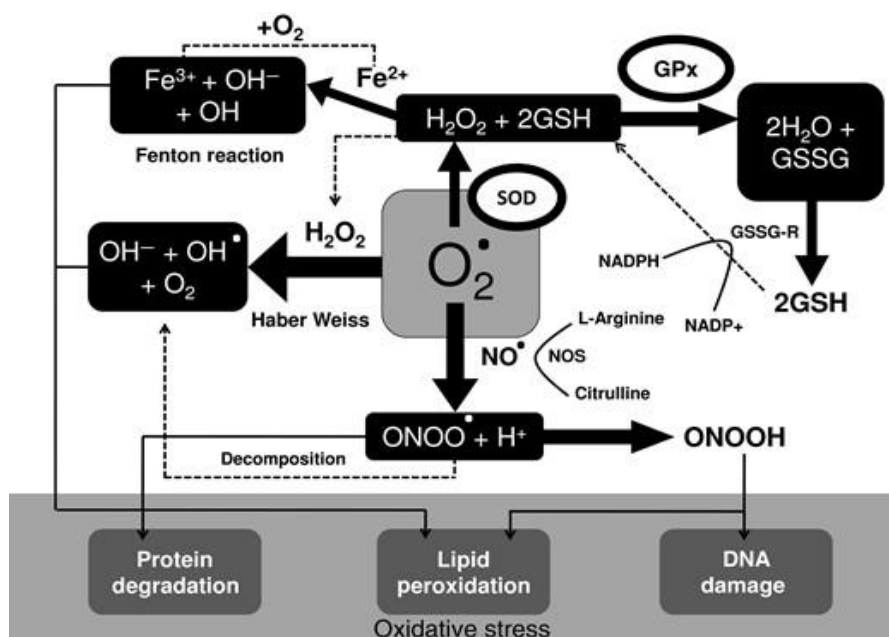
ОКСИДАТИВЕН СТРЕС

Оксидативният стрес е една от причините за увеличаване на заболяемостта и смъртността при сърдечно оперирани пациенти, както и критично болни и пациенти, изискващи хемодиализа (HD) [9–12]. Тези пациенти са изложени на различни екстракорпорални циркулационни устройства, като кардиопулмонарен байпас (CPB), HD и екстракорпорална мембранна оксигенация (ECMO). Оксидативния стрес се повишава и при специфични състояния в сърдечната хирургия, като периода исхемия-реперфузия (IR), съпровождащ сърдечния клампаж. Съществените доказателства от изследвания на CPB, IR и HD показват стимулиране на възпалителния отговор, генериращ реактивни азотни и кислородни съединения (RNOS) и превъзможвайки ендогенните антиоксиданти, което води до повишен оксидативен стрес [9, 10, 13]. Чрез разбиране на множеството фактори, които възникват по време на CPB и IR, отговорни за генерирането на RNOS, могат да бъдат разработени стратегии, които смекчават или намаляват тяхното генериране и по този начин намаляват свързаните усложнения.

Оксидативният стрес може да се определи като „нарушаване на редокс сигнализацията и контрола“ [14]. При нормални физиологични условия RNOS играят съществена роля в клетъчната сигнализация (вторични медиатори), имунитета и клетъчната защита [9]. Както вътре-, така и извънклетъчните нива на RNOS се контролират от антиоксидантни агенти, за да се поддържа този редокс-баланс [9]. Въпреки това, по време на различни хронични и остри заболявания увеличаването на производството на RNOS и загубата на редокс контрол е отговорно за

тъканно и клетъчно увреждане. Например, нарушаването на вътреклетъчната редокс среда може да доведе до клетъчна апоптоза, стареене и нарушена диференциация [15]. Съществуват три класически механизма, чрез които RNOS проявяват вредните си ефекти, (I) пероксидиране на липиди, (II) денатурация на протеини или (III) увреждане на ДНК [1] (фиг. 1).

Фигура 1:



Опростен механизъм на оксидативен стрес, клетъчно генериране на RNOS и антиоксидантно действие на SOD и GPx. $O_2^{\cdot-}$: супероксиден радикал; H_2O_2 : водороден пероксид; $ONOO^{\cdot}$: перокси радикал; OH^{\cdot} : хидроксилен радикал; NO^{\cdot} : азотен радикал; SOD: супероксид дисмутаза; GPx: глутатион пероксидаза; GSH: глутатион; GSSG: окислен глутатион; GSSG-R: глутатион редуктаза.

Липидна пероксидация

Липидната пероксидация е важен компонент на оксидативния стрес и е свързана с редица заболявания, включително стареене, атеросклероза, болест на Паркинсон, болест на Алцхаймер, захарен диабет, катаракта и

ревматоиден артрит [16, 17]. Липидната пероксидация променя мембранната течливост и пропускливост, понякога необратимо, което води до физиологични промени, като например променени йонни градиенти в мембраната [16]. Липидите в клетъчните мембрани, особено полиненаситените мастни киселини (PUFA), са податливи на атака от различни RNOS, като хидроксилни радикали и пероксидхидрати [17]. Обикновено увреждането при тези условия е многостепенна последователност от събития, започващи с RNOS-медирано извличане на водород от липидната молекула, създавайки радикал на мастна киселина, който сам извлича водороден атом от съседната липидна молекула, създавайки друг радикал на мастна киселина. Тази саморазпространяваща се фаза вече не изисква присъствието на инициращата RNOS за продължаване и разширяване [17]. Спирането на последователността на липидната пероксидация изисква намесата на антиоксидант, който разрушава веригата от реакции, като витамин E, или радикала на мастната киселина, за да реагира с друг радикал, потушавайки процеса [17].

Окислително увреждане на протеините

Подобно на липидите, протеините също са основен компонент на клетъчните мембрани, както и са част от различни основни ензими в тялото. Протеините са податливи както на директно, така и на индиректно увреждане от RNOS. Радикалите на хидроксилна и азотна основа могат да увредят различни аминокиселини, освен това протеините, които съдържат сяра в своята структура (като цистеин и метионин), също са податливи на окислително увреждане [9]. Няколко RNOS могат също да взаимодействат директно с протеини, нарушавайки мембранните транспортни йонни механизми или причинявайки инактивиране на ензими и аминокиселини [9]

Окислително увреждане на ДНК

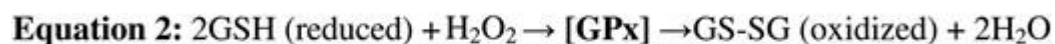
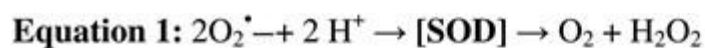
ДНК обикновено е стабилна молекула; обаче, в присъствието на високи концентрации на радикален хидроксил, настъпва окислително увреждане [18]. Окислителното увреждане на ДНК е свързано с канцерогенеза, невродегенеративни заболявания, сърдечно-съдови заболявания и стареене [16, 18]. Неконтролираното увеличаване на RNOS води до модификация на ДНК бази, единични и двойни разкъсвания на ДНК, загуба на пурины, увреждане на дезоксирибозата, крос-линкинг на ДНК-протеин и увреждане на системата за възстановяване на ДНК [18]. Две от най-често срещаните базови модификации включват 8-оксо-7,8-дихидрогуанин и 2,6-диамино-4-хидрокси-5-формаид пиримидин [19]. Някои окислителни увреждания на ДНК могат да бъдат предотвратени или с антиоксиданти, или да бъдат репарирани от различни ендогенни ензими за възстановяване на ДНК; обратно, намалените нива на антиоксиданти или микроелементи могат да възпрепятстват механизмите за възстановяване, което води до трайно увреждане [18, 20]

АНТИОКСИДАНТНА ЗАЩИТА СРЕЩУ ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС

Ендогенният антиоксидантен отговор е координирано усилие между ензими, протеини и витамини за премахване, промяна или инактивиране на прекомерното натрупване на RNOS. Това е многопластова защитна система и точното естество на антиоксидантния отговор се влияе от (I) разтворимостта на антиоксиданта (разтворимост в липиди или вода), (II) дали е ензим или не и (III) относителната концентрация на специфични антиоксиданти в цитозол, плазма или тъкан [9]

От редокс гледна точка, ензимните антиоксиданти представляват първата линия на защита в клетките и плазмата [9]. Тези първични антиоксиданти включват супероксид дисмутаза (SOD), глутатион пероксидаза (GPx) и каталаза [9]. SOD ензимите присъстват в повечето извънклетъчни течности, както и в аеробни клетки в митохондриите и цитозола. Функцията на всички форми на SOD е дисмутацията на супероксидния радикал ($O_2 \cdot^-$) към водороден пероксид (H_2O_2) (фиг. 2, уравнение 1) [9]. Основната функция на GPx (1-4) е да катализира редукцията на водороден пероксид до вода (фиг. 2, уравнение 2) за сметка на глутатиона (GSH). GSH се окислява в този процес, образувайки GS-SG, и в присъствието на GSH редуктаза, GS-SG се редуцира обратно до GSH за сметка на никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидаза (NADPH) (Фиг. 2, Уравнение 3) [9]. Каталазата присъства в пероксизомите на клетките и играе предимно роля в ензимното разлагане на водороден пероксид, когато нивата на водороден пероксид са високи в клетката (фиг. 2, уравнение 4) [9].

Фигура 2:



Тези антиоксидантни ензими реагират директно с RNOS, преди да могат да реагират с липиди или протеини, като по този начин предотвратяват или забавят генерирането на вторични и третични радикали. За нормалното им функциониране са необходими микроелементи, например селен за GPx, мед, цинк или манган за SOD и

желязо за каталаза [21]. Неензимните антиоксиданти включват β -каротин, витамин Е, витамин С, GSH и коензим Q, които действат предимно като антиоксиданти за пречистване и разрушаване на веригите [16, 21]

Сърдечната хирургия, използваща CPB, е свързана със системно възпаление, исхемично-реперфузионно увреждане (IR) и хирургична травма, които са силни стимуланти на генерирането на RNOS, водещи до повишен оксидативен стрес по време и след операцията (Фиг. 3) [10, 22]. Все повече доказателства сочат, че тази реакция на оксидативен стрес е основен фактор за усложнения като постоперативно предсърдно мъждене (POAF), остро бъбречно увреждане (AKI) и остро белодробно увреждане след сърдечна операция [11, 23, 24].

Повишено производство на RNOS се наблюдава при реперфузията на исхемичното сърце след кардиоплегичен миокарден арест по време на операция [16, 25]. По време на IR ендотелните клетки реагират, като произвеждат ксантин оксидаза, генерирайки супероксидния радикал [9, 16]. В допълнение, IR- периода води до намалена функция на миокардните антиоксиданти, особено GPx [25]. Повишеният оксидативен стрес на миокарда причинява нарушена предсърдна и камерна контракция, промяна в енергията на миофибрилите, намаляване на ефективния рефрактерен период на предсърдията, водещ до POAF и спад във фракцията на изтласкване (EF).

Ендогенната антиоксидантна защитна система се състои както от вътреклетъчни, така и от извънклетъчни антиоксиданти, които регулират количеството на RNOS. Съществуват значителни нарушения на тази антиоксидантна система по време на сърдечна хирургия. По-конкретно, има намаляване на нивата на антиоксидантни микроелементи като селен, цинк и витамин С [26]. Някои от тези спадове по време на ЕКК са резултат от (I) преразпределение в остра фаза в резултат на повишения възпалителен отговор, (II) абсорбция в ЕКК веригата и (III) екскреция в

телесни течности/диализат [26, 27, 28]. В допълнение към осигуряването на подходящ хранителен режим при пациенти, изложени на ЕКК, добавянето на тези антиоксидантни микроелементи, както и терапия с медикаменти с антиоксидативен ефект може на относително ниска цена да смекчи на ефектите от оксидативния стрес [26, 29].

МАЛОНДИАЛДЕХИД КАТО МАРКЕР ЗА ОКСИДАТИВЕН СТРЕС

Оксидативният стрес е свързан с етиопатогенезата на много хронични заболявания и играе първостепенна роля в процеса на стареене [30, 31]. От многото биологични субстанции, мишени на оксидативен стрес, липидите са най-засегнатият клас биомолекули. Липидното окисление поражда редица вторични продукти, които са предимно алдехиди, със способност да изострят оксидативното увреждане [32]. Дълготрайността и високата реактивност позволяват на тези молекули, да действат вътре и извън клетките, взаимодействайки с биомолекули като нуклеинови киселини и протеини, и често необратимо да увреждат деликатните механизми, отговорни за клетъчната функция.

Малондиалдехидът (MDA) е основният и най-изследван продукт от пероксидирането на полиненаситените мастни киселини. От 60-те години на миналия век различни методи са разработени за оценка на тази молекула в количественото определяне на нивата на оксидативен стрес *in vivo* и *in vitro*.

Основният източник на MDA в биологичните проби е пероксидирането на полиненаситени мастни киселини с две или повече метиленови двойни връзки.

Три вероятни хипотези, описващи *in vivo* формиране на MDA бяха предложени.

Pryor и Stanley [33], основават техния хипотезен механизъм относно енергонезависимата природа на MDA-предшественика, като описват този прекурсор като бицикличен ендопероксид, подобен на този, образуван по време на биосинтезата простагландин. Смята се, че MDA произхожда от тези прекурсори при стресови условия. Този механизъм е потвърден от проучване извършено от Frankel и Neff [34], които изследват кои окислени липиди са в състояние да произвеждат MDA като продукт на разлагане.

Другите два механизма са постулирани от Esterbauer и колеги [35]. Те се основават на последователни хидропероксидни преобразувания и β -разцепване на веригата на мастни киселини за получаване на хидропероксиалдехид; След това MDA се генерира чрез β -разцепване или чрез реакция на крайния акролеинов радикал с хидроксилен радикал.

MDA може също да се генерира *in vivo* чрез ензимни процеси от различни простагландини, както е описано от Hecker и Ullrich [36]. Те показват, че биосинтезата на тромбоксан A₂ (TXA₂) води до малондиалдехид и 12 (S) -хидрокси-8,10 (E, E)-хептадекадиенова киселина (HHT) като вторични продукти.

В своето физиологично състояние, при неутрално pH, MDA присъства като енолатен анион и е с ниска химическа реактивност [35]. Въпреки това, тази молекула е в състояние да взаимодейства с нуклеинови бази, за да се образуват няколко различни съединения [37]. Основният продукт на тази реакция е пиримидо- [1,2-а]пурин-10 (3H) -он дезоксирибоза, докладвани в литературата с много различни съкращения, като M1dG, M1GdR или M1G, което е в равновесие с отворената форма N²-оксопропенил-гуанозин. Най-новият механизъм на мутация, предложен за този адукт се съобщава от VanderVeen et al. [38]. Това проучване ясно показва, че M1G е в състояние да индуцира последователно зависими мутации в клетки на бактерии и бозайници. От друга страна, Niedernhofer предлага алтернативен механизъм на генотоксичност [39], включващ

способността на MDA да създава междуверижни кръстосани връзки в ДНК, които имат мощни биологични ефекти.

Voitkun и Zhitkovich [40] съобщават за способността на MDA за генериране на ДНК-протеинови кръстосани връзки. Те изследват кръстосани реакции между ДНК и хистони, медиранни от MDA в йонни и рН стойности отговарящи на физиологичните. Въз основа на тяхното описание, в този случай MDA първо реагира с протеиновата фракция и след това образува кръстосана връзка. Обратно, когато MDA реагира първо с ДНК не се образува кръстосана връзка. Въпреки това, биологичното значение на този вид взаимодействие на MDA с биомолекули все още не е напълно изяснено.

Всички тези потенциално генотоксични действия на MDA може да доведат до мутации и впоследствие до неоплазии. Независимо от това, токсичността на MDA е насочена и към сърдечно-съдова система. Отчита се MDA да реагира *in vivo* с първични амини за формирането на N³-(2-пропенал) лизин и генериране на лизино-лизин кръстосано свързан с 1-амино-3-иминопропен и пиридил дихидропиридинови мостове[32]. Тези реакции са открити в апоВ фракциите на окислени липопротеини (LDL) и се смята, че участват в нарушеното взаимодействие на модифицираните липопротеини с макрофаги [41]. Това явление е в основата на съдовата атерогенност.

Друго вероятно токсично действие на MDA включва колагена. Дори ако естеството на кръстосаната връзка не е толкова все пак определена в детайли, междумолекулния cross-linking на колаген чрез MDA може значително да допринесе за фиброзиране на сърдечно-съдовата тъкан [42]. MDA е в състояние да увреди няколко физиологични механизмите на човешкото тяло, чрез неговите способности да реагира с молекули като ДНК и протеини.

Следователно е полезно да се разглежда тази молекула, като нещо повече от продукт на липидна пероксидация.

ТРИМЕТАЗИДИН

Механизъм на действие

Доказано е, че триметазидина, известен от години като ефективен антиангинозен агент, измества метаболизма на кардиомиоцита от окисляване на мастни киселини към окисление на глюкоза чрез инхибиране на митохондриалната дълговерижна 3-кетоацил коензим А тиолаза. Чрез намаляване на окисляването на мастни киселини, триметазидина стимулира оползотворяването на глюкозата [43], възстановявайки връзката между гликолизата и окисляването на въглехидратите, водещо до производство на аденозин трифосфат с по-малък разход на кислород. Антиангиналните свойства на този агент не зависят от хемодинамичните промени и драстично подобряват възстановяването на механичната функция след исхемия. Триметазидина се разглежда като прототип на нов клас антиангинални агенти: 3-кетоацил коензим А тиолаза инхибитори.

Ползите от увеличеното утилизирание на гликолитичен субстрат се дължат на редица механизми. Броят молекули на аденозин трифосфатаза (АТФ), произведени на мол окислен въглерод, е приблизително 29% по-висок за свободните мастни киселини спрямо глюкозата, но броят на молекулите на АТФ, произведен на мол консумиран кислород, е с 12% по-висок за глюкозата, отколкото за свободно окисляване на мастни киселини. По този начин, при нормални условия, миокардът по-ефективно оползотворява свободни мастни киселини, но по време на исхемия глюкозата е по-добър субстрат [44]. Чрез намаляване на окисляването на

мастни киселини и стимулиране на използването на глюкозата, триметазидин възстановява свързването между гликолизата и окисляването на въглехидратите и води до производство на АТФ с по-ниска консумация на кислород. Чрез стимулиране на мембрания фосфолипиден обмен по време на исхемия и реперфузия, триметазида пренасочва мастните киселини към фосфолипидите [45].

Клетъчни ефекти на триметазида по време на периода исхемия-реперфузия

В заешки сърца, подложени на последователност от исхемия - реперфузия, триметазидинът инхибира натрупването на неутрофили без неблагоприятни ефекти върху съдовата пропускливост [46]. Експерименталните проучвания показват също, че триметазидинът предпазва миокардните клетки от реперфузионно увреждане, намалява вътреклетъчната ацидоза по време на исхемия и ускорява възстановяването на фосфорилирането при реперфузия. Добавянето на триметазидин към кардиоплегичен разтвор ограничава изчерпването на АТФ, отслабва вътреклетъчната ацидоза и ускорява метаболитното възстановяване при реперфузия [47].

При пациенти, подложени на коронарна хирургия, добавянето на триметазидин към кардиоплегичния разтвор е свързано с намаляване на биохимичните маркери за клетъчно увреждане и липидна пероксидация [48]. В проучвания върху животни антиисхемичните свойства на триметазидин са свързани с намаляване на размера на инфаркта [49, 50] и с драматично възстановяване на механичната функция след исхемия [51]. Хипотезата, че триметазидин има директно цитопротективно действие, се потвърждава и от наблюдения при пациенти, подложени на перкутанна транслуминална коронарна ангиопластика(РТСА), при която

интракоронарно приложеният триметазидин значително намалява ЕКГ признаците на исхемия по време на раздуването на балона [52].

Триметазидин: клинична ефикасност

Ефикасността на триметазидин като антиангинално лекарство е оценена в рандомизирани, плацебо-контролирани проучвания, както като „самостоятелно“ лечение, така и в комбинация с бета-блокери и блокери на калциевите канали.

При пациенти с хронична ангина пекторис триметазидин повишава виталния капацитет и забавя появата на симптоматика и ЕКГ промени по време на физически усилия [53-55]. Наблюдаваните ползи са както след еднократно приложение, така и като поддържаща терапия, която се понася добре от пациентите [56].

Сравнителните проучвания показват, че ефикасността на триметазидин при хронична ангина е сравним с този на нифедипин и пропранолол, като продължително лечение с триметазидин е с по -ниска честота на странични ефекти [57–60]. Като се има предвид липсата на ефекти върху сърдечната честота и кръвното налягане, триметазидин изглежда идеален като средство за комбинирана терапия с класическите антиисхемични медикаменти при хроничното лечение на ангина пекторис. При пациенти, които вече са получавали нифедипин или пропранолол, добавянето на триметазидин значително подобрява клиничния статус и намалява броя на исхемичните епизоди за седмица. Тези клинични ефекти са свързани с удължаване на времето за физически усилия до появата на исхемични симптоми и ST-промени в ЕКГ. Страничните ефекти са били значително по -редки при пациенти, получаващи триметазидин, отколкото при пациенти, получаващи нифедипин или пропранолол [57–60]. Доказателства в подкрепа на хипотезата, че механизмът на действието на

триметазидин е различно от хемодинамичните ефекти на бета-блокери и че метаболитният подход може да бъде адитивен в полза на хемодинамично активните агенти са получени от мултицентрово, рандомизирано, двойно-сляпо проучване, в което добавяне на триметазидин към пропранолол се сравнява с добавяне на нитрати към пропранолол [61]. Това проучване е проведено при пациенти с хронична ангина пекторис и документирана коронарна атеросклеротична болест и заключението е, че комбинацията на триметазидин с пропранолол е по-ефективна и се понася по-добре от комбинацията на нитрати с пропранолол. Подобни доказателства са получени в двойно-слепи, рандомизирани проучвания, проведени при пациенти с ангина, контролирана с дилтиазем [62, 63]. Тези проучвания показват, че добавянето на триметазидин значително намалява броя на исхемичните атаки, удължава времето за физическа активност и времето до появата на стенокардия. Тези положителни ефекти са получени без нежелани хемодинамични промени или повишена честота на неблагоприятни странични действия.

ТРИМЕТАЗИДИН И КОРОНАРНА ХИРУРГИЯ

1. Въведение

Продължителната исхемия, както при развитието на остър миокарден инфаркт, коронарна хирургия или друг тип сърдечна хирургия свързана с клампаж, застрашава клетъчната жизнеспособност и в крайна сметка сърдечната функция [64] [65]. Миокардна исхемия с ограничена продължителност, по-малка от 20 минути, последвана от реперфузия, е придружена от функционално възстановяване без данни за структурни или биохимични данни за увреждане на тъканите. Парадоксално е, че реперфузията на сърдечната тъкан, която е била подложена на

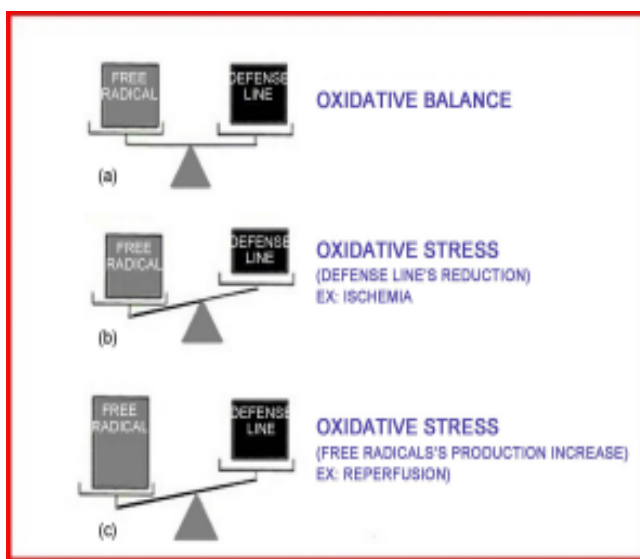
продължителен период на исхемия (> 20 минути), води до явление, известно като миокардна реперфузионна увреда [64] [65] [66]. Миокардното реперфузионно увреждане се определя като загиване на миоцити, живи по време на реперфузията, като пряк резултат от едно или повече събития, инициирани от реперфузия. Следователно увреждането на миокардните клетки е резултат от възстановяването на кръвотока към въведено в исхемия сърце, като по този начин разширява областта на необратима увреда извън това, дължащо се на самата исхемия [64] [67] [68]. Реперфузионната увреда може също да бъде определена като „тези метаболитни, функционални и структурни последствия на възстановения коронарен артериален поток, които могат да бъдат избегнати или обърнати чрез промяна на условията на реперфузия”[66].

Клетъчното увреждане при реперфузионно увреждане може да бъде обратимо или необратимо, в зависимост от продължителността на исхемията. Ако се започне реперфузия в рамките на 20 минути след началото на исхемията, полученото увреждане на миокарда е обратимо и се характеризира функционално с потиснат контрактилитет на миокарда, който в крайна сметка се възстановява напълно. Некрозата на миокардната тъкан не се открива при предходно исхемичната област, въпреки че функционалното увреждане на контрактилитета може да продължи за известен период като stunning (зашеметяване) на миокарда. Инициирането на реперфузия след продължителност на исхемията повече от 20 минути обаче води до тежка миокардна травма или клетъчна некроза [64] [67] [68]. Необратимото реперфузионно миокардно увреждане се определя като индуцирана от реперфузия клетъчна смърт на кардиомиоцитите, които все още са жизнеспособни по време на възстановяване на притока на кръв [64]. По този начин необратимото реперфузионно увреждане разширява зоната на първоначалния инфаркт причинен от исхемия с по-нататъшно клинично влошаване и развитие на аритмии [64] [67] [68].

2. Механизми на исхемично-реперфузионна травма

Основните механизми на увреждане при миокардната реперфузия са отсъствието на нормално окислително фосфорилиране (Фигура 3), оксидативен стрес (предимно свободни от кислород радикали), неутрофилно-ендотелни взаимодействия, апоптоза и калциево претоварване [69]. Малко вероятно е да има някакъв единствен патофизиологичен механизъм на увреждане на миокарда. Когато множество патологичните събития се случват едновременно, реперфузионното увреждане е в добавка и вероятността за необратимо увреждане на миокарда нараства значително [69].

Фигура 3:



Продължителната исхемия причинява липсата на нормално окислително фосфорилиране и намалени концентрации на аденозин трифосфат в миокардната тъкан (АТФ) и креатин фосфат в митохондриите, което води до ултра-структурни промени [70] [71]. Първоначално, когато използването на АТФ надвишава капацитета на миоцити за ресинтезиране на високоенергийни фосфати, разграждането на адениновите нуклеотиди води до превръщане на аденозин дифосфат (ADP) в аденозин монофосфат

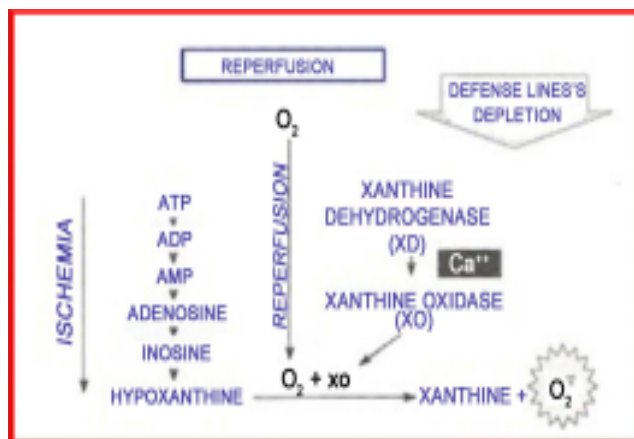
(AMP) [70]. По-нататъшно устойчиво намаляване на наличността на АТФ води до необратимо увреждане на миоцитите, свързано със сарколемно увреждане, ацидоза и вътреклетъчен оток [70]. Миокардната исхемия е допълнително свързана с натрупване на вътреклетъчна млечна киселина [72] и намаляване на окислението на мастни киселини, което обикновено осигурява 60% до 90% от енергийните нужди на миокарда [73].

2.1 Оксидативен стрес

Хипотезата за кислородния парадокс се основава на базата, че кислородът може да причини увреждане на исхемичния миокард по време на реперфузия [68]. При реперфузия, миоцитите преминават от хипоксично състояние до нормални нива на кислорода много бързо, така иницирайки секвенциране на O₂, водещо до продукцията на реактивни кислородни форми [68] [74]. Клетките, които се сблъскват с реактивни кислородни форми (ROS), претърпяват окислително увреждане, тъй като ROS става по-стабилен за сметка на близки молекули в контакт. При физиологични условия, малки количества ROS се образуват в митохондриите, но те могат да се инактивират чрез ендогенни механизми за изчистване [75].

След реперфузия много почистващи молекули се „измиват“ от зоните, в които защитата от ROS е критично необходима [76] [77]. Обикновено хипоксантинът, произведен от метаболизма на AMP, по-нататък се метаболизира от ксантин дехидрогеназата (XD) до ксантин [78]. По време на исхемия, обаче, XD се превръща в ксантиноксидаза (XO) чрез калций (Ca²⁺) зависещи протеази (Фигура 4).

Фигура 4:



ROS може да причинят активиране на неутрофили, вариации между митохондриалните електронни вериги, намалена контрактилност, автоокисление на катехоламини, активиране на арахидоновата каскада, циклооксигеназа и липоксигеназа, липидна пероксидация, увреждане на дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК) и увреждане на митохондриалната функция, които могат да прогресират до структурно увреждане на миоцитите [68] [76].

2.2 Теория за претоварване с калций

Инициирането и развитието на акционният потенциал в миокарда се получава от навлизането на натриеви йони (Na^+) през сарколемата в положителна обратна връзка. Притокът на извънклетъчни Ca^{2+} йони през калциеви канали от L-тип (LTCC) (известен също като дихидропиридинови рецептори, DHP) поддържа деполяризацията на кардиомиоцитите за по -дълго време [17] [18]. Индуцирано от калциевите йони, освобождаването на калций от саркоплазмения ретикулум (SR) се случва при нормално свързване на процесите възбуждане-контракция (EC). След увеличаване на вътреклетъчните Ca^{2+} концентрации, йони на Ca^{2+} се свързват с тропонина, който инициира контракцията, като позволява на контрактилните протеини миозин и актин да се свържат чрез образуване

на напречен мост. Връщането на Ca^{2+} в SR се регулира чрез сърдечен рианодинов рецептор тип 2 (RyR2) и тази функция зависи от цитозолните стабилизиращи протеини FKBP12 и FKBP12.6 и техните съединения към RyR2 [79] [80].

При сърдечен инфаркт и исхемично-реперфузионно увреждане тази регулация на Ca^{2+} поток е нарушена и е доказано, че FKBP12 се отделя от RyR2. Това позволява изтичането на Ca^{2+} йони да се увеличи от SR в цитозола. Повишеният цитозолен калций може да активира протеинкинази, фосфолипази и други разграждащи ензими [79] [81] [82].

2.3 Неутрофилно-ендотелните взаимодействия

По време на миокардна исхемия-реперфузия, неутрофилите се активират от възпалителни молекули, освободени от сърдечни миоцити, ендотелни клетки и мастоцити, което води до атака на неутрофили срещу собствените тъкани [83] [84]. Неутрофилите се активират чрез комплемент C5a и цитокини като интерлевкини (IL), IL-6, IL-8, тъканно некротичен фактор-алфа (TNF- α), неутрофил-активиращ пептид и тромбоцит активиращ фактор [69].

Неутрофилите допринасят за миокардната реперфузионна увреда чрез производството на ROS, протеолитични ензими и цитокини, ендотелна дисфункция, запушване на капилярите и директно увреждане на миоцитите [83] [85]. Неутрофилите също причиняват коронарна констрикция, което може да влоши сърдечната дейност [86]. Чрез процес, наречен “no-reflow”, агрегиращите неутрофили могат да запушат микроциркулацията и да увеличат съпротивлението на капилярния кръвен поток, причинявайки микроциркулаторна исхемия и тъканни инфаркти [87]. No-reflow се определя като тежка микроваскуларна дисфункция, която ограничава тъканното перфузиране по време на реперфузия [88].

Ендотелната дисфункция се проявява през първите 2,5 до 5 минути от реперфузията.

Ефектите от ендотелната дисфункция включват активиране на тромбоцитите и неутрофилите, вазоконстрикция, повишено производство на ROS и повишена екстравазация на протеини и течности [88].

2.4. Митохондриална дисфункция и апоптоза

Митохондриална пермеабилитетно пропусклива пора (MPTP), митохондриална дисфункция и апоптоза.

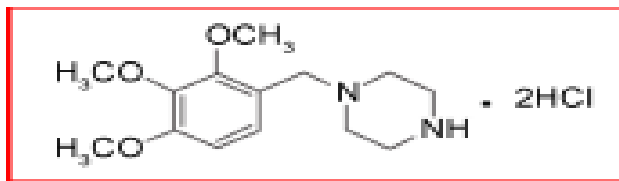
Обикновено респираторната верига освобождава само малки количества ROS предимно от митохондриален комплекс I. По време на ранната реперфузия, ROS образувани от различни източници, включително респираторната верига, са значително увеличени. Митохондриални комплекси I и III са основни източници на патологично производство на ROS. MPTP е йонен мега-канал с голяма проводимост, предполагаемо съставен от волтаж-зависимия анионен канал във външната мембрана, адениновия нуклеотиден транспортер във вътрешната мембрана и циклофилин D в матрицата. При физиологични условия MPTP е предимно в затворено състояние [89]. Отварянето на MPTP причинява разрушаване на вътрешната митохондриална мембрана. Мембраната загубва потенциала си, настъпва изчерпване на резерва на митохондриалния никотинамид аденин динуклеотид (NADH) и окислителното фосфорилиране се прекъсва, което води до ускоряване на производството на ROS и може да доведе до по-нататъшни каскадни реакции с фатални увреждания на клетките вследствие на това. Ранното отваряне на MPTP също активира каскадата на митохондриалната апоптоза, която е още един механизъм за ускорена клетъчна смърт след исхемия и реперфузия [90].

2.5 Триметазидин

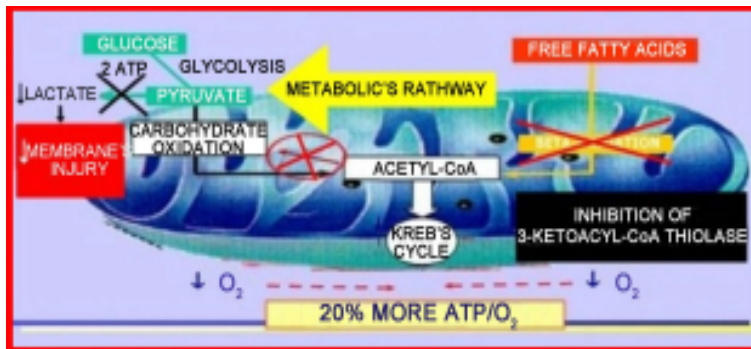
Триметазидин, [1- (2,3,4-триметокси бензил) пиперазин дихидрохлорид] (TMZ) (Фигура 3), е метаболитно антиишемично лекарство, което проявява своите благоприятни ефекти без да променя коронарния кръвоток и контрактилитета на сърцето [91]. Механизмът на действие на триметазидина е свързан с оптимизиране на сърдечния метаболизъм чрез намаляване на окисляването на мастни киселини чрез селективно инхибиране на митохондриалната 3-кетоацил СоА тиолаза, която е от решаващо значение за пътя на бета-окислението. Като резултат, TMZ намалява ишемичния стрес и подобрява работата на сърцето по време на исхемия [92]. Това инхибиране намалява използването на свободни мастни киселини като източник на енергия за миокарда, което води до увеличаване на глюкозната оксидация (Фигура 4). Метаболитното превключване съдейства за подобряване на метаболизма чрез преминаване към производството на АТФ от липидно към глюкозно окисление, като по този начин се подобрява интрамитохондриалното свързване и се минава към по-ефективен режим на АТФ производство на мол кислород [91] [92]. На клетъчно ниво TMZ запазва производството на АТФ и намалява вътреклетъчната ацидоза и претоварването с калций и по този начин поддържа клетъчната хомеостаза [92].

TMZ намалява оксидативното увреждане на митохондриите и предпазва миокарда от IR-индуцирано увреждане на митохондриалния обмен [93]. TMZ също показва цитопротективен ефект при няколко модели на миокарден инфаркт [94] [95] и протектира пост-ишемичния миокард чрез инхибиране на активирането на неутрофили [96].

Фигура 5: Химична структура на триметазидин дихидрохлорид



Фигура 6: Механизъм на действие на TMZ



2.6 TMZ и Коронарна хирургия

Все още има само няколко проучвания, които предполагат ролята на TMZ при пациенти подложени на коронарна хирургия (CABG) през последните 15 години. Въпреки това, позовавайки се на проучванията за реперфузионните протективни ефекти на TMZ при пациенти претърпели перкутанна транслуминална коронарна ангиопластика (PTCA) и анти-исхемичната му роля по време на стабилна стенокардия, потвърдена в гайдлайните, прилагането на TMZ при пациенти, подложени на хирургична реваскуларизация, изглежда напълно обосновано [97].

Групата пациенти, лекувани с PTCA след агресивна медикаментозна терапия и TMZ, показва по-малки ST елевации и значително по-ниска средна и максимална ($P < 0,05$) амплитуда на промяна на T вълната. Приложението на триметазидин, приложен преди ангиопластиката се поддържа от няколко рандомизирани проучвания показали добра миокардна протекция [98].

В първото рандомизирано, двойно-сляпо, плацебо-контролирано проучване, разработено през 1992 г., Fabiani et al. [99] оценява ролята на TMZ в превенцията на неблагоприятните ефекти от исхемично-реперфузионно увреждане при пациенти, подложени на сърдечна хирургия. Деветнадесет пациенти (10 в групата на TMZ и девет в контролната група), които са претърпели CABG, са включени в проучването. TMZ е приложен 20 mg, три пъти дневно през устата в продължение на три седмици преди операцията и също е добавен към кардиоплегичните разтвори [99]. Биохимичните изследвания показват, че увеличаването на малондиалдехида в коронарния синус 20 минути след реперфузия е значително редуцирано в групата на триметазидина ($p = 0,014$). Наличие на миозин се наблюдава по-късно в групата на TMZ в сравнение с плацебо групата ($p = 0,036$). Получените резултати показват, че пациентите които са били предварително лекувани с TMZ имат по-добра камерна функция, оценена от индекса на левокамерно съкращение(LVSWI), който е значително по-високо в групата на TMZ, отколкото в плацебо групата ($p = 0,01$). Подобни резултати са получени в експерименталното проучване от Aussedat et al. (1993) [100] и по-късно с Vanani et al. (2000) [101], които потвърждават ролята му като адитив към кардиоплегичния разтвор, редуцирайки ефектите от исхемично-реперфузионно увреждане [100] [101].

Второто рандомизирано, двойно-сляпо, плацебо-контролирано проучване от Vendrinne et al. (1996) [102], показва резултати, които определено дават по-малка ефективност на предоперативната терапия с TMZ върху CABG пациенти. Авторите оценяват кардиопротективните ефекти на TMZ върху функцията на лявата камера след операция. Включени са 40 пациенти, подложени на планова CABG, получаващи TMZ или плацебо (PCB). Серийните измервания на промяна на фракцията на изтласкване (EF), процент на систоличното удебеляване на стената (SWT)

и нивата на малондиалдеhid (MDA) са извършени при всички пациенти. Няма съществени разлики по отношение на броя на реваскуларизираните съдове, продължителността на аортния клампаж или времето за кардиопулмонален байпас.

Авторите не показват разлики в EF между двете групи. SWT е по-ниска в групата TMZ. MDA се увеличава с 24% в плацебо групата и с 25% в групата на TMZ. Нивата на лактат са по-ниски в групата на TMZ ($p < 0,05$). Авторите заключават, че при пациенти с добра предоперативна фракция на изтласкване, TMZ не демонстрира клинично значими кардиопротективни ефекти върху работата на лявата камера и липидното перокисляване в сравнение с плацебо [102]. Това проучване обаче има много ограничения, така че резултатите трябва да бъдат потвърдени в бъдещи проучвания, както е посочено в коментарите след публикуването.

Три години по-късно Turner et al. (1999) [104] наблюдава кардиопротективната роля на TMZ. Авторите оценяват потенциалната миокардна защита на TMZ чрез измерване на тропонин t (TnT) по време на CABG. Тридесет рандомизирани пациенти са включени в това двойно-сляпо проучване. Групата TMZ се състои от 15 души с клас III или IV по NYHA. Предварителна обработка започва три седмици преди CABG с TMZ (60 mg перорално на ден) или плацебо. Предоперативната серумна концентрация на нивата на TnT е от 0 до 0,39 ng/mL при всички пациенти. Средните нива на TnT са измерени пет минути след приключване на кардиопулмонален байпас и на 12, 24 и 48 часа след операцията в плацебо и TMZ групата. Резултатите показват, че в групата на TMZ нивата на TnT са значително по-ниски от тези в плацебо групата по всяко време ($p = 0,001$). Авторите стигат до заключението, че предварителната обработка с TMZ значително намалява исхемично-реперфузионната увреда по време на CABG [104].

Kuralay et al. (1999) [105] оценява ефекта на триметазидин и дилтиазем при персистираща исхемия на миокарда след CABG операция в проспективно рандомизирано проучване. Шестдесет пациенти са разделени на три групи от по 20 души и са проследявани в продължение на 12 месеца. Пациентите и в трите групи са получили ацетилсалицилова киселина 100 mg на ден, тези в първа група са приемали триметазидин 60 mg на ден, а тези от втора група са имали 90 mg дилтиазем на ден. Всеки пациент е подложен на коронарна ангиография през първите три седмици след операцията, 24 часово амбулаторно наблюдение всеки месец и сърдечна сцинтиграфия на три седмици, шест месеца и 12 месеца. Негативните ефекти на реперфузия са отзвучали в триметазидиновата група до шестия месец. Това се наблюдава на 12 месец в групата на дилтиазема, но не и в групата, приемаща само ацетилсалицилова киселина ($p < 0,05$). Въз основа на тези резултати изглежда, че триметазидинът е по-добър от дилтиазем по отношение на отстраняване на негативните ефекти на миокардна перфузия на шестия месец след коронарната операция [105].

Ruzylo et al. (2004) показва чрез ретроспективен анализ на подгрупа от 94 пациенти от проучването TRIMPOL II, че триметазидин осигурява антиангинозна ефикасност при реваскуларизирани пациенти с рецидивираща стенокардия въпреки монотерапията с метопролол [106]. Vanach et al. (2005) [107] оценяват ефекта на TMZ върху хемодинамичните параметри на сърцето и следоперативната прогноза. Сто и четиридесет пациенти са включени в проучването, разделени в две групи (плацебо и TMZ), получаващи лекарство/плацебо в доза от 20 mg три пъти дневно. Терапията се провежда най-малко два месеца преди и след сърдечна хирургия. Следните параметри са оценени по време на проучването: средно време на аортен клампаж, следоперативни нива на MB изоензима на креатин киназата (СК-MB), ранна следоперативна фракция на

изтласкване (EF), поява на постоперативни аритмии, средно време на престой в интензивно отделение (ICU) и продължителност на хоспитализация. Авторите не са забелязали значителни разлики в броя на постоперативните аритмии, но предсърдното мъждене е по-рядко в TMZ група в сравнение с плацебо групата ($p = 0,05$). Предоперативната фракция на изтласкване е сходна и в двете групи; обаче в следоперативния период е установено значително повишаване на EF в групата на TMZ ($p = 0,05$). Не са наблюдавани разлики в ранната смъртност и в двете групи. Авторите заключават, че прилагането на TMZ преди и след сърдечна операция може да повлияе на следоперативните хемодинамични параметри [107].

Iskensen et al. (2006) [108] изследва ефекта от предоперативната употреба на TMZ върху намаляването на оксидативния стрес по време на CABG. В проучването са включени 24 пациенти, разделени в две групи (контролна и TMZ). Контролната група не е получавала никакви лекарства, а групата TMZ е получавала медикамента две седмици преди CABG (60 mg на ден). Серийни кръвни проби са събрани преди и след CABG за измерване на серумните концентрации на основните ендогенни антиоксидантни ензимни системи. Хемодинамичните параметри са измерени преди операцията, непосредствено след СРВ, на 1-вия и 16-ия час след СРВ, използвайки термодилуционния метод, радиално артериално и централно венозно налягане. Серийни проби от венозна кръв са събрани две седмици преди операцията, непосредствено преди операцията, на 1-вата и 15-та минута след деклампажа. Серумна супероксиддисмутаза (SOD), ендогенни антиоксидантни ензимни системи на глутатион пероксидаза (GPx) и краен продукт на липидната пероксидация, малондиал-дехид (MDA), са измерени като маркери на оксидативен стрес. Авторите показват, че следоперативните нива на антиоксидантни ензими са сигнификантно различни между групите ($p = 0,05$), по-високи в групата на TMZ, но нивата на MDA са значително по-високи в контролната група.

Няма значителни разлики в хемодинамичните параметри между двете групи. Авторите заключават, че предварителната терапия с TMZ запазва ендегенния антиоксидантен капацитет по време на CABG [108].

Martins et al. (2008) [103] оценява ефекта на TMZ върху исхемичното-реперфузионно увреждане. Целта на проучването е да се определи дали триметазидина може да намали реперфузионното увреждане при CABG-операции, използвайки серийни измервания на нивата на тропонин Т и СРК-МВ в кръвта и последващите промени на левокамерната (LV) съкратителна функция, измерена ехографски, както и честотата на камерните фибрилации в края на байпаса. Авторите провеждат двойно-сляпо, плацебо-контролирано рандомизирано проучване върху 60 пациенти, претърпели CABG. TMZ и плацебо групата са съставени от по 30 пациенти всеки, стратифицирани чрез ехокардиография, за да включват само пациенти с нормална и/или лека LV дисфункция и получаващи лекарства/плацебо в доза от 20 mg три пъти дневно, започвайки от 12 до 15 дни преди операцията и от пет до осем дни след нея. Измерват се тропонин Т и СРК-МВ предоперативно без лекарства, след 12 до 15 дни прием на лекарства/плацебо, пет минути след отстраняване на аортната клампа и на следващите 12, 24 и 48 часа. Ехокардиографските измервания са извършени: предоперативно без лекарства, в деня на операцията с използване на 10 дни медикаменти/плацебо и след напускане на интензивното отделение с най-малко 15 дни лечение/плацебо. Камерната фибрилация се проверява чрез директно трансторакално наблюдение в края на байпаса. Резултатите от TnT и СРК-МВ достигат сигнификантно значими разлики ($p = 0,0001$) в третираната група в сравнение с контролната в четирите периода на анализ: на петата минута, 12 час, 24 час и 48 час. Ехокардиографските изследвания не показват еволюционни промени в групите, които се разглеждат и сравняват помежду си. Честотата на вентрикуларното

мъждене в края на байпаса е ниска и в двете групи. Авторите заключават, че предварителното лечение с триметазидин намалява исхемично-реперфузионното увреждане по време на CABG, но не показва ефект върху левокамерната функция [103].

Lopatin and Dronova (2009) [109] добавят най-голям брой пациенти за последните 10 години на изследване, както и по-дългия период на проследяване и използване на ново представяне на триметазидин (35 mg/MR на таблетка), оценяващи както клиничните така и фармакоикономическите ефекти от продължителната употреба на триметазидин MR при 306 пациенти, подложени на байпас хирургия. Шест часа след CABG серумна креатин-киназа и креатин-киназа MB са били значително по-ниски в групата, използваща триметазидин в продължение на две седмици преди операция. Процентът на исхемични събития също е по-нисък при тези пациенти и продължителната употреба на триметазидин подобрява систоличната функция на лявата камера и повишава физическия капацитет [109].

В рандомизирано двойно-сляпо проспективно проучване, контролирано с плацебо, са били анализирани ефектите на триметазидин (TMZ) върху възпалителния отговор, с помощта на изследване промяната в нивата на левкоцити, неутрофили и моноцити, а също и в интерлевкини 6 и 8, TNF- α , комплементи C3 и C5 и нивата на C-реактивен протеин (HS-CRP) преди и след операцията. В това проучване 30 пациенти са избрани на случаен принцип, с не повече от лека вентрикуларна дисфункция и разделена на две групи (TMZ и плацебо), стратифицирани според ехокардиографската находка и дали получават лекарство 60 mg/ден или плацебо. Измервания са направени един ден преди операцията без медикация, в деня на операцията при 12 до 15 дни прием на лекарство/плацебо, в рамките на пет минути след аортния деклампаж и в рамките на 12, 24 и 48 часа след операцията.

Проучването показва, че нивата на левкоцитите и неутрофилите са значително намалени в третираната група в сравнение с контролната група ($p = 0,012$; $p = 0,005$).

Няма значителни разлики в нивата на интерлевкин 8, TNF- α , C3 и C5, и HS-CRP между тези групи са наблюдавани. Въпреки това, нивата на интерлевкинът 6 са били значително по-ниски в третираната група в сравнение с тези в контролна група по всяко време на изследването[110] [111].

И накрая, Hei L et al. (2015), публикува систематичен преглед и метаанализ на рандомизирани контролирани проучвания (RCT) за изследване на ефективността на миокардната протекция при предоперативна терапия с триметазидин при пациенти с САВГ, чрез оценка на следоперативните нива на няколко от биохимичните маркери на миокардно увреждане, включително креатин киназа (СК), креатин киназа МВ(СК-МВ), креатин фосфокиназа (СРК), тропонин Т (TrT) и тропонин I (TrI). Шест RCT са включени най-накрая в мета-анализа и резултатите показват значително по-ниски следоперативни нива на СК, СК-МВ, TrT и TrI в групите, лекувани с триметазидин. В заключение се казва, че предоперативната терапия с триметазидин има положителен ефект върху протекцията на миокарда при пациенти с САВГ[112].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все още има само няколко проучвания, които предполагат ролята на TMZ при пациенти подложени на САВГ. Можем обаче да приемем, че мета-анализите доказват действието на лекарство, като протектор на сърдечната клетка с подобряване на симптомите на нестабилна стенокардия поради антиисхемичния му ефект [113] [114] [115]; Освен това клинично проучвания с пациенти, които са развили сърдечна

недостатъчност и са били лекувани с TMZ демонстрират очевидно подобрене във функцията на лявата камера, с последващо повишаване на физическия капацитет. С добре известен механизъм на активност, приложението на TMZ при пациенти, подложени на хирургична реваскуларизация може да бъде напълно оправдан. Освен това систематичен преглед и мета-анализ на рандомизирани контролирани проучвания потвърждават тази теза и от предишни изследвания.

III. Цел и задачи

1. Цел

Да се изследва ефективността на постоперативното приложение на триметазидин върху намаляването на оксидативния стрес и постоперативната увреда по време на периода исхемия-реперфузия

2. Задачи

1. Определяне на изходните характеристики на изследваната популация и дефиниране на групи;
2. Анализ на интраоперативните данни и постоперативните резултати и сравнение между групите;
3. Шестмесечно проследяване на пациентите и проследяване на определените параметри: ФИ, нива на МВ-СК, TrT, MDA
4. Оценяване на ефикасността на следоперативната терапия с триметазидин върху оксидативния стрес и функционалния капацитет на миокарда.
5. Преценка на реалните ползи от следоперативното приложение на триметазидин.

IV. Материали и методи

1. Вид на проучването

Проучването е проспективно, сляпо, рандомизирано, контролирано проучване.

2. Обект на наблюдение

За целта на проучването обект на наблюдение бяха 93-ма пациенти, претърпели планова изолирана коронарна хирургия в отделението по Кардиохирургия към УМБАЛ “Св. Георги” – Пловдив между месеците март 2018 г. и октомври 2018 г. Включването на пациентите е проспективно чрез извършване на предварително заложен критерии за включване и изключване. Доброволното участие на всички изследвани лица е декларирано с писмено информирано съгласие.

При всички пациенти е извършена кардиохирургична операция в условията на ЕКК с клампаж на аортата и кардиоплегичен арест.

От общия брой пациенти двама развиха остра бъбречна недостатъчност, налагаща продължителна вено-венозна хемодиафилтрация (CVVHDF) и при един пациент се наложи продължителна механична вентилация (повече от 48 часа) и затова бяха изключени от това проучване.

Крайната група на проучването включва 90 пациенти, предварително разделени на 2 подгрупи: първа група (n=45), получаваща триметазидин 35 mg два пъти дневно непосредствено след екстубацията; и втора контролна група (n=45), получаваща плацебо. Останалата терапия е идентична за всички участници: ацетилсалицилова киселина (АСА) 100 mg/дневно,

розувастатин 10 mg/дневно, метопролол 50 mg/два пъти дневно, периндоприл 5 mg/дневно и гликлазид 60 mg/дневно.

Средната възраст на пациентите за изследваната група е $62,97 \pm 9,45$ години. От тях 11 или 24,4% са жени, а 34 (75,6%)- мъже, отношението мъже/жени е 3/1. Средната възраст за контролната група е $64.18 \pm 6,54$, като съотношението мъже/жени е същото.

3. Единици на наблюдение

3.1 Логически единици

За целите на проучването са изследвани 90 пациенти, претърпели планова изолирана коронарна хирургия в отделението на Кардиохирургия към УМБАЛ “Св. Георги” – Пловдив.

Необходимият брой единици на проучването, гарантиращ 95% достоверност на научната информация, беше изчислен с метод Stein.

3.2 Техническа единица – Място на проучването: УМБАЛ “Св. Георги” – ЕАД, Медицински университет – Пловдив, Отделение по кардиохирургия.

4. Период на проучването

Проучването е проведено между месеците март 2018 г. и април 2019 г. В този период са регистрирани необходимите единици за наблюдение.

5. Провеждане на проучването

При проучването е използван един от базовите социологически методи – документация. Използвани са протоколи за регистрация и

следоперативно проследяване (приложение №1), както и измерване на човешки малондиалдеhid (МДА) посредством метода на ELISA (приложение №2).

6. Проучвани параметри

Получените данни в това проспективно моноцентрично проучване са извлечени от наличната документация на отделението по Кардиохирургия между месеците март 2018 г. и април 2019 г., както и историята на заболяването на пациентите през проучвания период.

6.1 Признаци на наблюдение

Проследени са двете базови групи признаци.

Основни факториални признаци:

- **Възраст**

Към момента на постъпване в отделението по Кардиохирургия. За анализиране на показателя за възраст е използвана непрекъснатата величина.

- **Пол**

Използвана е двоична величина, кодирана като номинална променлива за нуждите на статистическия анализ: 1 – мъже, 2 – жени.

- **Систолично артериално налягане (САН) и пулс като основни витални симптоми**

Използвана е непрекъснатата величина за нуждите на статистическия анализ.

- **Лабораторни изследвания, включващи:**

Пълна кръвна картина и биохимия с измерване стойностите на глюкоза, урея, креатинин, пикочна киселина, СРК, СРК-МВ, TrT, ASAT, ALAT, MDA, билирубин, мастен профил, електролити и кръвно-газов анализ, извършени при приема и/или вечерта преди оперативната интервенция.

- **Електрокардиография**

ЕКГ е извършвана при всички пациенти. Изходно при приемането и ежедневно в ранния постоперативен вътреболничен период. Проследяване по време на контролните прегледи, както е според приетия протокол: ЕКГ записът е в 12 отвеждания, при скорост на хартията 25 mm/s и усилване 10 mm/mV.

- **Ехокардиография**

Провеждана е по протокол при всички пациенти по време на първоначалния преглед при постъпването, както и по време на престоя до изписването и при контролните прегледи по време на проследяването. Изследването е проведено трансторакално. Фракцията на изтласкване се изследваше по метода на Симпсън. В протокола за регистрация се отбелязва изходната ФИ. Пациентите с ФИ под 40% се изключват, както и тези с клапна патология, налагаща хирургична корекция. Проследените стойности се отбелязват в протокола за следоперативна проследяване.

- **Рентгенография на сърце и бял дроб**

Изследването се проведе при всички пациенти предоперативно, на първи следоперативен ден и по преценка до изписването. Търсят се възпалителни изменения на белодробния паренхим, участъци на ателектаза, кардио-торакален индекс, наличие на плеврални и перикарден изливи.

- **Сърдечна катетеризация и коронарна ангиография**

Всички пациенти в проучването имат извършена ангиография с данни за триклонова коронарна болест, показана за оперативно лечение в елективен порядък.

- **Оперативна интервенция**

Всички пациенти са оперирани в Отделението по кардиохирургия на болница „Св.Георги“- Пловдив. Използвания вид оперативен достъп е срединна надлъжна стернотомия. Всички сърдечни операции са осъществени условията на ЕКК и клампаж на аортата с кардиоплегичен арест осигурен, чрез вливане на студена кръвна кардиоплегия ретроградно в коронарния синус и антеградно в аортния корен, по протокол на отделението. Операциите са извършени при умерена хипотермия. При всички пациенти е отпрепарирана лява артерия мамария, която е използвана като артериален графт към лява предна десцендентна коронарна артерия. Останалите таргетни коронарни артерии са реваскуларизирани посредством сафено-венозни графтове.

6.2 Основни резултативни признаци:

Пациентите са проследявани до 6-тия месец. Резултатите са отчитани на 1-ви и 12-ти час след операцията, при изписването, на 1-вия и 6-ия месец след операцията.

Всички пациенти са приемали идентична медикаментозна терапия следоперативно, с изключение на TMZ.

Проследяването е проведено както следва:

- на 1-вия час след операцията:

- фракция на изтласкване

- на 12-ия час след операцията:

- серумни нива на СК-МВ
- серумни нива на TrT
- серумни нива на MDA

- при изписването:
 - фракция на изтласкване

- на 1-вия месец след операцията:
 - серумни нива на MDA

- на 6-ия месец след операцията:
 - фракция на изтласкване
 - серумни нива на СК-МВ
 - серумни нива на TrT
 - серумни нива на MDA

Сравнението на резултатите на пациентите от главните групи е извършено съобразно с избраните статистически методи според вида на характеристиката (количествена или качествена) и нейното разпределение.

Формирани са подгрупи на базата на граници на интерес на определени показатели, като в главните групи са извършени подселекции. Направено е сравнение на изходните характеристики, с цел да се докаже сравнимост между извадките.

7. Източници на информация

- История на заболяването на пациентите

- Протокол за регистрация, включващ: предоперативни данни (ФИ, СРК-МВ, ТгТ, МДА, захарен диабет и АХ), оперативна интервенция (ЕКК, клампаж, брой байпаси, венозни графтове).
- Протокол за следоперативно проследяване включващ: общ престой в реанимация (в часове), общ болничен престой (дни), обща кръвозагуба(в ml).

ФИ на 1-вия час, при дехоспитализация, на 6-ти месец.

Серумни нива на СК-МВ: на 12-ти час, на 6-ти месец.

Серумни нива на ТгТ: на 12-ти час, на 6-ти месец.

Серумни нива на МДА: на 12-ти час, на 1-ви месец, на 6-ти месец.

Измерването на човешки малондиалдехид е посредством метода на ELISA.

8. Методи на изследване

8.1 Клинични методи

8.1.1 Анамнеза и физикален статус

Анамнестичните данни са събирани по изготвен специално за проучването протокол за регистрация и следоперативно проследяване, включващ данни за възраст при постъпването, пол, предоперативни данни, оперативна интервенция и следоперативно проследяване (приложение 1).

С анамнезата се установяват основните симптоми на ИБС, тежестта и характера им, като се установява и функционалния клас по NYHA на всеки пациент, наличие на фамилност, вредни навици и придружаващи заболявания. Търсят се анамнестични данни и от придружаваща медицинска документация за наличие на изключващи критерии.

Пълно физикално изследване е проведено по общоприетите правила за изследване на сърдечно болен и е извършено при всички пациенти, включени в изследването. Установяват се степен на яснота на съзнанието, хабитус, заемано положение в леглото, цвят на кожа и видими лигавици, шиен венозен застои и периферни лимфни възли.

Изследването на белия дроб включва: перкусия и аускултация, вида на дишането, продължителност на инспириума и ексспириума, наличие на хрипова находка.

Статусът на сърцето отчита: ритъм, фреквенция, аускултаторно оценяване на сърдечните тонове, наличието на патологични тонове и шумове и техните характеристики, перикардно триене.

Коремният статус отчита разположение спрямо гръдния кош, болезненост при палпация, симптоми на перитонеално дразнене, аускултаторна характеристика на перисталтиката, размери на черния дроб, определени с палпация и перкусия. Извършено е сукусио реналис.

Крайниците са оглеждани за цвят и температура на кожата, спонтанна палпаторна и свързана с движението болезненост, напълненост на вените, наличието на отоци, тяхното разположение и симетричност, палпиран е периферния пулс на достъпните места за четирите крайника – наличие или липса, ритмичност, напълненост, симетричност. Измерено е периферното артериално налягане.

8.1.2 Клинично-лабораторни методи

Всички пациенти са изследвани по протокол на отделението по Кардиохирургия към УМБАЛ “Св. Георги” – Пловдив, който включва: пълна кръвна картина и биохимия с изследване стойностите на глюкоза, урея, креатинин, пикочна киселина, СРК, СРК-МВ, ТгТ, АСАТ, АЛАТ,

билирубин, мастен профил, електролити и кръвно-газов анализ, извършени при приема и вечерта преди оперативната интервенция.

Пациентите, показали отклонения в бъбречната функция или с данни за ХОББ, са изключени от групите. Изследването на стойностите на MDA е извършено 12 часа преди операцията.

8.1.3 Инструментални методи

Инструменталните изследвания включват: електрокардиография, ехокардиография, рентгенография на сърце и бял дроб, както и сърдечна катетеризация и коронарна ангиография.

Диагностиката и селекцията на пациентите е извършена според зададените критерии за включване и изключване в индивидуален за всеки болен, специално създаден за нуждите на това проучване “Протокол за регистриране и проследяване”. Всички стъпки и регистрирането на резултатите са отразени в тях. Освен това е използвана и системата за измерване на човешки малондиалдеhid (MDA) посредством метода на ELISA.

9. Статистически методи

Събраната статистическа информация е обработена в катедрата по Медицинска информатика, биостатистика и електронно обучение към Факултета по Обществено здраве при Медицински университет – Пловдив.

Регистрираните в индивидуалните протоколи данни са въведени в таблици Microsoft Excel 2010 и IBM SPSS Statistics v. 17.

Изхождайки от основната цел и задачи на проучването, както и от обема, вида и разпределението на данните при провеждане на изследването, бяха използвани следните статистически методи:

1. Описателни статистически методи:

- Количествените метрирани показатели се представени с основните измерители на централната тенденция, статистическото разсейване и интервала на доверителност (mean \pm SD, Se, 95% CI);
- Качествените, неметрирани величини са представени чрез абсолютни честоти, относителните дялове и стандартната грешка (бр., %, Sp)

2. Параметрични и непараметрични методи

При тестването на хипотезите за несъществено (случайно) влияние на даден фактор са използвани екзактният тест на Фишер (Fisher's exact test) при четирикратни таблици и критерият χ^2 при многократни таблици.

- Изследването за нормалност на разпределението на изследваните показатели беше извършено с теста на Колмогоров-Смирнов.
- За тестване на хипотези за наличие на статистически значимо различие между две независими извадки с изследвани количествени, нормално разпределени показатели, е използван t-тест на Student, при съпоставка на количествени величини при независими извадки с разпределение различно от нормалното – тест на Mann-Whitney.
- За тестване на хипотези за наличие на статистически значимо различие между две зависими извадки с изследване на количествени, нормално разпределени показатели е използван independent-samples t-тест на Student. При съпоставка на количествени величини при

независими извадки с разпределение различно от нормалното – Mann-Whitney U-тест.

- За съпоставка на количествено измерими нормално разпределени показатели при повече от 2 групи – дисперсионен анализ (one-way ANOVA). При съпоставяне на повече от 2 независими извадки с разпределението на данните различно от нормалното – тест на Kruskal-Wallis.
- Взаимовръзката между изследваните показатели беше анализирана с помощта на корелационен анализ. При нормално разпределени величини е представен коефициент на Pearson. При величини с различно от нормалното разпределение е представен коефициент на корелация на Spearman.

За ниво на значимост на нулевата хипотеза е прието $p < 0.05$. Статистическата обработка на данните е извършена с помощта на програмния продукт SPSS Statistics v. 17.

3. Графични методи – за нагледно графично представяне на резултатите е използван Microsoft Excel 2010.

V. Резултати

По време на сърдечна хирургия с кардиопулмонален байпас и аортен клампаж, серия от биохимични и имунологични промени водят до повишаване на оксидативния стрес на кардиомиоцита. При не физиологичните условия на екстракорпоралното кръвообращение се получава повишаване в нивата на свободните радикали и реактивните кислородни форми, водещи до увреждане на клетките.

Допълнително реперфузията на предходно исхемизираният по време на аортния клампаж миокард, също води до значителна негова увреда. Този исхемично-реперфузионен стрес е причина за задълбочаване и разширяване на миокардното увреждане.

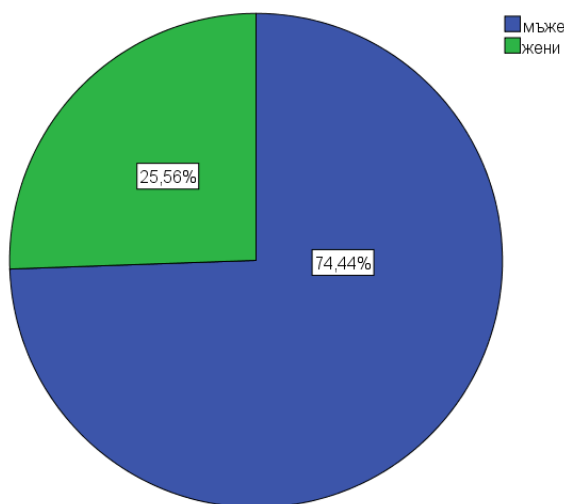
Предполага се, че редуцирането на оксидативния стрес ще рефлектира върху биохимичните и виталните показатели на миокарда, т.е. би трябвало да отчетем намаляване в нивата на СРК-МВ и ТгТ и увеличаване на ФИ. Данните от предходни проучвания не са еднозначни. Една част от тях показват увеличаване във ФИ [107][109] докато други не регистрират такова [102][108], повечето дават данни за спадане в нивата на сърдечните ензими [103][109][112].

Едната цел на проучването е да разберем, можем ли да повлияем на оксидативния стрес, чрез прилагане на медикамент, който е лесно приложим, широко достъпен, финансово необременяващ и с минимален риск за странични ефекти. Другата ни цел е, чрез проследяване на функционални показатели и биомаркери да видим до колко намаляването на оксидативния стрес, ако има такова, води до намаляване на миокардната увреда и оттам за практичното приложение - оправдано ли е включването на триметазидин към протокола за терапия на пациенти след байпас хирургия.

За целта е подбрана кохорта от пациенти с максимално близки изходни характеристики, подложени на една и съща хирургическа процедура. Пациентите са разделени на две групи по 45 души - третирана и контролна група от общо 90 пациента. От изследваните 90 пациента 67 (74.44%) са мъже, а 23 (25.56%) са жени.

Освен демографските данни, в съображение влизат и фактори свързани с оперативната интервенция, които могат да доведат до разлики в нивата на оксидативния стрес в двете групи преди началото на третирането с триметазидин. За целта регистрираме продължителността на екстракорпоралното кръвообращение, аортния клампаж и количеството на общата кръвозагуба в двете групи и ги сравняваме. Избраните показатели са добре проследими и обективно документирани.

Съотношението между двата пола е 3:1 в полза на мъжете, което е обяснимо предвид по-честото засягане на мъжкия пол от атеросклеротичната болест.



Диаграма 1: Разпределение на изследваните пациенти по пол.

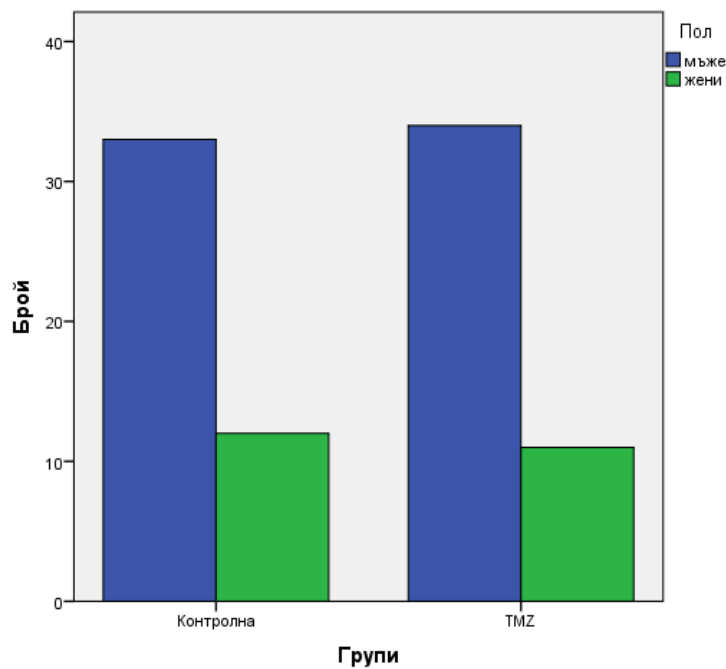
Разпределението по пол в двете групи е както следва 33 към 12 за контролна група и 34 към 11 за групата третирана с триметазидин. Не се установи статистически значима разлика в разпределението по пол между контролната група и групата с TMZ (таблица 1).

Таблица 1. Двумерно разпределение по пол и изследвани групи.

		Групи			Общо
		Контрол на	TMZ		
Пол	мъже	Брой	33	34	67
		% в пол	49,3%	50,7%	100,0%
		% в група	73,3%	75,6%	74,4%
	жени	Брой	12	11	23
		% в пол	52,2%	47,8%	100,0%
		% в група	26,7%	24,4%	25,6%
Общо		Брой	45	45	90
		% в пол	50,0%	50,0%	100,0%
		% в група	100,0%	100,0%	100,0%
		Fisher's exact test, P=1.000			

49,3% от мъжете са в контролната група, докато в третираната са 50,7% от тях. Съответно от жените процентното разпределение в двете групи е 52,2% за контролната към 47,8% за третираната.

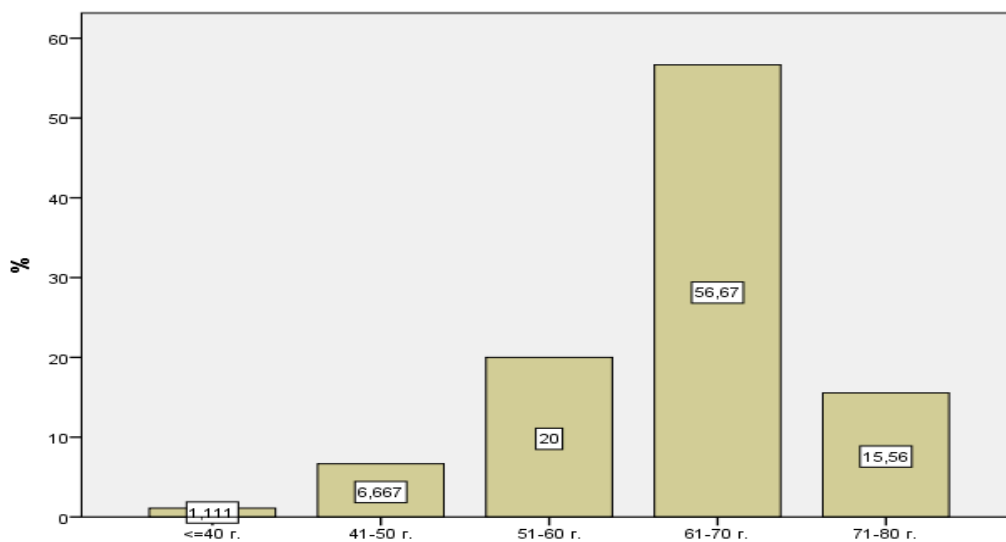
Съотношението между двата пола и в двете изследвани групи се запазва 3:1 (диаграма 2).



Диаграма 2: Честотно разпределение по пол и групи

Разпределение по възраст

Анализът на разпределението по възраст показва, че най-силно е засегната възрастовата група 61-70 години. Повече от половината пациенти са в тази група.



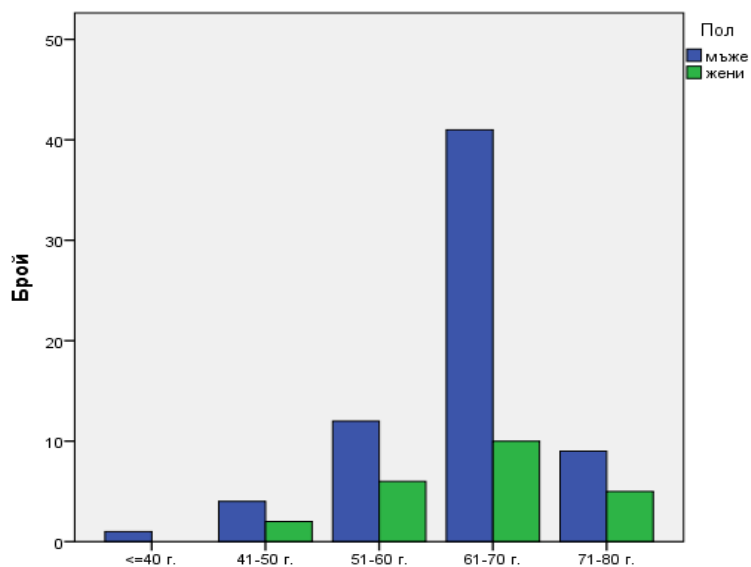
Диаграма 3: Разпределение на изследваните пациенти по възрастови групи.

При изследване на двумерното разпределение по пол и възрастови групи, не се установи статистически значима разлика (таблица 2)

Таблица 2. Двумерно разпределение на изследваните пациенти по пол и възрастови групи.

			Пол		Общо
			мъже	жени	
Възрастови гр.	<=40 г.	Брой	1	0	1
		% във възрастови гр.	100,0%	,0%	100,0%
		% в пол	1,5%	,0%	1,1%
	41-50 г.	Брой	4	2	6
		% във възрастови гр.	66,7%	33,3%	100,0%
		% в пол	6,0%	8,7%	6,7%
	51-60 г.	Брой	12	6	18
		% във възрастови гр.	66,7%	33,3%	100,0%
		% в пол	17,9%	26,1%	20,0%
	61-70 г.	Брой	41	10	51
		% във възрастови гр.	80,4%	19,6%	100,0%
		% в пол	61,2%	43,5%	56,7%
71-80 г.	Брой	9	5	14	
	% във възрастови гр.	64,3%	35,7%	100,0%	
	% в пол	13,4%	21,7%	15,6%	
Общо		Брой	67	23	90
		% във възрастови гр.	74,4%	25,6%	100,0%
		% в пол	100,0%	100,0%	100,0%
			X ² = 2.81,df=4, P=0.589		

И при двата пола най-засегната е групата 61-70 години.



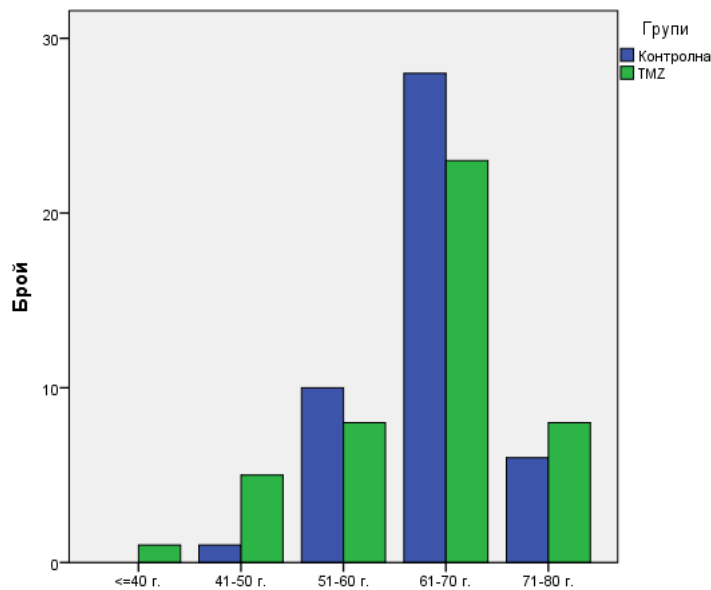
Диаграма 4: Разпределение на изследваните пациенти по пол и възрастови групи

При съпоставка на средната възраст на пациентите в контролната и групата с триметазидина, не се установи статистически значима разлика

Таблица 3. Съпоставка на средната възраст между двете изследвани групи.

	Групи	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t	P
Възраст	Котролна	45	64,1778	6,54109	,97509	0.70	0.486
	TMZ	45	62,9778	9,44960	1,40866		

Този резултат се потвърди и от изследването на двумерното честотно разпределение по възрастови групи и групи изследвани пациенти (диаграма 5).



Диаграма 5: Честотно разпределение на изследваните пациенти по възрастови групи за контролната и TMZ група.

Разпределението на пациентите по възрастови групи в контролната и третираната група не показва сигнификантни разлики. И в двете групи най-много са пациентите във възрастовата група 61-70 години.

Изследвахме следните показатели, влияещи на оксидативния стрес, свързани с хирургичната интервенция.

- продължителност на аортния клампаж (в минути)
- продължителност на ЕКК (екстракорпорално кръвообращение) в минути
- обща кръвозагуба (в милилитри)

Не се установи статистически значимо различие между контролната и TMZ групата и за трите изследвани показатели (таблица 4)

Таблица 4. Съпоставка на клампажно време (продължителност на аортния клампаж), продължителност на ЕКК и обща кръвозагуба между контролната група и TMZ групата.

	Групи	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error Mean	t	P
Клампажно време (мин.)	Контролна	45	28,22	2,78	0,41	1.43	0.156
	TMZ	45	27,42	2,50	0,37		
Продължителност на ЕКК (мин.)	Контролна	45	43,53	3,89	0,58	0.231	0.818
	TMZ	45	43,71	3,37	0,50		
Обща кръвозагуба (ml)	Контролна	45	276,00	66,24	9,87	1.51	0.135
	TMZ	45	255,77	60,69	9,04		

Така направените изследвания показват, че двете групи са с еднакви изходни характеристики, т.е. сравними са и могат да бъдат изследвани за наличие на ефект или липсата на такъв при приложение на триметазидин.

Формиране на подгрупи по възраст

За граница на интерес, се определи стойността 68 год. Според определение прието от СЗО през 2012 г. от статия публикувана в International Journal of Epidemiology, за възрастни се приемат хората над 68 год. [116]

Проследявани показатели

Изследваните показатели се разделят на лабораторни биомаркери - нива на малондиалдехид (MDA), изоензим МВ на креатинфосфокиназа

(СРК-МВ) и тропонин-Т и функционални - ехографски измерена фракция на изтласкване на лява камера (ФИ)

3. Анализ на лабораторни показатели

Лабораторни маркери СРК-МВ и TrT

И двата лабораторни маркера са рутинно използвани и лесно проследими при пациентите в кардиохирургия. Проследяването им в двете групи пациенти оценя от една страна увредата на миокарда при конкретната хирургична процедура и корелацията или липсата на такава с регистрирания количествено оксидативен стрес, чрез изследване нивата на малондиалдехида.

И двата биомаркера се повишават при исхемия и некроза на кардиомиоцита, като **TrT** е по-специфичен и се повишава по-рано в сравнение с **СРК-МВ**, за сметка на това **СРК-МВ** - нивата спадат по-късно и могат да се проследяват по-дълго във времето. **TrT** е по-показателен за исхемия и без да има значителна увреда и клетъчна смърт.

3.1. Изоензим МВ (U/l)

Креатинфосфокиназата (СРК) е ензим, експресиран от различни тъкани. Той катализира превръщането на креатина и използва аденозин трифосфат(АТФ) за синтез на фосфокреатин(ФК) и аденозин дифосфат(АТФ). Реакцията е обратима и АТФ може да се генерира от АДФ и ФК. В клетките, които бързо консумират АТФ, особено в скелетните мускули, мозъка и миокарда, ФК служи като енергиен резервоар за бързото буфериране и регенерация на АТФ, както и за вътреклетъчен транспорт чрез фосфокреатинния цикъл.

МВ изоензима на СРК се използва като специфичен индикатор на миокардно увреждане в постоперативния период в кардиохирургията. Структурата му е на димер. Подединиците на СРК-димера се разделят на М(мускулен тип) и В(мозъчен тип). ММ-димер се намира предимно в скелетната мускулатура, ВВ-димер в мозъчната тъкан и МВ-хибрид в сърдечния мускул.

С помоща на теста на Колмогоров-Смирнов анализирахме разпределението на изследвания изоензим МВ 12 часа преди операцията; 12 часа след операцията; 6-ти месец след операцията (таблица 5). Установихме различно от нормалното разпределение за изоензим МВ във всички моменти на изследване:

Таблица 5. Изследване на разпределението на изоензим МВ в различните моменти на изследвани (резултати от тест на Колмогоров- Смирнов)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

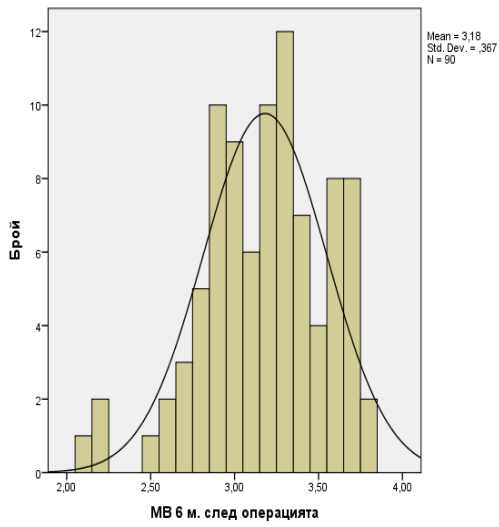
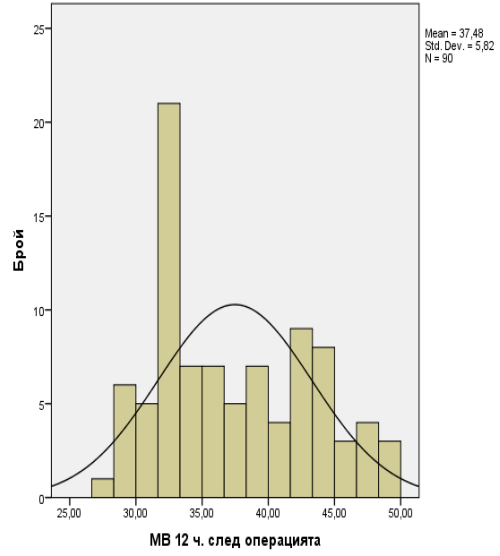
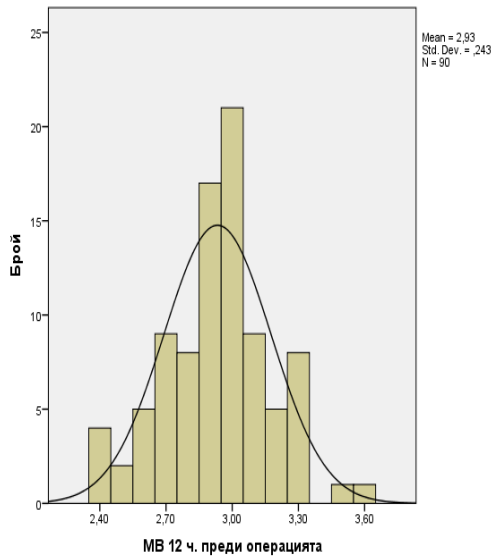
		МВ 12hr preOP	МВ 12hr postOP	МВ 6 months postOP
N		90	90	90
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,9333	37,4756	3,1811
	Std. Deviation	,24311	5,81973	,36747
	Most Extreme Absolute Differences	,134	,146	,087
	Positive	,125	,146	,057
	Negative	-,134	-,095	-,087
Test Statistic		,134	,146	,087
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000 ^c	,000 ^c	,088 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

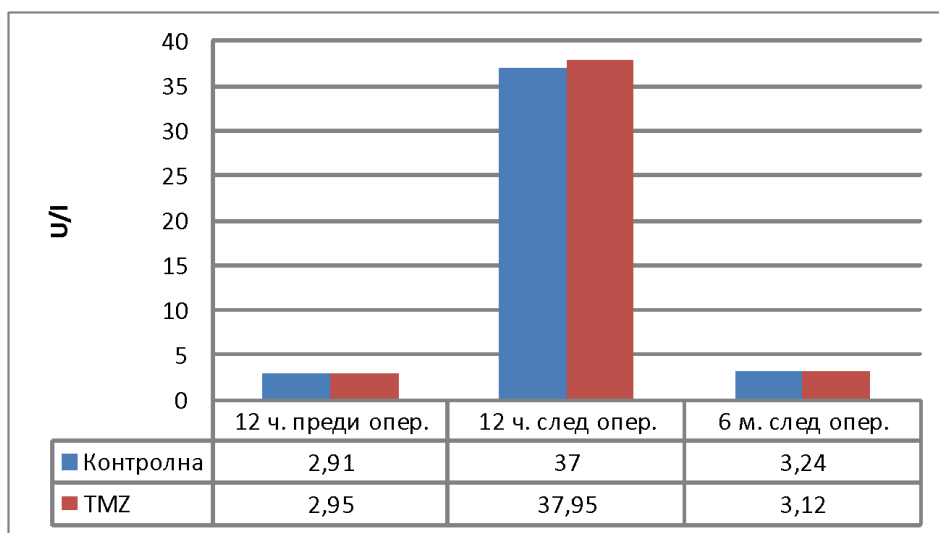
c. Lilliefors Significance Correction.

Диаграма 6: Хистограми на изоензим МВ в различните моменти на изследване



Средните стойности на изоензим МВ на двете изследвани групи в динамика са представени на диаграма 7:

Диаграма 7: Средни стойности на изоензим МВ в динамика в опитната и контролна група



Стойностите предоперативно не се различават от нормалните и са еднакви за двете групи. И в двете групи стойностите на изоензим МВ рязко се увеличават на 12-ия следоперативен час и на 6-ия месец достигат стойности близки до базовите, без сигнификантна разлика за контролна и третирана група.

При така представените резултати не отчитаме влияние на употребата на триметазидин върху стойностите на изоензим МВ във всички моменти на изследването. Можем да заключим, че метаболитните ефекти на TMZ не оказват влияние на клетъчната увреда, израз на която са повишените нива на изоензим МВ. За да сме сигурни в достоверността на това заключение, използвахме съпоставка чрез Mann-Whitney U тест и Independent samples T- test.

Съпоставихме стойностите на изоензим МВ в двете групи с помощта на Mann-Whitney U тест. Не се установи статистически значима разлика между двете групи във всички моменти на изследване (Таблица 6).

Таблица 6. Съпоставка на изоензим МВ между TMZ и контролната група (резултати от Mann-Whitney U тест).

	МВ 12 ч. преди операция	МВ 12 ч. след операцията	МВ 6 м. след операцията
Mann-Whitney U	917,500	916,500	879,500
Wilcoxon W	1952,500	1951,500	1914,500
Z	-,776	-,777	-1,078
Asymp. Sig. (2-tailed)	,438	,437	,281

Изчислихме изменението на изоензим МВ (в %) в периода 12 часа след операцията до 6 месеца след операция, като използвахме следната формула:

$$\text{Изменение МВ} = ((\text{стойност на МВ 6 м. след изписване} - \text{стойност на МВ 12 ч. след операция}) / \text{стойност на МВ 12 ч. след операция}) * 100$$

Разпределението на тази величина беше нормално и затова приложихме Independent samples T- test за съпоставка на изменението в двете групи (таблица 7)

Таблица 7. Съпоставка на изменението на изоензим МВ в контролната и TMZ групи.

	Групи	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t	P-value
Изменение изоензим МВ	Контролна	45	-91,0074	1,80266	0,26	1,727	0,08
	TMZ	45	-91,6183	1,54264	0,22		
Средна разлика	0,61				95% интервал на доверителност [-0,091; 1,31]		

Изменението на стойностите на изоензим МВ в двете групи е еднаква за всички моменти на изследването

3.2. Тропонин Т (hs-TrT)

Тропонинът е част от тънкия филамент в саркомера и е включен в калций-зависимото взаимодействие между актина и миозина. Представлява белтъчен комплекс, изграден от три субединици : тропонин С(TrC), тропонин I(TrI) и тропонин Т(TrT) - тропомиозин-свързващ белтък, който свързва тропониновия комплекс към веригата на тропомиозина. Тропонинът се намира основно в напречно-набраздената мускулна тъкан, като субениците TrI и TrT са кардиоспецифични.

Освобождаването на тропонин от миокарда може да е резултат от нормалния клетъчен цикъл като апоптоза, освобождаване от клетките на тропонин-деградационни продукти, обратимо повишаване на пропускливостта на клетъчната мембрана, оток на кардиомиоцита, водещ до формиране и освобождаване на мембранни вакуоли и миокардна некроза. Тези нормални базови нива бързо нарастват и могат да се отчетат

лабораторно при миокардното увреждане след сърдечна хирургия[124].(The Evolution and Future Direction of The Cardiac Biomarker)

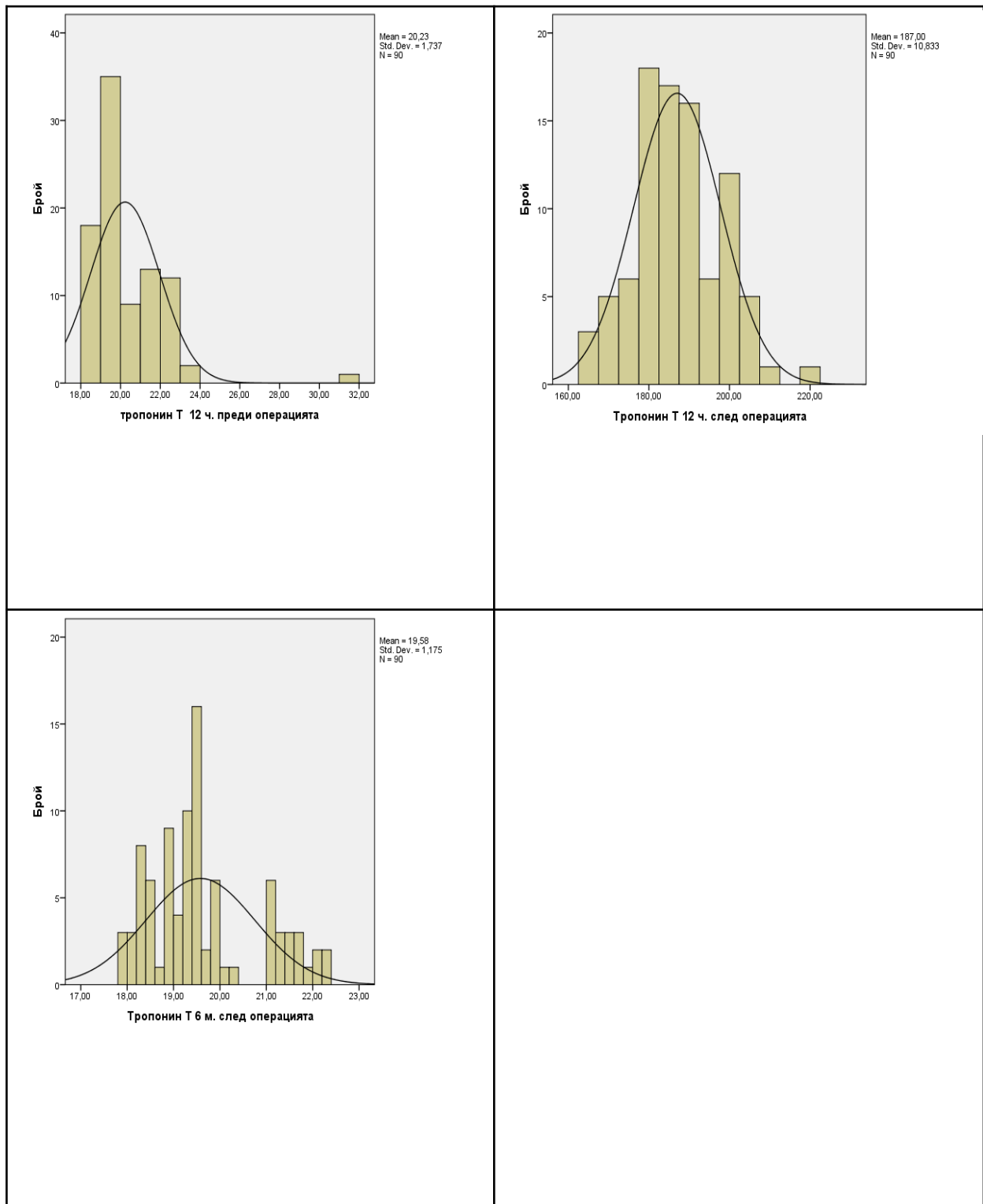
С помощта на теста на Колмогоров- Смирнов анализирахме разпределението на изследвания тропонин Т (ng/l) 12 часа преди операцията; 12 часа след операцията; 6-ти месец след операцията (таблица 8) . Установихме различно от нормалното разпределение за изследвания тропонин Т 12 часа преди операцията и 6 месеца след операцията :

Таблица 8. Изследване на разпределението на тропонин Т в различните моменти на изследвани (резултати от тест на Колмогоров- Смирнов)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test				
		hs-TrT 12hrs preOP	hs-TrT 12hrs postOP	hs-TrT 6 months postOP
N		90	90	90
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	20,2278	187,0000	19,5789
	Std. Deviation	1,73659	10,83274	1,17478
Most Extreme Differences	Absolute	,164	,080	,193
	Positive	,164	,080	,193
	Negative	-,133	-,056	-,109
Test Statistic		,164	,080	,193
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000 ^c	,200 ^{c,d}	,000 ^c

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.
- d. This is a lower bound of the true significance.

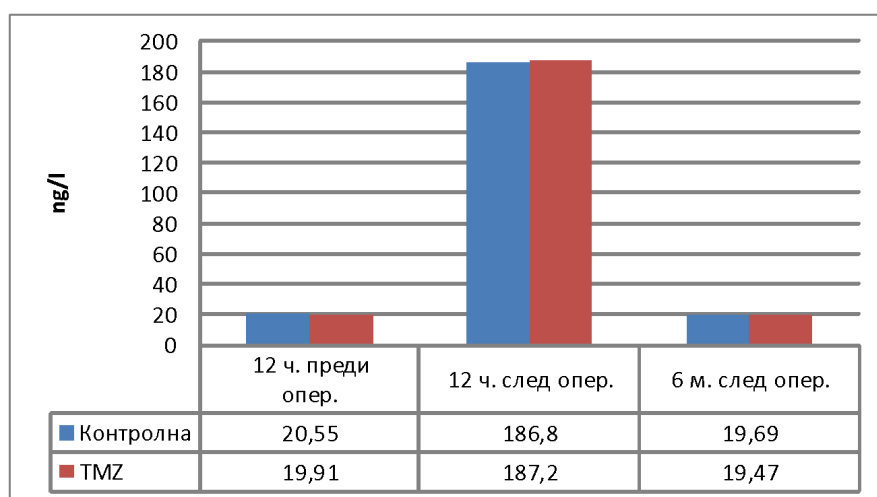
Диаграма 8: Хистограми на тропонин Т в различните моменти на изследване



Съпоставихме средните стойности във всеки един момент от изследването - на 12-ия час предоперативно, 12-ия час следоперативно и на 6-ия месец след операцията и в двете групи - контролна и третирана с триметазидин.

Средните стойности на тропонин Т в двете изследвани групи в динамика са представени на диаграма 9.

Диаграма 9: Средни стойности на тропонин Т в динамика в опитната и контролна група.



Динамиката, както и средните стойности на тропонин Т в контролната и третираната група не показват сигнификантни разлики. Достоверността на тези резултати се потвърди и от Mann-Whitney U тест за променливите с разпределение различно от нормалното, както и от съпоставката чрез Independent samples T - test.

Съпоставихме стойностите на тропонин Т в двете групи с помощта на Mann-Whitney U тест за променливите с разпределение различно от нормалното - измервания 12 ч. преди операцията и 6 месеца след операцията (таблица 9).

Таблица 9. Съпоставка на тропонин Т между TMZ и контролната група (резултати от Mann-Whitney U тест).

	Тропонин Т 12 ч. преди опер.	Тропонин т 6 м. след опер.
Mann-Whitney U	797,00	892,50
Wilcoxon W	1832,00	1927,50
Z	-1,74	-0,97
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,082	0,332

Стойностите измерени 12 часа след операцията съпоставихме с independent samples T-test (таблица 10). Не се установи статистически значима разлика между двете групи във всички моменти на изследване.

Таблица 10. Съпоставка на тропонин Т между TMZ и контролната група (Independent samples T - test).

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t	P-value
Тропонин Т 12 ч. след операцията	Контролна	45	186,80	12,52	1,86	0,174	0,862
	TMZ	45	187,20	8,97	1,33		

Изчислихме изменението на тропонин Т (в %) за периода 12 часа след операцията до 6 месеца след операцията, като използвахме следната формула: Изменение тропонин Т = ((стойност на тропонин Т 6 м. след изписване – стойност на тропонин Т 12 ч. след операция)/ стойност на тропонин Т 12 ч. след операция))*100

Съпоставка на изменението в двете групи е представено на таблица 11.

Таблица 11. Съпоставка на изменението на тропонин Т в контролната и TMZ групи.

	Групи	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t	P-value
Изменение тропонин Т	Контролна	45	-89,41	1,04	0,15	0,84	0,403
	TMZ	45	-89,57	0,82	0,12		
Средна разлика	0,17				95% интервал на доверителност [-0,23; 0,56]		

Така получените резултати показват нормална динамика на тропонин Т в серума за сърдечно оперирани с ЕКК и аортен клампаж. При базови нива близки до нормата, следва рязко покачване непосредствено след оперативната интервенция и отново спад до базовите нива на 6-ия месец и при двете групи. Приемът на триметазидин не е повлиял нивата на тропонин Т в третираната група - средните стойности във всички моменти на изследването не се различават от контролната група. Можем да направим извода, че метаболитните ефекти на TMZ не оказват влияние на клетъчната увреда, израз на която са повишените нива на тропонин Т.

3.3 Малондиалдехид (MDA) (nmol/ml)

MDA е продукт на пероксидирането на полиненаситените мастни киселини с две или повече метиленови връзки. Неговото количество в серума корелира с покачване на оксидативния стрес. Измерването на неговата концентрация в кръвта дава количествена оценка на оксидативния стрес сам по себе си.

С помощта на теста на Колмогоров-Смирнов анализирахме разпределението на MDA 12 часа преди операцията; 12 часа след

операцията; 1 месец след операцията; 6 месеца след операцията (Таблица 3.3.1) . Установихме различно от нормалното разпределение за изоензим МВ във всички моменти на изследване (таблица 12):

Таблица 12. Анализ на разпределението на МДА в различните моменти на изследване (резултати от тест на Колмогоров-Смирнов)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

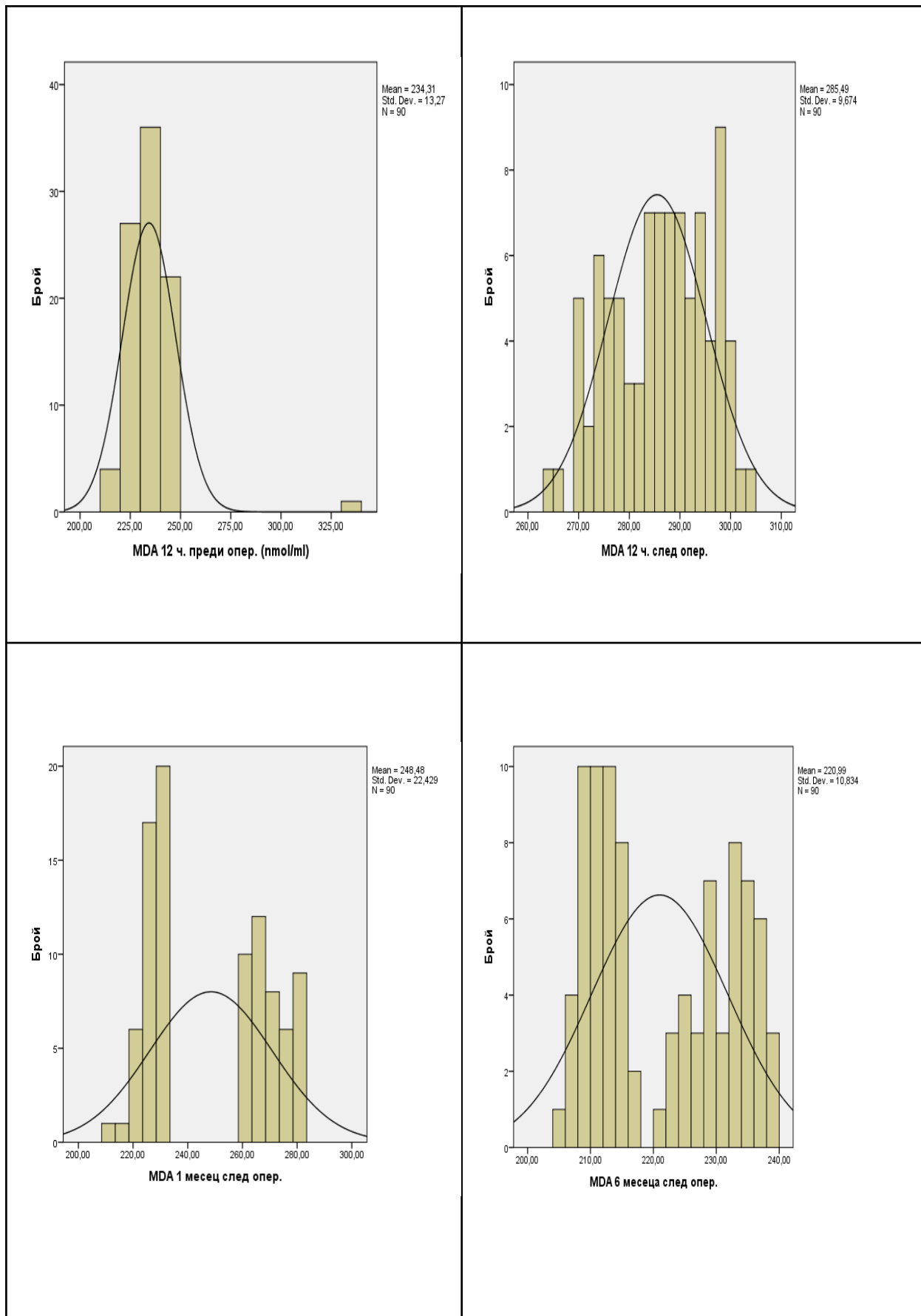
		MDA 12 ч. преди опер.	MDA 12 ч. след опер.	MDA 1 месец след опер.	MDA 6 месеца след опер.
N		90	90	90	90
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	234,3111	285,4889	248,4778	220,9889
	Std. Deviation	13,26959	9,67360	22,42853	10,83429
Most Extreme Differences	Absolute	,145	,077	,255	,188
	Positive	,145	,077	,255	,188
	Negative	-,124	-,070	-,196	-,119
Test Statistic		,145	,077	,255	,188
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000 ^c	,200 ^{c,d}	,000 ^c	,000 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

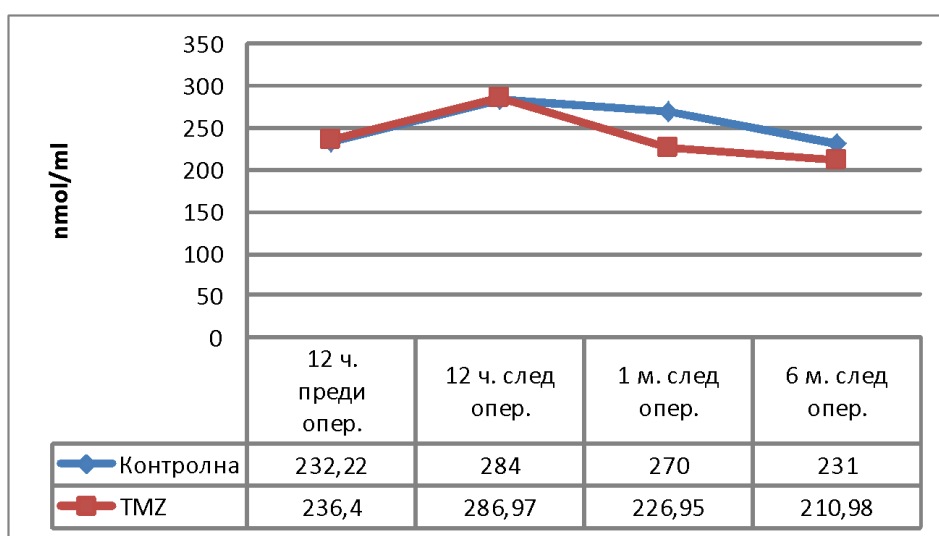
d. This is a lower bound of the true significance.



Диаграма 10: Хистограми на MDA в различните моменти на изследване

Средните стойности на MDA на двете изследвани групи в динамика са представени на диаграма 11.

Диаграма 11: Средни стойности на MDA в динамика в опитната и контролна група



Съпоставихме стойностите на MDA в двете групи с помощта на Mann-Whitney U тест. Установихме статистически значима разлика между двете групи във всички моменти на изследване с изключение на 12 ч. след операцията (таблица 13).

Макар и с малко групата на пациентите третирани с триметазидин стартира предоперативно с по-високи средни стойности на MDA, като разликата е статистически значима. На 12-ия следоперативен час и около 7-ми след първия прием на триметазидин серумните нива на MDA се повишават най-много, изравнявайки се в двете групи, като разликата в средната стойност няма статистическа значимост. На 1-вия месец следва спад в серумната му концентрация, като за третираната група той е значително повече и се достигат стойности под предоперативните, За контролната група този спад е доста по-незначителен. На 6-ия следоперативен месец тенденцията за намаляване нивата на MDA остава и в двете групи, като в контролната група се достигат предоперативните

серумни концентрации, а в третираната група се достигат средни стойности значително под предоперативните.

Достоверността на тези резултати се потвърди и от Mann-Whitney U тест за променливите с разпределение различно от нормалното, както и от съпоставката чрез Independent samples T - test.

Таблица 13. Съпоставка на MDA между TMZ и контролната група (резултати от Mann-Whitney U тест).

	MDA 12 ч. преди опер.	MDA 12 ч. след опер.	MDA 1 м. след опер.	MDA 6 м. след опер.
Mann-Whitney U	574,500	841,500	,000	,000
Wilcoxon W	1609,500	1876,500	1035,000	1035,000
Z	-3,537	-1,381	-8,176	-8,179
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,167	,000	,000

Изчислихме изменението на MDA (в %) в периода 12 часа след операцията до 6 месеца след операция, като използвахме следната формула:

$$\text{Изменение MDA} = ((\text{стойност на MDA 6 м. след изписване} - \text{стойност на MDA 12 ч. след операция}) / \text{стойност на MDA 12 ч. след операция}) * 100$$

Разпределението на тази величина беше нормално и затова приложихме Independent samples T- test за съпоставка на изменението в двете групи (таблица 14).

Таблица 14. Съпоставка на изменението на MDA в контролната и TMZ групи.

	Групи	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t	P-value
Изменение MDA	Контролна	45	-22,9607	3,99593	,59568	13.76	P<0.0001
	TMZ	45	-36,0545	4,97370	,74144		
Средна разлика	13.09				95% интервал на доверителност [11,20; 14,98]		

Съпоставка на стойностите на MDA по пол.

Изследвахме стойностите на малондиалдехида по пол. Съпоставката е представена на таблица 15.

Таблица 15. Съпоставка на средните стойности на MDA по пол.

	Пол	N	Mean	SEM	t	P
MDA 12 ч. преди опер.	мъже	67	233,23	,97	0.87	0.39
	жени	23	237,43	4,69		
MDA 12 ч. след опер.	мъже	67	285,17	1,19		
	жени	23	286,39	1,97	0.51	0.61
MDA 1 м. след опер.	мъже	67	247,91	2,79		
	жени	23	250,13	4,49	0.41	0.68
MDA 6 м. след опер.	мъже	67	221,04	1,34	0.08	0.93
	жени	23	220,82	2,17		

Не се установи статистически значима разлика по пол в средните стойности на MDA за контролната и третираната група.

Стратифицирахме по пол изследваните пациенти и анализирахме разликата в средните нива на MDA по отделно при мъжете и жените. Резултатите са представени съответно на таблица 16 и таблица 17.

Таблица 16. Съпоставка на средните стойности на MDA при мъжете между контролната и третираната група.

	Групи	N	Mean	SEM	t	P
MDA 12 ч. преди опер.	Контролна	33	229,03	1,31	4.95	<0.0001
	TMZ гр.	34	237,32	1,04		
MDA 12 ч. след опер.	Контролна	33	284,06	1,78	0.92	0.391
	TMZ гр.	34	286,26	1,60		
MDA 1 м. след опер.	Контролна	33	270,15	1,19	30.23	<0.0001
	TMZ гр.	34	226,32	0,82		
MDA 6 м. след опер.	Контролна	33	231,42	0,86	20.87	<0.0001
	TMZ гр.	34	210,97	0,48		

Таблица 17. Съпоставка на средните стойности на MDA при жените между контролната и третираната група.

	Групи	N	Mean	SEM	t	P
MDA 12 ч. преди опер.	Контролна	12	241,00	8,85	0.78	0.44
	TMZ гр.	11	233,54	2,14		
MDA 12 ч. след опер.	Контролна	12	283,83	2,78	1.37	0.18
	TMZ гр.	11	289,18	2,68		
MDA 1 м. след опер.	Контролна	12	269,58	2,18	16.46	<0.0001
	TMZ гр.	11	228,90	0,96		
MDA 6 м. след опер.	Контролна	12	229,83	1,41	11.12	<0.0001
	TMZ гр.	11	211,00	0,93		

Установи се значителна сигнификантна разлика в нивата на MDA между TMZ група и контролната група както при мъжете , така и при жените 1 месец и 6 месеца след операцията. При мъжете се установи разлика и 12 часа преди операцията, като при това измерване нивата на MDA бяха по-високи в третираната група.

Влияние на възрастта.

Анализирахме влиянието на възрастта върху стойностите на малондиалдехида. За целта групирахме изследваните пациенти в две групи – на възраст под и на 68 години и над 68 години. Границата 68 г. избрахме съгласно определение прието от СЗО през 2012 г. от статия публикувана в *International Journal of Epidemiology* , където за възрастни се приемат хората над 68 год. [116] Съпоставихме стойностите на MDA в двете възрастови групи (таблица 18).

Таблица 18. Съпоставка на средните стойности на MDA по възрастови групи.

	Възрастов и гр.	N	Mean	SEM	t	P
MDA 12 ч. преди опер.	<=68 г.	64	235,10	1,84	0,89	0,37
	> 68 г.	26	232,34	1,67		
MDA 12 ч. след опер.	<=68 г.	64	285,26	1,21	0,32	0,733
	> 68 г.	26	286,03	1,89		
MDA1 след опер.	<=68 г.	64	248,35	2,83	0,078	0,938
	> 68 г.	26	248,76	4,35		
MDA 6 м. след опер.	<=68 г.	64	221,28	1,32	0,400	0,690
	> 68 г.	26	220,26	2,25		

Не се установи статистически значима разлика между двете възрастови групи.

Аналогични резултати получихме и само за третираната група пациенти (таблица 19).

Таблица 19. Съпоставка на средните стойности на MDA по възрастови групи при пациентите с TMZ.

	Възр. гр.	N	Mean	SEM	t	P
MDA 12 ч. преди опер.	<=68 г.	32	236,15	1,11	0,391	0,698
	> 68 г.	13	237,00	1,98		
MDA 12 ч. след опер.	<=68 г.	32	286,62	1,63	0,398	0,693
	> 68 г.	13	287,84	2,63		
MDA1 м. след опер.	<=68 г.	32	226,71	0,86	0,538	0,594
	> 68 г.	13	227,53	1,10		
MDA 6 м. след опер.	<=68 г.	32	211,43	0,45	1,732	0,090
	> 68 г.	13	209,84	0,89		

3.4. Показатели свързани с болничния престой

Изследвахме следните показатели свързани с престоя на пациентите в болницата:

- престой в реанимация (в часове);
- общ болничен престой (в дни)

Не се установи статистически значимо различие между контролната и TMZ групата за престоя в реанимация. Относно общия болничен престой се наблюдава тенденция (с маргинална статистическа значимост) за по-малък болничен престой в групата на TMZ (таблица 20).

Таблица 20. Съпоставка на престоя в реанимация и общия болничен престой между контролната група и TMZ групата.

	Групи	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t	P
Престой в реанимация (ч.)	Контролна	45	23,31	2,66	0,39	0.264	0.792
	TMZ	45	23,46	2,91	0,43		
Болничен престой (дни)	Контролна	45	7,17	0,71	0,10	1.85	0.067
	TMZ	45	6,86	0,86	0,12		

Средния престой в реанимация е почти еднакъв за двете групи - 23,31 часа за контролната група и 23,46 часа за третираната - разликата е несигнификантна.

Приемът на триметазидин е оказал въздействие върху болничния престой, като не е повлиял времето за възстановяване в реанимация, а е

скъсил общо болничния престой (7,17 дни за контролната спрямо 6,86 дни за третираната група при $p = 0,067$).

3.6. Анализ на корелационни зависимости

Анализирахме корелационната зависимост между MDA във всички моменти на изследване и показателите престой в реанимация, общ болничен престой, клампажно време, продължителност на ЕКК и обща кръвозагуба в контролната и TMZ групи. Изчислените коефициенти на корелация на Спирман за контролната и TMZ групи са представени съответно на таблица 21 и таблица 22.

Таблица 21. Корелационни зависимости в контролната група (коэффициент на корелация на Spearman)

			Престой в реанимация	Болничен престой	Клампажно време	Продължителност на ЕКК	Обща кръвозагуба
Spearman's rho	MDA 12 ч. преди опер.	Коефициент на корелация	0,150	-0,067	-0,030	-0,082	0,159
		Sig. (2-tailed)	0,326	0,663	0,846	0,594	0,297
		N	45	45	45	45	45
	MDA 12 ч. след опер.	Коефициент на корелация	-0,007	0,055	0,580**	0,581**	0,079
		Sig. (2-tailed)	0,963	0,717	0,0001	0,0001	0,606
		N	45	45	45	45	45
	MDA 1 месец след опер.	Коефициент на корелация	0,104	-0,164	0,839**	0,174	-0,007
		Sig. (2-tailed)	0,495	0,282	0,0001	0,253	0,965
		N	45	45	45	45	45
	MDA 6 месеца след опер.	Коефициент на корелация	0,062	-0,031	0,753**	0,256	0,039
		Sig. (2-tailed)	0,683	0,840	0,0001	0,090	0,798
		N	45	45	45	45	45

Установихме следните статистически значими прави корелационни връзки в контролната група: MDA 12 ч. след операция ($r=0.58$, $P=0.0001$); MDA 1 месец след операция ($r=0.839$, $P=0.0001$); MDA 6 месеца ($r=0.753$, $P=0.0001$) след операция с клампажното време, както и MDA 12 ч. след операция и продължителност на ЕКК ($r=0.581$, $P=0.0001$).

Тези корелации показват сигнификантно увеличаване на оксидативния стрес, чрез количественото повишаване на MDA, с

увеличаване продължителността на аортния клампаж, във всички моменти на изследване. Такова сигнификантно повишаване се наблюдава и спрямо продължителността на ЕКК, но само в измерването на 12-ия час след операцията. Така интерпретираните данни потвърждават връзката между времетраенето на клампажа и ЕКК и големината на оксидативния стрес, отбелязани в предходни проучвания [117][118][119][120][121][122][123].

Таблица 22. Корелационни зависимости в TMZ група (коэффициент на корелация на Spearman)

			Престой в реанима ция	Болни чен престо й	Клампа жно време	Продъл жителн ост на ЕКК	Обща кръвозаг уба
Spearman's rho	MDA 12 ч. преди опер.	Коефициен т на корелация	-0,285	0,154	0,215	0,422**	-0,120
		Sig. (2-tailed)	0,058	0,313	0,156	0,004	0,434
		N	45	45	45	45	45
	MDA 12 ч. след опер.	Коефициен т на корелация	-0,087	-0,048	0,776**	0,071	0,143
		Sig. (2-tailed)	0,570	0,752	0,0001	0,644	0,350
		N	45	45	45	45	45
	MDA 1 месец след опер.	Коефициен т на корелация	-0,113	-0,379*	-0,278	0,035	-0,208
		Sig. (2-tailed)	0,461	0,010	0,065	0,820	0,169
		N	45	45	45	45	45
	MDA 6 месеца след опер.	Коефициен т на корелация	-0,162	0,120	-0,159	0,228	0,291
		Sig. (2-tailed)	0,286	0,432	0,296	0,132	0,053
		N	45	45	45	45	45

В групата с TMZ установихме статистически значима умерена права корелационна връзка между MDA 12 ч. преди операция и продължителност на ЕКК ($r=0.422$, $P=0.004$) - тук можем да направим извода, че по-високите нива на оксидативен стрес предоперативно рефлектират върху времето за реперфузия, необходимо на миокарда за възстановяване след клампаж. Статистически значимите по-дълги времена на ЕКК, при еднакви клампажни времена и стандартна оперативна техника, могат да се дължат само на по-дългата реперфузия, макар този показател да не е търсен и отбелязван в нашето изследване. Такава корелация в контролната група не се наблюдава, но там средното ниво на MDA предоперативно е по-ниско, което пречи да се изяви подобна зависимост.

Липсва корелацията между времето за ЕКК в третираната група и нивата на MDA на 12-ия следоперативен час, каквато е налична в контролната група. Още тук можем да предположим ефект на TMZ, неутрализиращ пиковите нива на оксидативен стрес.

Съществува статистически значима силна права корелационна връзка между MDA 12 ч. след операция и клампажно време ($r=0.776$, $P=0.0001$). Този резултат корелира с резултатите в контролната група. Липсва корелация между клампажното време и нивата на MDA на 1-вия и 6-ия месец след операцията, за разлика от контролната група. Тук можем да направим извода, че приложението на триметазидин повлиява повече високите нива на оксидативен стрес и това води до “изглаждане” на стойностите на MDA.

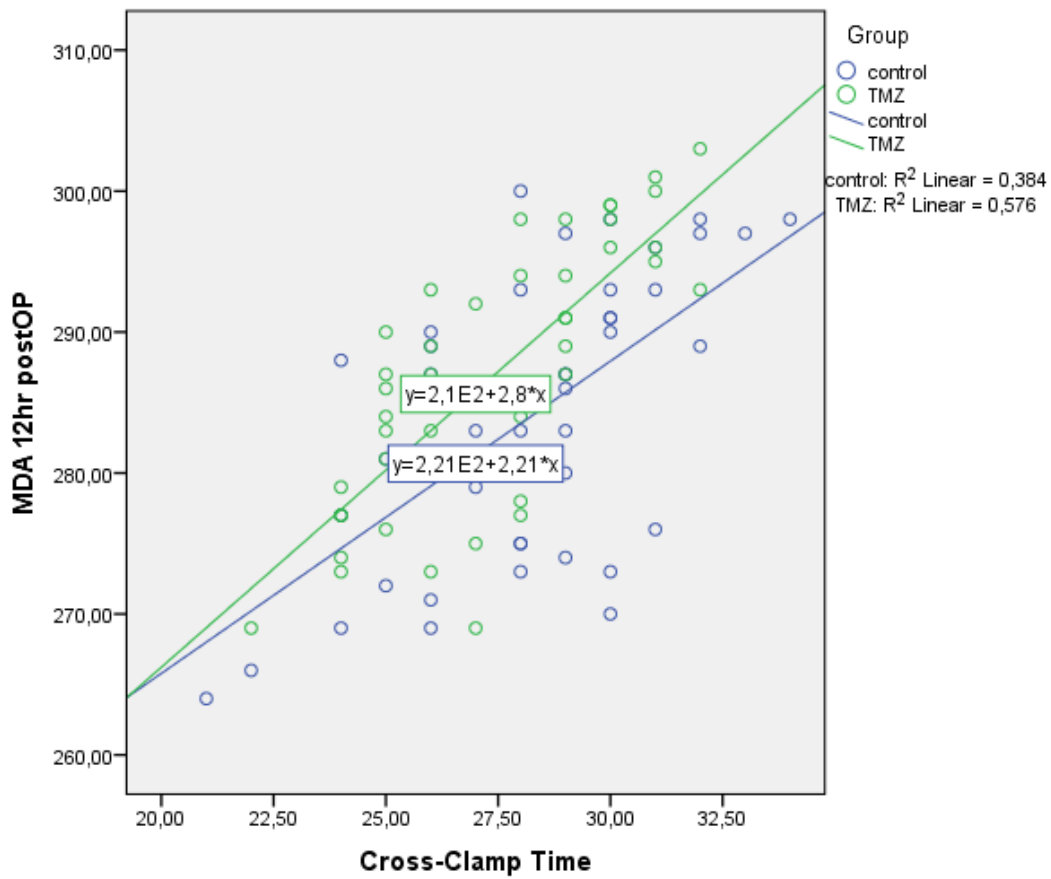
Наблюдаваме статистически значима умерена обратна корелационна връзка между MDA 1 месец след операция и болничния престой ($r=-0.379$, $P=0.01$). Такава връзка не се наблюдава в контролната група, където

различните нива на оксидативен стрес не резултират в разлики в продължителността на болничния престой.

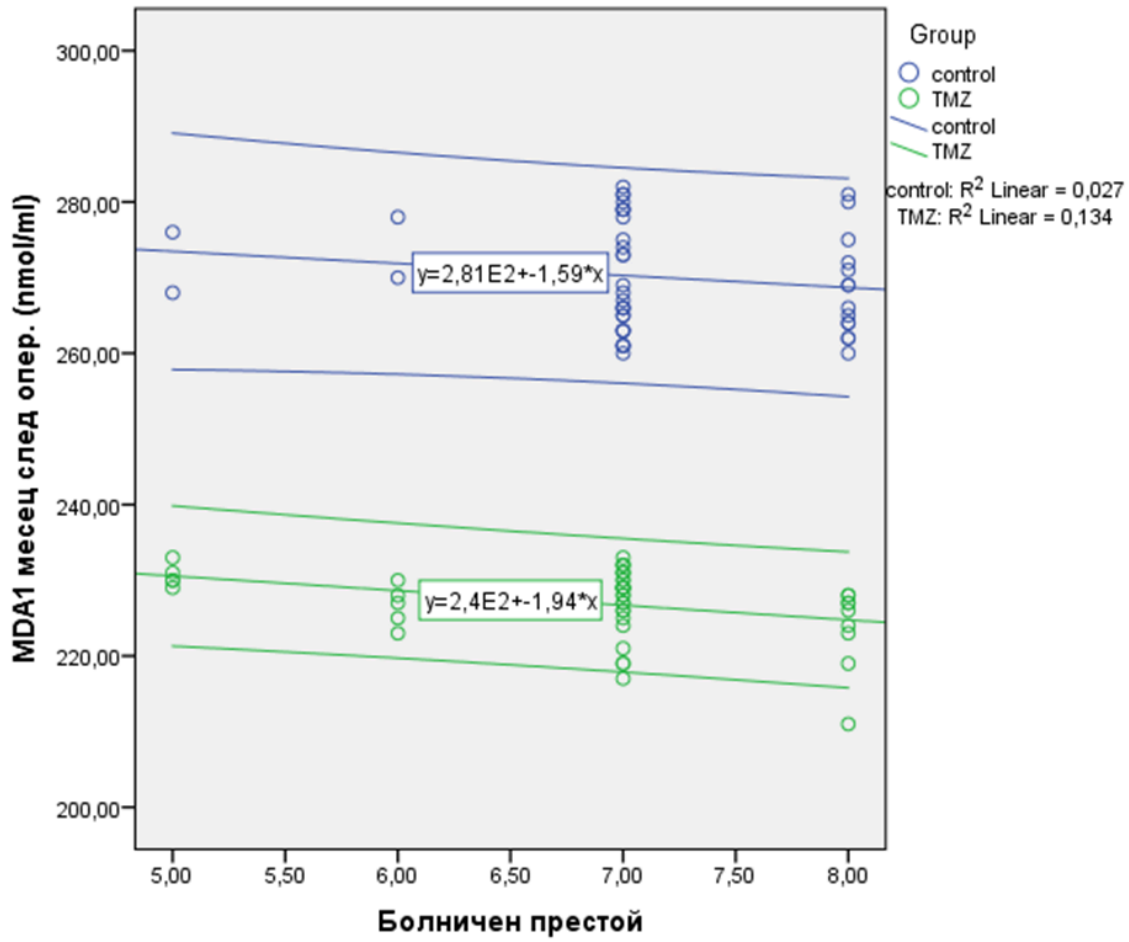
Липсва корелация между нивата на малондиалдехида и реанимационния престой, както и нивата на малондиалдехида и общата кръвозагуба и за двете групи.

За разлика от контролната група, в третираната с триметазидин увеличеното време на аортен клампаж корелира с увеличаване на оксидативния стрес само в периода на изследване на 12-ия час след операцията. Липсата на корелации в другите времеви периоди, в сравнение с контролната група показва наличие на ефект на TMZ със сигнификантна значимост. Същото можем да отбележим и по отношение на продължителността на ЕКК. Можем да направим извода, че приложението на TMZ „тушира” негативните ефекти на увеличената продължителност на аортния клампаж и ЕКК. Редукцията на оксидативен стрес в третираната група, резултира в намаляване на общо болничния престой, но не се отразява на престоя в реанимация.

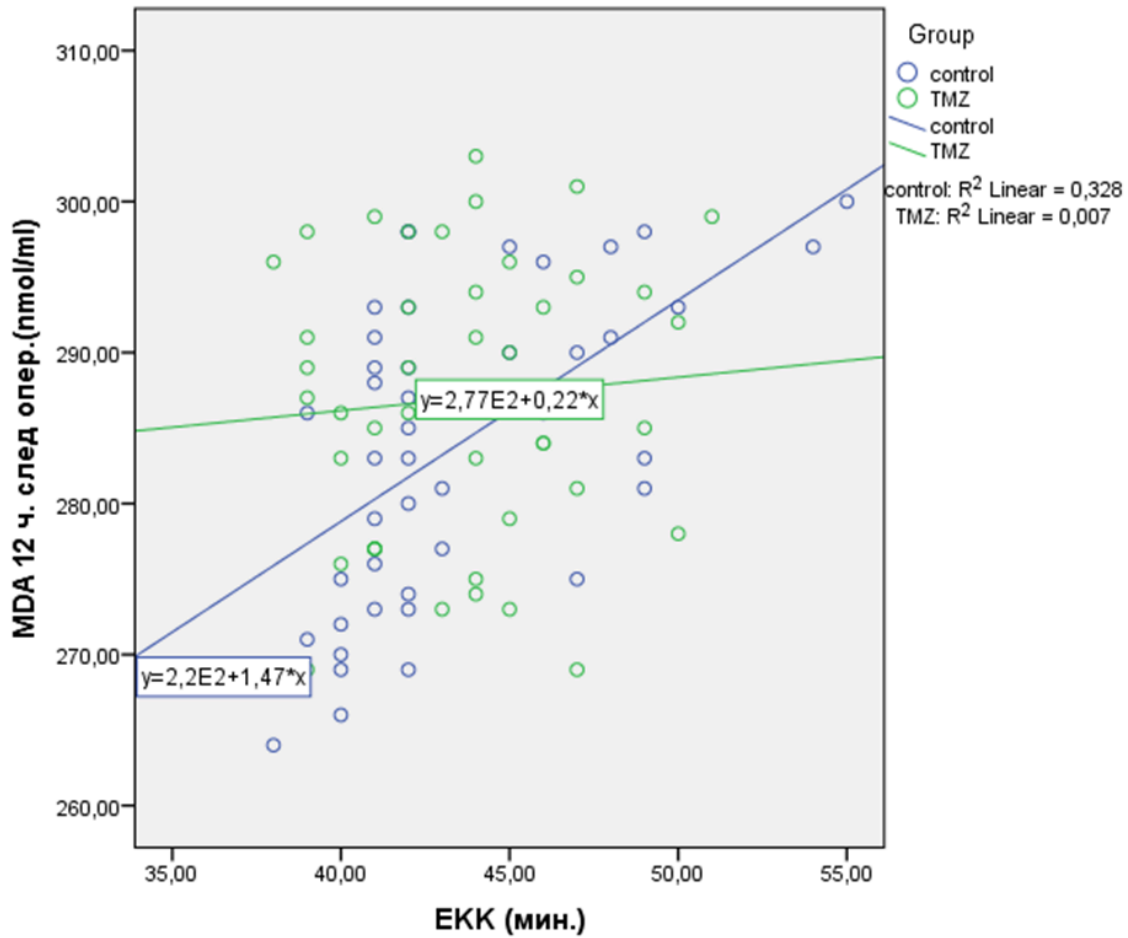
На 12-ия следоперативен час повишаването в нивата на MDA и в двете групи корелира с продължителността на аортния клампаж, като тази корелация е малко по-изразена за третираната група.



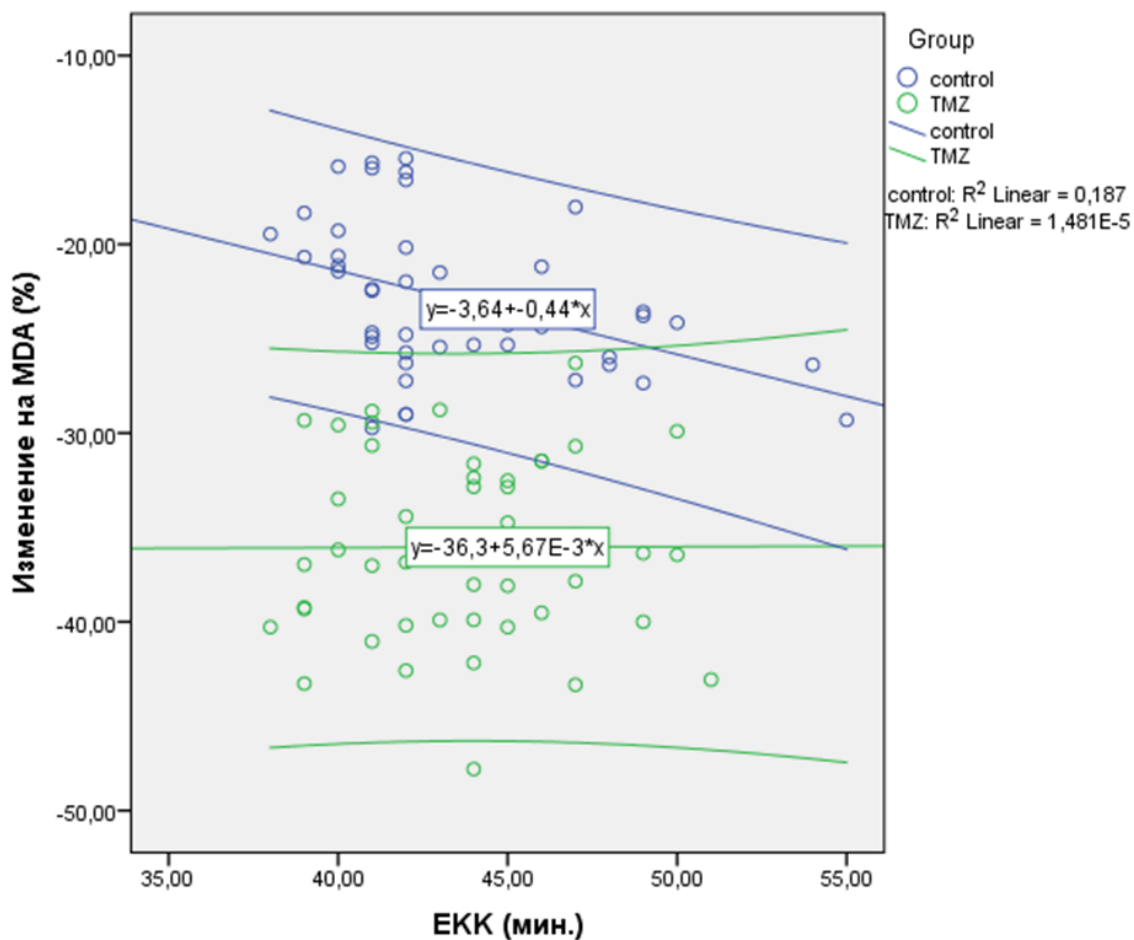
Диаграма 12: Корелационна зависимост между клампажното време и MDA 12 ч. след операция в контролната и TMZ групата.



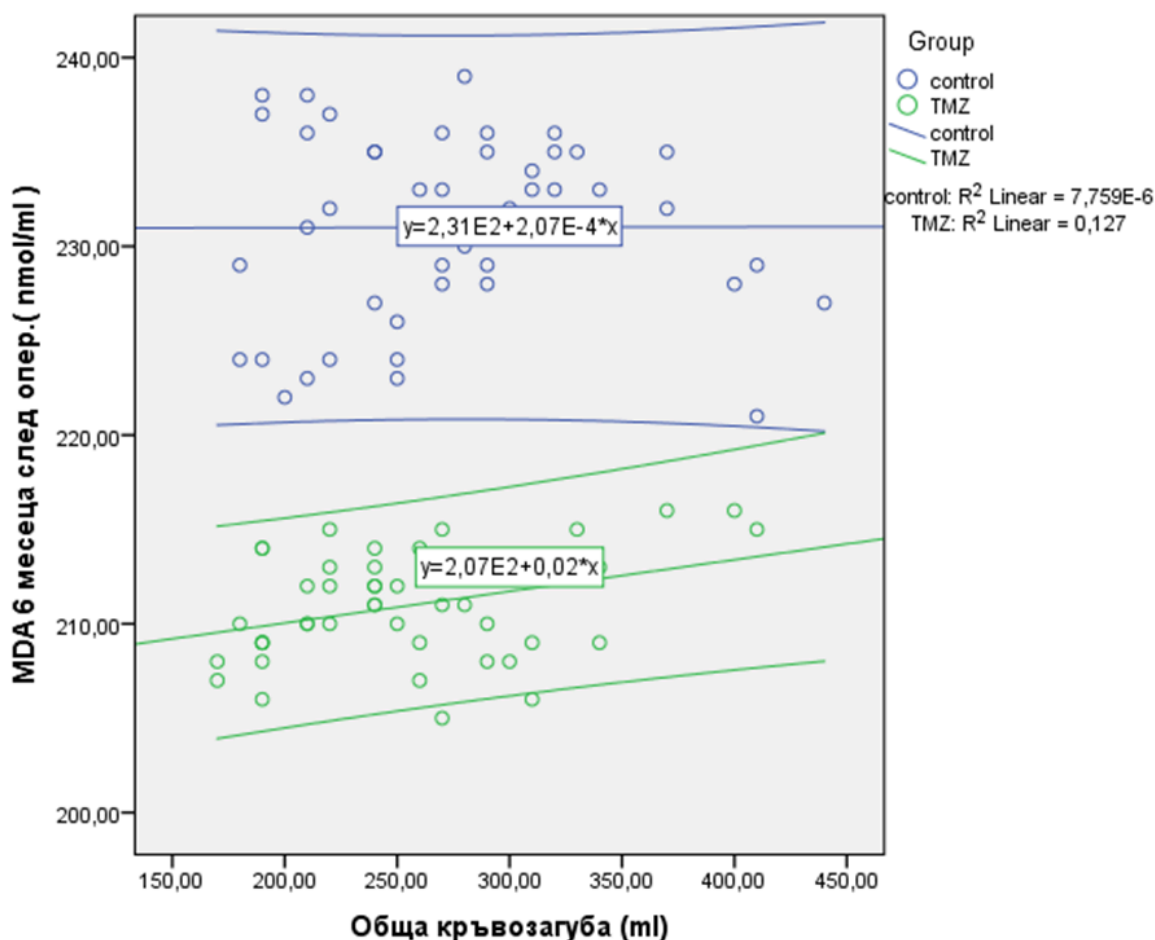
Диаграма 13: Корелационна зависимост между болничния престой и MDA 1 месец след операция в контролната и TMZ групата.



Диаграма 14: Корелационна зависимост между екстракорпорално кръвообращение и MDA 12 ч. след операция в контролната и TMZ групата.



Диаграма 15: Корелационна зависимост между екстракорпорално кръвообращение и изменението на MDA (6 месеца след операция спрямо 12 ч. след операция) в контролната и TMZ групата.



Диаграма 16: Корелационна зависимост между обща кръвозагуба и MDA бм. след операция в контролната и TMZ групата.

2. Анализ на ехографските параметри

Като критерий за обективизиране на левокамерната функция приемаме фракцията на изтласкване (ФИ), измерена ехографски по метода на Симпсън.

С помощта на теста на Колмогоров-Смирнов анализирахме разпределението на изследваните ехографски параметри (таблица 23). Установихме различно от нормалното разпределение за фракцията на изтласкване – ФИ (измерена в %) във всички моменти на изследване:

- ехокардиография ФИ 12 часа преди операцията (P<0.0001)
- ехокардиография ФИ 1 час след операцията (P=0.005)
- ехокардиография ФИ при изписването (P<0.0001)
- ехокардиография ФИ на 6-ти месец след операцията (P=0.04)

Таблица 23. Изследване на разпределението на ФИ в различните моменти на изследвани (резултати от тест на Колмогоров-Смирнов)

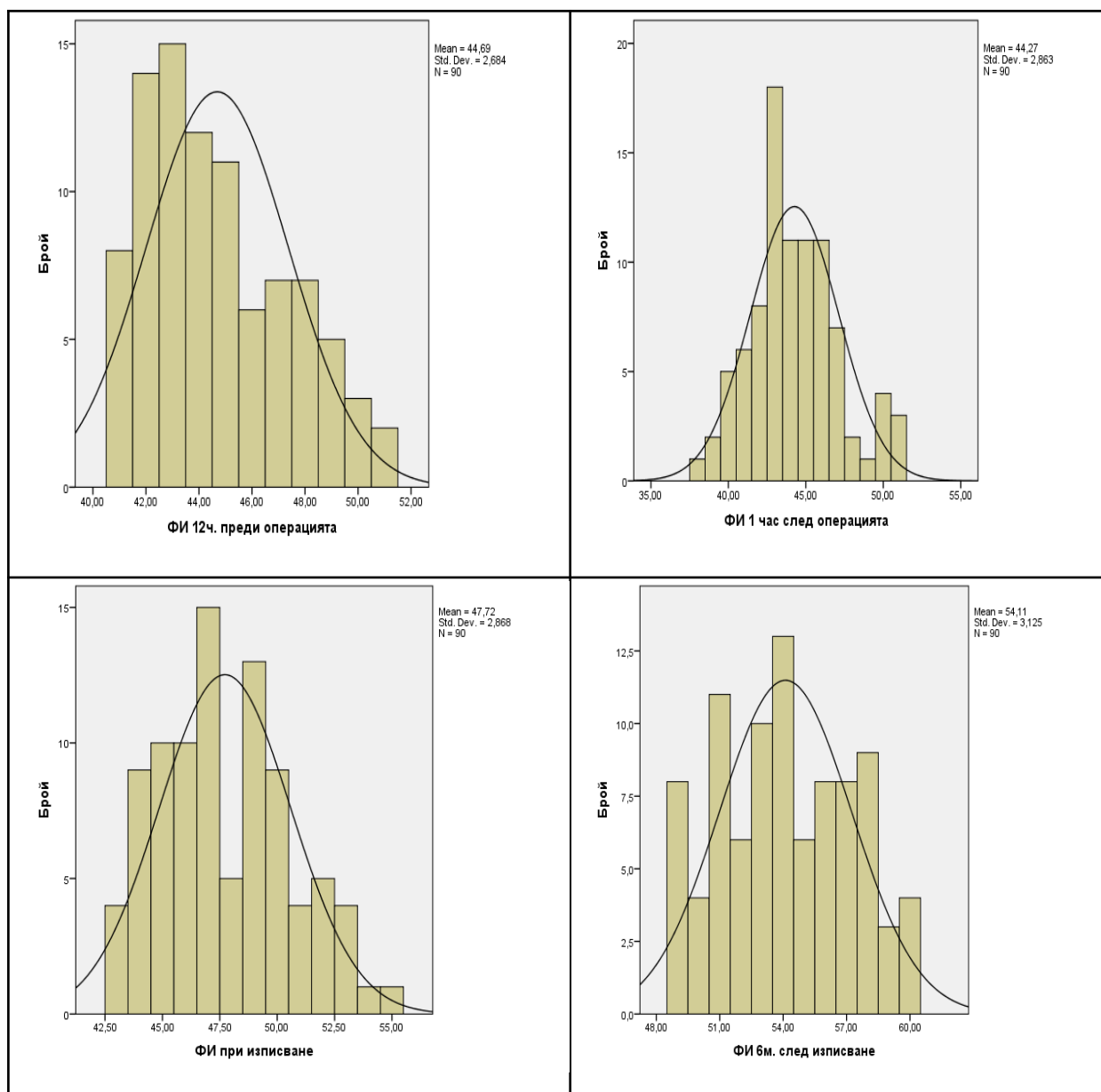
One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Echo EF 12hrs preOP	Echo EF 1hr postOP	Echo EF on discharge	Echo EF 6 months postOP
N		90	90	90	90
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	44,6889	44,2667	47,7222	54,1111
	Std. Deviation	2,68430	2,86317	2,86799	3,12455
Most Extreme Differences	Absolute	,146	,115	,133	,096
	Positive	,146	,115	,133	,096
	Negative	-,085	-,085	-,083	-,089
Test Statistic		,146	,115	,133	,096
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000 ^c	,005 ^c	,000 ^c	,040 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

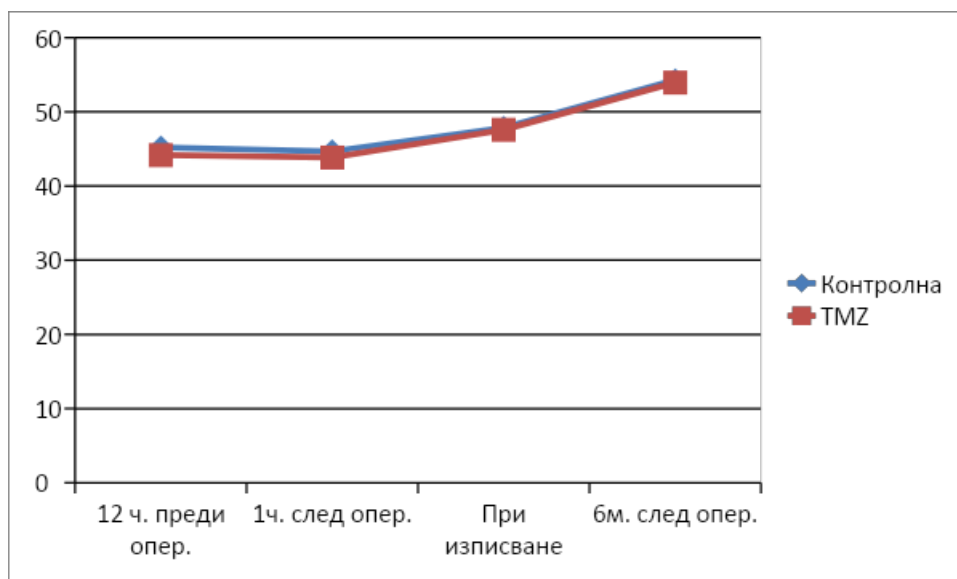
c. Lilliefors Significance Correction.



Диаграма 17: Хистограми на ФИ в различните моменти на изследване

Средните стойности на ФИ на двете изследвани групи в динамика са представени на диаграма 18.

И в двете групи се наблюдава лек спад във ФИ на първия час след операцията, последвано от покачване при изписването и на 6-ия месец, като динамиката е еднаква за двете групи.



Диаграма 18: Средни стойности на ФИ в динамика в опитната и контролна група

Достоверността на тези резултати се потвърди и от Mann-Whitney U тест за променливите с разпределение различно от нормалното, както и от съпоставката чрез Independent samples T - test.

Съпоставихме стойностите на ФИ в двете групи с помощта на Mann-Whitney U тест. Не се установи статистически значима разлика между двете групи във всички моменти на изследване (таблица 24).

Таблица 24. Съпоставка на ФИ между TMZ и контролната група (резултати от Mann-Whitney U тест).

	ФИ 12 ч. преди опер.	ФИ 1 ч. след опер.	ФИ при изписване	ФИ 6 м. след опер.
Mann-Whitney U	783,500	911,000	960,500	963,000
Wilcoxon W	1818,500	1946,000	1995,500	1998,000
Z	-1,862	-,825	-,422	-,401
Asymp. Sig. (2-tailed)	,063	,409	,673	,688

Изчислихме изменението на ФИ (в %) 1 час след операцията до момента на изписването на пациента, като използвахме следната формула:

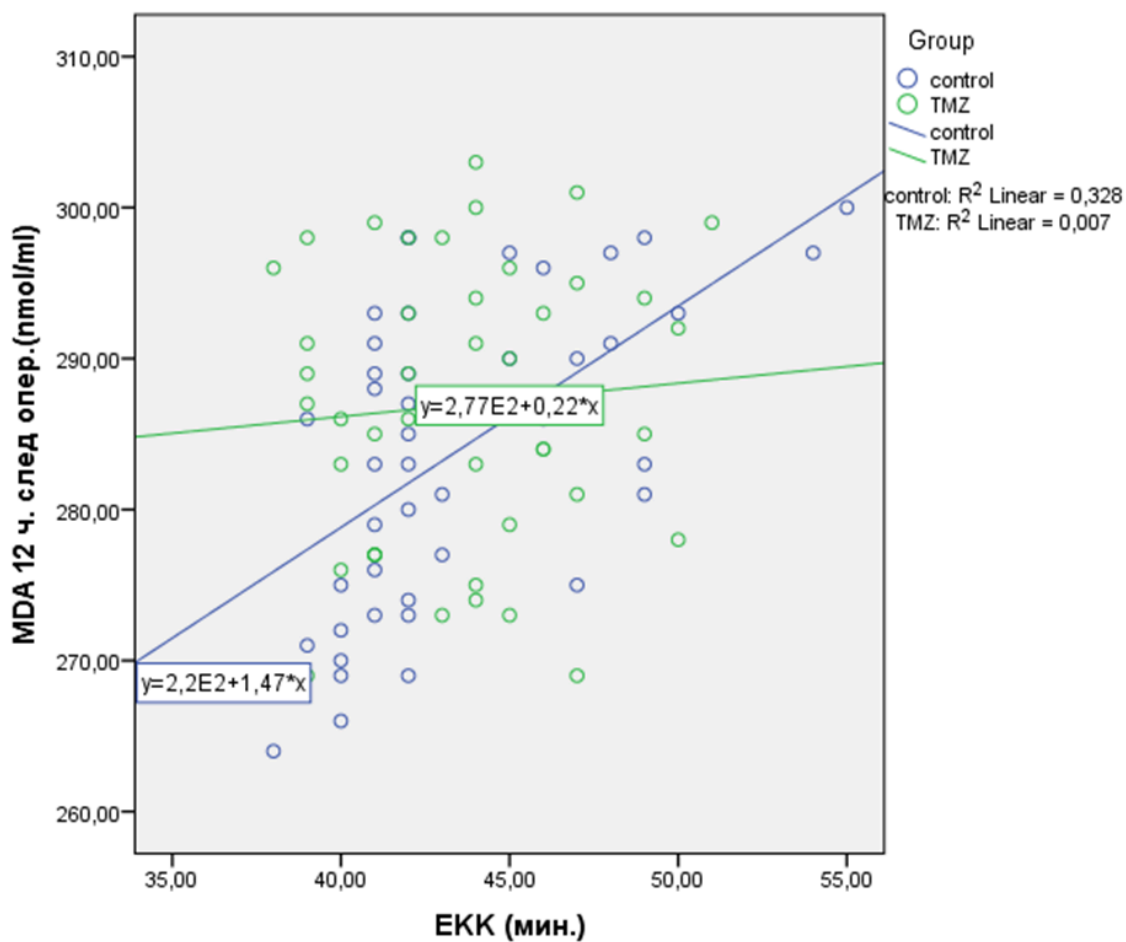
Изменение ФИ= ((стойност на ФИ при изписване – стойност на ФИ 1 ч. след операция)/ стойност на ФИ 1 ч. след операция))*100

Разпределението на тази величина беше нормално и затова приложихме Independent samples T- test за съпоставка на изменението в двете групи (таблица 25).

Таблица 25. Съпоставка на изменението на ФИ в контролната и TMZ групи.

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t	P-value
Изменение ФИ	control	45	7,2392	3,14566	,46893	1,58	0,117
	TMZ	45	8,5862	4,76110	,70974		
Средна разлика	-1,35				95% интервал на доверителност [-3,037; 0,343]		

Установихме статистически значима обратна корелационна зависимост между фракцията на изтласкване 12 ч. преди операцията и MDA 12 ч. след операцията в групата с TMZ ($r = -0,304$; $P = 0,042$).



Диаграма 19: Корелационна зависимост между ехокардиографска фракция на изтласване 12 часа преди операцията MDA 12 ч. след операция в TMZ групата.

VI. Обсъждане

Ишемичната болест на сърцето (ИБС) е социално значимо, хронично прогресиращо заболяване в резултат на обструктивно или необструктивно атеросклеротично засягане на епикардните съдове. Тя е една от водещите причини за влошаване качеството на живот и сърдечно-съдова смъртност.

Терминът ишемична болест на сърцето описва група на клинични синдроми, характеризиращи се с миокардна исхемия и дисбаланс между кръвоснабдяването на миокарда и моментната му нужда. Тъй като фундаменталният патофизиологичен дефект в ишемичния миокард е неадекватната перфузия, исхемията е свързана не само с недостатъчното снабдяване с кислород, но също и с намалена наличност на хранителни вещества и неадекватно отстраняване на крайните метаболитни продукти. При миокардна исхемия, последствията от недостига на кислород не могат да бъдат отделени от ефектите на нарушеното отмиване на метаболитите.

Клиничните синдроми на ИБС причиняват повече смъртни случаи, заболяемост и финансова тежест в западните общества, отколкото всяка друга група заболявания.

Въпреки прогресивното намаляване на смъртността от ИБС, поради подобрени стратегии за лечение и превантивни мерки, 1 от 6 смъртни случая в Съединените щати, се дължи на коронарна болест. При повечето пациенти с ИБС, причината за миокардна исхемия е намаляване на коронарния кръвен поток, поради атеросклеротична коронарна артериална болест.

Проявите на ИБС зависят от продължителността, тежестта и остротата на ишемичните епизоди. Внезапното критично намаляването на коронарния кръвоток е основният механизъм при остри коронарни синдроми (ОКС) - спектър от клинични състояния, които включват

нестабилна стенокардия, миокарден инфаркт без ST-елевация и инфаркт на миокарда с ST елевация.

За разлика от това, при хроничната форма на ИБС наличието на ограничаващи кръвотока коронарни лезии ограничава способността на сърцето да увеличи кръвоснабдяването си в отговор на завишената нужда на миокарда от кислород, което води до развитие на стабилна ангина пекторис.

Сърцето е аеробен орган, който извлича по-голямата част от енергията си от митохондриалното дишане и окислителното фосфорилиране. Миокардната исхемия възниква, когато енергийните изисквания на миокарда надвишават способността на митохондриите за генериране на енергия, поради дефицит на снабдяване с кислород и кардиомиоцитите преминават на анаеробна гликолиза като средство за генериране на енергия. Анаеробната гликолиза е неефективен източник на енергия и капацитета на гликолитичните ензими е ограничен; следователно производството на енергия от анаеробна гликолиза не може да компенсира загубата на окислителното фосфорилиране и води до отрицателен енергиен баланс на миокарда с прогресивна загуба на високоенергийните фосфатни резерви. Освен това, хидролизата на адениновите нуклеотиди и генерирането на млечна киселина води до прогресивно увеличаване на производството на реактивни кислородни форми и кисели продукти в исхемичния миокард. Именно те са причината за разширяване на зоната на увреждане.

Лечението на ИБС е медикаментозно, интервенционално и оперативно. В болшинството от случаите хирургичното лечение е класическа байпас хирургия с използване на екстракорпорално кръвообращение(ЕКК) и аортен клампаж.

Сърдечната хирургия, използваща ЕКК, е свързана със системно възпаление, исхемично-реперфузионно увреждане (IR) и хирургична

травма, които са силни стимуланти на генерирането на RNOS, водещи до повишен оксидативен стрес по време и след операцията. Повишено производство на RNOS се наблюдава при реперфузията на исхемичното сърце след кардиоплегичен миокарден арест по време на операция, което води до влошаване на предсърдната и камерна функция, израз на което са постоперативните камерни фибрилации (POAF) и редуцията на фракцията на изтласкване.

Като количествен маркер за нивата на оксидативен стрес използваме серумната концентрация на малондиалдехид (MDA). Основният източник на MDA в биологичните проби е пероксидирането на полиненаситени мастни киселини с две или повече метиленови двойни връзки. Липидната пероксидация е важен компонент на оксидативния стрес. Липидната пероксидация променя мембранната течливост и пропускливост, понякога необратимо. Липидите в клетъчните мембрани, особено полиненаситените мастни киселини (PUFA), са податливи на атака от различни RNOS, като хидроксилни радикали и пероксидрати [17]. Обикновено увреждането при тези условия е многостепенна последователност от събития, започващи с RNOS-медирано извличане на водород от липидната молекула, създавайки радикал на мастна киселина, който сам извлича водороден атом от съседната липидна молекула, създавайки друг радикал на мастна киселина. Създалата се реакция е самоподдържаща се и веднъж възникнала няма нужда от присъствие на RNOS. Количеството на MDA корелира с разрастването на реакцията.

Като показатели за степента на миокардна увреда изследваме нивата на изоензима MB на СРК, ТгТ и промяната във фракцията на изтласкване на лява камера.

MB изоензима на СРК се използва като специфичен индикатор на миокардно увреждане, включително в постоперативния период в

кардиохирургията. Количеството му в серума се увеличава при клетъчна смърт на кардиомиоцити и корелира с обхвата на лезията.

Тропонин Т е биомаркер, който е кардиоспецифичен. Количеството му в серума се повишава при освобождаването на тропонин от миокарда, което може да е резултат от нормалния клетъчен цикъл като апоптоза, освобождаване от клетките на тропонин-деградационни продукти и миокардна некроза. Именно при миокардна некроза нормалните базови нива бързо нарастват и могат да се отчетат лабораторно още в първите часове при миокардното увреждане след сърдечна хирургия [124]. Тропонин Т може да бъде и маркер само за исхемия, когато нивата му се покачват без да е настъпила клетъчна некроза, поради обратими нарушения в клетъчния метаболизъм, израз на които са повишаване пропускливостта на клетъчната мембрана и оток на кардиомиоцита, водещ до формиране и освобождаване на мембранни вакуоли.

Фракцията на изтласкване на лява камера измерена ехографски, е достоверен и лесно приложим метод за определяне функционалното състояние на сърдечния мускул. Методът е рутинно използван в кардиохирургията за определяне предоперативния статус на миокарда, както и за проследяване на възстановяването в следоперативния период.

Триметазидина (TMZ), е лекарство, което проявява своя антиисхемичен ефект без да променя коронарния кръвоток и контрактилитета на сърцето. TMZ намалява използването на свободни мастни киселини като източник на енергия за миокарда, което води до увеличаване на глюкозната оксидация, която е по-ефективна и с по-малка нужда от кислород за провеждане на реакцията. Като резултат, TMZ намалява исхемичния стрес и подобрява работата на сърцето по време на исхемия. TMZ е широко използван медикамент за лечение на ИБС, но все още за употребата му като средство за редуциране на оксидативния стрес, съпътстващ кардиохирургията, няма достатъчно подкрепени с доказателства данни.

Проучванията направени до тук, следват различни терапевтични модели, гледат се върху сравнително малък брой пациенти, често с различен предоперативен и оперативен профил. Резултатите са противоречиви и не дават категоричен отговор за ползата от приложението на TMZ.

1. Анализ на изследваната популацията

Изследването започва през март 2018 и завършва през април 2019, като са обхванати 93 пациенти, от които впоследствие са изключени 3-ма. Общите изходни характеристики на изследваната група показват, че в тази извадка на пациенти с ИБС съотношението мъже/жени е 3 към 1. Съотношение между половете се запазва и в двете групи на третирани с TMZ и контролна. Това съотношение е обяснимо с характера на различната заболяемост на двата пола, поради протективния ефект на женските полови хормони във фертилната част от живота на жените. Средната възраст на пациентите е 63,56 години, като средната възраст за контролната група е $64,18 \pm 6,54$ години, а за третираната е $62,97 \pm 9,45$ години. Най-много са пациентите във възрастовата група 61-70 години и за двата пола.

Всички изследвани пациенти са с ИБС - стабилна стенокардия, триклонова коронарна болест, с придружаващи заболявания артериална хипертония и захарен диабет на перорална терапия. Средната предоперативна фракция на изтласкване за цялата изследвана група е $44,69 \pm 2,68$. Крайната група от проучването включва 90 пациенти, предоперативно разделени на 2 подгрупи: 1-ва група: (n = 45) получаващи триметазидин 35 mg/два пъти дневно непосредствено след екстубацията и 2-ра контролна група: (n = 45) получаващи плацебо. Останалата терапия е идентична за всички участници: ацетилсалицилова киселина (ASA) 100

mg/дневно, розувастатин 10 mg/дневно, метопролол 50 mg/два пъти дневно, периндоприл 5 mg/дневно и гликлазид 60 mg/дневно.

При всички пациенти е извършена кардиохирургична операция в планов порядък, чрез срединна стернотомия като оперативен достъп, в условията на ЕКК с клампаж на аортата и кардиоплегичен арест, постигнат със студена кръвна кардиоплегия.

Продължителността на ЕКК и клампажа варират, според времето което е било необходимо за провеждане на оптимална реваскуларизация. Средното време на ЕКК е $43,53 \pm 3,89$ мин. за контролната група и $43,71 \pm 3,37$ мин. за третираната. Средното клампажно време е $28,22 \pm 2,78$ за контролната и $27,42 \pm 2,50$ за третираната група. Средния престой в реанимация за пациентите от контролната група е $23,31 \pm 2,66$ часа, за третираната $23,46 \pm 2,91$ часа. Общо болничният престой за контролната група е $7,17 \pm 0,71$ дни, докато за третираната е $6,86 \pm 0,86$ дни. Средната обща кръвозагуба за двете групи е $276,00 \pm 66,24$ милилитра за контролната и $255,77 \pm 60,69$ милилитра за третираната с TMZ група.

2. Сравнение между изходните характеристики на двете групи

Двете главни групи се сравниха според техните изходни характеристики с цел да се установи съпоставимостта между тях. Резултатите са представени в раздела „Резултати”. От тях става ясно, че не се установяват, никаква статистически значими разлики между групите на третираните с TMZ и контролната група, както в ранга на количествените, така и в пропорцията на качествените характеристики. т.е. групите могат да бъдат сравнявани.

3. Резултати

Сравняването между проследяваните показатели в двете групи показва следните тенденции. По отношение на лабораторните показатели СРК-МВ и ТnТ няма сигнификантна разлика между групата на третираните с триметазидин и контролната група във всеки един момент от изследването. Стойностите предоперативно не се различават от нормалните и са еднакви за двете групи. И в двете групи стойностите на изоензим МВ на СРК и тропонин Т рязко се увеличават на 12-ия следоперативен час и на 6-ия месец достигат стойности близки до базовите, без сигнификантна разлика за контролна и третирана група.

При така представените резултати не отчитаме влияние на употребата на триметазидин върху стойностите на изоензим МВ и тропонин Т във всички моменти на изследването. Можем да заключим, че метаболитните ефекти на TMZ, приложен по начина възприет в изследването, не оказват влияние на клетъчната увреда в периодите на вземане на биологичните проби, израз на която са повишените нива и на двата биомаркера. Това не съвпада с резултатите представени при други изследвания. Turnerir et al. (1999) [104] наблюдава кардиопротективната роля на TMZ. Авторите оценяват потенциалната миокардна защита на TMZ чрез измерване на тропонин Т по време на CABG на тридесет рандомизирани пациента с висок клас стенокардия, разделени на две групи. Резултатите показват, че в групата на TMZ нивата на ТnТ са значително по-ниски от тези в плацебо групата. В това изследване терапията с триметазидин в третираната група започва три седмици преди операцията и серумните проби са взимани само в интервали на ранния следоперативен период. Не са отчитани функционални сърдечни показатели. Vanach et al. (2005) [107] оценяват ефекта на TMZ върху хемодинамичните параметри на сърцето и следоперативната прогноза. Сто и четиридесет пациенти са включени в проучването, разделени в две групи

(плацебо и TMZ). Терапията с триметазидин се провежда най-малко два месеца преди и след сърдечна хирургия. Авторите проследяват следоперативни нива на СК-МВ, ранна следоперативна фракция на изтласкване (EF), поява на постоперативни аритмии, средно време на престой в интензивно отделение (ICU) и продължителност на хоспитализация. Не се наблюдават съществени разлики в стойностите на СК-МВ в двете групи. Предоперативната фракция на изтласкване е сходна и в двете групи; обаче в следоперативния период е установено значително повишаване на ФИ в групата на TMZ ($p = 0,05$). Авторите правят заключението, че прилагането на TMZ преди и след сърдечна операция може да повлияе на следоперативните хемодинамични параметри. Martins et al. (2008) [103] оценява ефекта на TMZ върху исхемичното-реперфузионно увреждане. Авторите провеждат двойно-сляпо, плацебо-контролирано рандомизирано проучване върху 60 пациенти, претърпели CABG, разделени в две групи. Измерват се тропонин Т и СРК-МВ предоперативно без лекарства, след 12 до 15 дни прием на лекарства/плацебо, пет минути след отстраняване на аортната клампа и на следващите 12, 24 и 48 часа. Резултатите от TnT и СРК-МВ достигат сигнификантно значими разлики ($p = 0,0001$) в третираната група в сравнение с контролната и в четирите периода на анализ. Провеждат се и ехокардиографски изследвания в групите, които не показват динамика и разлики между тях. Авторите заключават, че предварителното лечение с триметазидин намалява исхемично-реперфузионното увреждане по време на CABG, но не показва ефект върху левокамерната функция. Lopatin and Dronova(2009) [109] добавят серия от 306 пациенти, подложени на байпас хирургия, разделени на две групи. Приемащите триметазидин (35 mg/MR на таблетка) две седмици преди операцията, имат значително по-ниски нива на креатин-киназа и креатин-киназа МВ на 6-ия следоперативен час. Hei L et al. (2015) правят систематичен преглед и метаанализ на шест

рандомизирани контролирани проучвания за изследване на ефективността на миокардната протекция при предоперативна терапия с триметазидин при пациенти с САВГ.

Оценени са следоперативните концентрации на креатин киназа (СК), креатин киназа МВ(СК-МВ), креатин фосфокиназа (СРК), тропонин Т (ТnТ) и тропонин I (ТnI). Резултатите им показват значително по-ниски следоперативни нива на СК, СК-МВ, ТnТ и ТnI в групите, лекувани с триметазидин. Разликите с нашите резултати можем да коментираме по следния начин: всички изследвания до тук започват терапия с триметазидин поне една седмица предоперативно; проследяваните интервали са неколkokратно през ранния следоперативен период, когато ензимната динамика е най-голяма; в нашето изследване нямаме предоперативен прием на триметазидин и единствената серумна проба в ранния следоперативен период в двете групи е взета няколко часа след първия прием на медикамента. Можем да предположим, че по това време все още няма ефект на триметазина, който може да се отчете по концентрациите на СК-МВ и ТnТ или че триметазидина няма влияние върху стойностите на изоензим МВ и тропонин Т в първите 6-8 часа след започване на терапия с него. В началния момент на изследването и в двете групи няма прием на ТМЗ, така че липсата на разлики в групите е обяснима. В крайния момент също липсват статистически разлики между групите, но регистрираните стойности са в границата на нормата. Можем да направим извода, че приема на ТМЗ не повлиява базовите нива на двата биомаркера.

По отношение на серумните нива на малондиалдехид наблюдаваме разлики в двете групи със статистическа значимост. Групата на пациентите третирани с триметазидин има предоперативно по-високи средни стойности на МДА, като разликата е статистически значима. По време на второто вземане на проби на 12-ия следоперативен час серумните нива на

MDA се повишават най-много, изравнявайки се в двете групи, като разликата в средната стойност няма статистическа значимост. На 1-вия следоперативен месец наблюдаваме спад в серумната концентрация на малондиалдехида, като за третираната група той е значително повече и и се достигат стойности под предоперативните. За контролната група този спад е доста по-незначителен. На 6-ия следоперативен месец тенденцията за намаляване нивата на MDA остава и в двете групи, като в контролната група се достигат предоперативните серумни концентрации, а в третираната група се достигат средни стойности значително под предоперативните.

За първи път малондиалдехида е бил използван като маркер за нива на оксидативен стрес при сърдечно оперирани пациенти приемащи триметазидин, от Fabiani et al. [99] при рандомизирано, двойно-сляпо, плацебо-контролирано проучване, разработено през 1992 г. Резултатите показват, че увеличаването на малондиалдехида в коронарния синус 20 минути след реперфузия е значително редуцирано в групата на триметазида. В проучването на Vendrinne et al. (1996) [102], при пациенти на предоперативна терапия с TMZ, без съществена разлика по отношение на броя на реваскуларизираните съдове, продължителността на аортния клампаж или времето за кардиопулмонален байпас, авторите отбелязват малко по-високи нива на MDA в групата на третираните. Интерпретацията на данните от проучването не показват разлики в ФИ между двете групи. Нашите резултати са подобни на Iskensen et al. (2006) [108], които изследват ефекта от предоперативната употреба на TMZ върху намаляването на оксидативния стрес по време на CABG. Авторите проследяват серумната супероксиддисмутаза (SOD), ендогенни антиоксидантни ензимни системи на глутатион пероксидазата (GPx) и малондиалдехида като маркери на оксидативен стрес, при 24 пациенти разделени в две групи. Резултатите показват, че следоперативните нива на

антиоксидантни ензими са сигнификантно различни между групите ($p = 0,05$), по-високи в групата на TMZ, но нивата на MDA са значително по-високи в контролната група. Няма значителни разлики в хемодинамичните параметри между двете групи. Разликата с нашето изследване е, че кохортата пациенти е значително по-малка и че приложението на TMZ започва предоперативно. Динамиката в нивата на MDA в двете групи, наблюдавани от нас се отразява на общо болничния престой, като той е по-кратък за групата на третираните, но не се отразява на средното време за престой в реанимация. Тези разлики намират отражение в корелациите на двете групи спрямо нивата на MDA със средните времена на ЕКК и аортен клампаж. В контролната група продължителността на ЕКК и аортния клампаж видно се отразяват на концентрацията на MDA. В същата група корелациите са много по-изразени и в повече времеви периоди, за разлика от третираната, което показва че приложението на TMZ неутрализира повишените нива на оксидативен стрес от увеличената продължителност на аортния клампаж и ЕКК. Количеството на следоперативната кръвозагуба не показва да има ефект върху отчетените стойности на малондиалдехида.

Фракцията на изтласкване измерена ехографски по метода на Симпсън не показва разлика между контролната група и тази на триметазидина. Подобни са са резултатите в изследванията на Iskensen et al., Vendrinne et al., Martins et al.

И в двете групи при нашето изследване се наблюдава лек спад във ФИ на първия час след операцията, последвано от покачване при изписването и на 6-ия месец, като динамиката е еднаква за двете групи. Единствената разлика между двете групи със статистическа значимост е обратната корелационна зависимост между фракцията на изтласкване предоперативно и нивата на MDA на 12-ия следоперативен час в групата на триметазидина, която не можем да интерпретираме. Можем да

заклучим, че следоперативният прием на триметазидин не влияе на фракцията на изтласкване при коронарни пациенти, въпреки намаленият оксидативен стрес, обективизиран с намалените нива на малондиалдеhid в третираната група.

4. Проследяване

Пациентите са проследявани до 6-ия месец след оперативната интервенция, по показатели, както е обяснено в раздела **“Материали и методи”**. При контролните им прегледи, включително до края на първата година, не се наблюдава възвръщане на ангинозна симптоматика при никой от пациентите от двете групи.

5. Влияние на пол

Не се установи статистически значима разлика по пол в средните стойности на MDA, във всички моменти на изследването за цялата изследвана популация (общо за контролната и третираната група). Така анализираниите данни не показват влияние на пола върху оксидативния стрес.

Установява се значителна сигнификантна разлика в нивата на MDA между контролната и третираната група и при мъжете и при жените на 1-ви и 6-ти следоперативен месец, като стойностите са сигнификантно по-високи в контролната група. Динамиките са идентични за двата пола.

При анализиране на данните, стратифицирани по пол в контролната и третираната група, установихме разлика и в нивата на MDA 12 часа преди операцията при мъжете, като стойностите са по-високи в третираната група. Такава разлика не наблюдаваме при жените.

1. Влияние на възрастта

Средната възраст на пациентите в контролната група е $64,18 \pm 6,54$ години, а за третираната е $62,97 \pm 9,45$ години. Най-много пациенти и в двете групи и за двата пола са в шестата декада, съответно 61,2% от мъжете и 43,5% от жените. При разделяне на пациентите на възрастни и не възрастни по определение на СЗО е приета границата от 68 години. По-млади от тази граница са 64 пациента в общата популация и 32 в групата на третираните с триметазидин. Не наблюдавахме никакви разлики в нивата на MDA, при така направената стратификация както в общата популация, така и в третираната група. Можем да заключим, че възрастта не оказва влияние на нивата на оксидативен стрес при коронарна хирургия.

2. Влияние на помпената функция на лява камера

Като критерий за обективизиране на левокамерната функция приемаме фракцията на изтласкване(ФИ), измерена ехографски по метода на Симпсън. Ехокардиографското изследване за проучването се провежда 12 часа преди операцията, на 1-вия час след излизане от операционна, при изписването и на 6-ти месец след операцията.

И в двете групи се наблюдава лек спад във ФИ на първия час след операцията (средна ФИ 44,69% предоперативно; 44,26% на първи час), последвано от покачване при изписването и на 6-ия месец, където средната ФИ е 54,11%, като динамиката е еднаква за двете групи. Не се установява статистически значима разлика между двете групи във всички моменти на изследване. Съществува статистическа значима обратна корелационна

зависимост единствено между фракцията на изтласкване предоперативно и нивата на MDA на 12-ия следоперативен час само в групата на триметазидина.

VII. Изводи

1. Формираните групи са сравними според изходните им характеристики;
2. Коронарната хирургия с екстракорпорално кръвообращение и клампаж води до повишаване нивата на оксидативен стрес;
3. Следоперативната терапия с триметазидин редуцира оксидативния стрес, генериран по време на коронарна хирургия;
4. Следоперативната терапия с триметазидин не влияе на функционалния капацитет на миокарда;
5. Намалването на оксидативния стрес не е непременно свързано с подобряване на биохимичните и виталните показатели;
6. Приемът на триметазидин при коронарни пациенти може да намали периода на хоспитализация;
7. Извършените подселекции не показват влияние на изследваните фактори върху отчетените тенденции.

VIII. Приноси според автора

1. За пръв път в България е направено задълбочено научно проучване за ефекта на триметазида върху исхемичната реперфузионна увреда при on pump коронарна хирургия, въз основа на богат литературен обзор;
2. За пръв път са отчетени ефектите при приложение на триметазидин изцяло следоперативно при on pump коронарна хирургия;
3. Разработен е специален протокол за регистрация и следоперативно проследяване, както и система за измерване на човешки малондиалдехид;

4. Оценена е ефикасността на следоперативната терапия с триметазидин върху оксидативния стрес и функционалния капацитет на миокарда;
5. Направена е оценка на реалните ползи от следоперативното приложение на триметазидин.

IX. Библиография

- [1] Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol* 1978;10:641–68.
- [2] Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47:446–56.
- [3] Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res* 1987;61:757–60.
- [4] Shuter SL, Davies MJ, Garlick PB, Hearse DJ, Slater TF. Studies on the effects of antioxidants and inhibitors of radical generation on free radical production in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Free Radic Res Commun* 1990;9:223–32.
- [5] Chambers DJ, Braimbridge MV, Hearse DJ. Free radicals and cardioplegia: allopurinol and oxypurinol reduce myocardial injury following ischemic arrest. *Ann Thorac Surg* 1987;44:291–7.
- [6] Chambers DJ, Braimbridge MV, Hearse DJ. Free radicals and cardioplegia. Free radical scavengers improve postischemic function of rat myocardium. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1987;1:37–45.
- [7] Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, et al. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial “stunning” is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res* 1989;65:607–22.
- [8] Breisblatt WM, Stein KL, Wolfe CJ, Follansbee WP, Capozzi J, Armitage JM, et al. Acute myocardial dysfunction and recovery: a common occurrence after coronary bypass surgery. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1261–9.
- [9] Goodyear-Bruch C, Pierce JD. Oxidative stress in critically ill patients, *Am J Crit Care*, 2002, vol. 11 (pg. 543-51) Google Scholar PubMed WorldCat

- [10] Karu I, Taal G, Zilmer K, Pruunsild C, Starkopf J, Zilmer M. Inflammatory/oxidative stress during the first week after different types of cardiac surgery, *Scand Cardiovasc J*, 2010, vol. 44 (pg. 119-24) 10.3109/14017430903490981 Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat
- [11] Negi S, Sovari AA, Dudley SCJr. Atrial fibrillation: the emerging role of inflammation and oxidative stress, *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2010, vol. 10 (pg. 262-8) 10.2174/187152910793743850 Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat
- [12] Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease, *Nephrology*, 2012, vol. 17 (pg. 311-21) 10.1111/j.1440-1797.2012.01572.x Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat
- [13] Descamps-Latscha B, Drueke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy, *Semin Dial*, 2001, vol. 14 (pg. 193-9) 10.1046/j.1525-139X.2001.00052.x Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat
- [14] Jones DP. Redefining oxidative stress, *Antioxid Redox Signal*, 2006, vol. 8 (pg. 1865-79) 10.1089/ars.2006.8.1865 Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat
- [15] Case J, Ingram DA, Haneline LS. Oxidative stress impairs endothelial progenitor cell function, *Antioxid Redox Signal*, 2008, vol. 10 (pg. 1895-907)10.1089/ars.2008.2118 Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat
- [16] Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers, *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2009, vol. 46 (pg. 241-81) 10.3109/10408360903142326 Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat
- [17] Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, vol. 338 (pg. 668-76) 10.1016/j.bbrc.2005.08.072

Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat

[18] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J*, 2003, vol. 17 (pg. 1195-214) 10.1096/fj.02-0752rev

Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat

[19] Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis, *Mutat Res*, 2011, vol. 711 (pg. 193-201)10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016

Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat

[20] Watters JL, Satia JA, Kupper LL, Swenberg JA, Schroeder JC, Switzer BR. Associations of antioxidant nutrients and oxidative DNA damage in healthy African-American and White adults, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, vol. 16 (pg. 1428-36) 10.1158/1055-9965.EPI-06-1030

Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat

[21] Bulger EM, Maier RV. Antioxidants in critical illness, *Arch Surg*, 2001, vol. 136 (pg. 1201-7) 10.1001/archsurg.136.10.1201 Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat

[22] Ulus AT, Aksoyek A, Ozkan M, Katircioglu SF, Basu S. Cardiopulmonary bypass as a cause of free radical-induced oxidative stress and enhanced blood-borne isoprostanes in humans, *Free Radic Biol Med*, 2003, vol. 34 (pg. 911-7)10.1016/S0891-5849(03)00030-3 Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat

[23] Billings FTt, Ball SK, Roberts LJII, Pretorius M. Postoperative acute kidney injury is associated with hemoglobinemia and an enhanced oxidative stress response, *Free Radic Biol Med*, 2011, vol. 50 (pg. 1480-7) 10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.011 Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat

[24] Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, vol. 29 (pg. 427-31)10.1165/rcmb.F278 Google Scholar CrossrefPubMed

WorldCat

[25] Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury, *Cardiovasc Res*, 2000, vol. 47 (pg. 446-56) 10.1016/S0008-6363(00)00078-X Google Scholar CrossrefPubMed

WorldCat

[26] Visser J, Labadarios D, Blaauw R. Micronutrient supplementation for critically ill adults: a systematic review and meta-analysis, *Nutrition*, 2011, vol. 27 (pg. 745-58) 10.1016/j.nut.2010.12.009

Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat

[27] McDonald CI, Fung YL, Fraser JF. Antioxidant trace element reduction in an in vitro cardiopulmonary bypass circuit, *ASAIO J*, 2012, vol. 58 (pg. 217-22) 10.1097/MAT.0b013e31824cc856 Google Scholar

CrossrefPubMed WorldCat

[28] Tonelli M, Wiebe N, Hemmelgarn B, Klarenbach S, Field C, Manns B, et al. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis, *BMC Med*, 2009, vol. 7 pg. 25 10.1186/1741-7015-7-25 Google

Scholar CrossrefPubMed WorldCat

[29] Manzanares W, Dhaliwal R, Jiang X, Murch L, Heyland DK. Antioxidant micronutrients in the critically ill: a systematic review and meta-analysis, *Crit Care*, 2012, vol. 16 pg. R66 10.1186/cc11316

Google Scholar CrossrefPubMed WorldCat

[30] Ceconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Arch Biochem Biophys* 2003;420:217e21.

[31] Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 2002;33:575e86.

- [32] Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1685e96.
- [33] Pryor WA, Stanley JP. A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation (Letter). *J Org Chem* 1975;40:3615e7.
- [34] Frankel EN, Neff WE. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochim Biophys Acta* 1983;754: 264e70.
- [35] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81e128.
- [36] Hecker M, Ullrich V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis. *J Biol Chem* 1989;264: 141e50.
- [37] Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999;424:83e95.
- [38] VanderVeen LA, Hashim MF, Shyr Y, Marnett LJ. Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14247e52.
- [39] Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J Biol Chem* 2003; 278:31426e33.
- [40] Voitkun V, Zhitkovich A. Analysis of DNA-protein cross-linking activity of malondialdehyde in vitro. *Mutat Res* 1999;424:97e106.
- [41] Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 1994;14:605e16.

- [42] Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000;43:550e7.
- [43] Kantor PF, Lucien A, Kozak R, Lopaschuk GD. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res* 2000; 86: 580–8.
- [44] Stanley WC. Cardiac energetics during ischemia and the rationale for metabolic interventions. *Coron Artery Dis* 2001; 12(suppl 1): S3–7.
- [45] Lopaschuk GD. Optimizing cardiac energy metabolism: how can fatty acid and carbohydrate metabolism be manipulated? *Coron Artery Dis* 2001; 12(suppl 1):S8–11.
- [46] Williams FM, Tanda K, Kus M, William TJ. Trimetazidine inhibits neutrophil accumulation after myocardial ischaemia and reperfusion in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 828–33.
- [47] Lavanchy N, Martin J, Rossi A. Anti-ischemic effects of Trimetazidine: ³¹P-NMR spectroscopy in the isolated rat heart. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1987; 286: 97–110.
- [48] Fabiani JN, Ponzio O, Emerit I et al. Cardioprotective effect of trimetazidine during coronary artery graft surgery. *J Cardiovasc Surg* 1992; 33: 486–91.
- [49] Noble MI, Belcher PR, Drake-Holland AJ. Limitation of infarct size by trimetazidine. *Am J Cardiol* 1995; 76: 41B–4.
- [50] Drake-Holland AJ, Belcher PR, Hynd J, Noble IM. Infarct size in rabbits: a modified method illustrated by the effects of propranolol and trimetazidine. *Basic Res Cardiol* 1993; 88: 250–8.
- [51] Aussedat J, Ray A, Kay L, Verdys M, Harpey C, Rossi A. Improvement of long-term preservation of isolated arrested rat heart: beneficial effect of the antiischemic agent trimetazidine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21: 128–35.

- [52] Kober G, Buck T, Sievert H, Vallbracht C. Myocardial protection during percutaneous transluminal coronary angioplasty: effects of trimetazidine. *Eur Heart J* 1992; 13: 1109–15.
- [53] Sellier P, Audouin P, Payen B, Corona P, Duong TC, Ourbak P. Acute effects of trimetazidine evaluated by exercise testing. *Eur J Clin Pharmacol* 1987; 33: 205–7.
- [54] Détry JM. Clinical features of an anti-anginal drug in angina pectoris. *Eur Heart J* 1993; 14: 18–24.
- [55] Sellier P. The effects of trimetazidine on ergometric parameters in exercise-induced angina. Controlled multicenter double blind versus placebo study [in French]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1986; 9: 1331–6.
- [56] Passeron J. Effectiveness of trimetazidine in stable effort angina due to chronic coronary insufficiency. A double-blind versus placebo study [in French]. *Presse Med* 1986; 35: 1775–8.
- [57] Dalla Volta S, Maraglino G, della Valentina P, Viena P, Desideri A. Comparison of trimetazidine with nifedipine in effort angina: a double-blind crossover study. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; 4: 853–60.
- [58] Détry JM, Sellier P, Pennaforte S, Cokkinos D, Dargie H, Mathes P. Trimetazidine: a new concept in the treatment of angina. Comparison with propranolol in patients with stable angina. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 37: 279–88.
- [59] Monpère C, Brochier M, Demange J, Ducloux G, Warin JF. Combination of trimetazidine with nifedipine in effort angina. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; 4: 824–5.
- [60] Michaelides AP, Vyssoulis GP, Bonoris PE, Psaros TK, Papadopoulos PD, Toutouzas PK. Beneficial effects of trimetazidine in men with stable angina under beta-blocker treatment. *Curr Ther Res* 1989; 46: 565–76.
- [61] Michaelides AP, Spiropoulos K, Dimopoulos K, Athanasiades D, Toutouzas P. Antianginal efficacy of the combination of

trimetazidine-propranolol compared with isosorbide dinitrate-propranolol in patients with stable angina. *Clin Drug Invest* 1997; 13: 8–14.

[62] Levy S, and the group of South of France Investigators. Combination therapy of trimetazidine with diltiazem in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995; 76: 12B–16B.

[63] Manchanda SC, Krishnaswami S. Combination treatment with trimetazidine and diltiazem in stable angina pectoris. *Heart* 1997; 78: 353–7.

[64] Yellon, D.M. and Hausenloy, D.J. (2007) Myocardial Reperfusion Injury. *The New*

England Journal of Medicine, 375, 1121-1135.

<https://doi.org/10.1056/NEJMra071667>

[65] Braunwald, E. and Kloner, R.A. (1985) Myocardial Reperfusion: A Double-Edged

Sword. *The Journal of Clinical Investigation*, 76, 1713-1719.

<https://doi.org/10.1172/JCI112160>

[66] Rosenkranz, E.R. and Buckberg, G.D. (1983) Myocardial Protection during Surgical

Coronary Reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology*, 1, 1235-1246.

[67] Bolli, R. (1998) Basic and Clinical Aspects of Myocardial Stunning. *Progress in Car-*

diovascular Diseases, 40, 477-516.

[https://doi.org/10.1016/S0033-0620\(98\)80001-7](https://doi.org/10.1016/S0033-0620(98)80001-7)

[68] Park, J.L. and Lucchesi, B.R. (1999) Mechanisms of Myocardial Reperfusion Injury.

The Annals of Thoracic Surgery, 68, 1905-1912.

[69] Hoffman, J.W., Gilbert, T.B. and Poston, R.S. (2004) Myocardial Reperfusion In-

jury: Etiology, Mechanisms, and Therapies. *Journal of the ExtraCorporeal Technology*, 36, 391-411.

[70] Shernan, S.K. (2003) Perioperative Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Anesthesiology Clinics of North America*, 21, 465-485.

[https://doi.org/10.1016/S0889-8537\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0889-8537(03)00038-5)

[71] Schaper, W. and Schaper, J. (1997) Reperfusion Injury. *The Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 4, 113-116. <https://doi.org/10.1023/A:1017543727429>

[72] Ganz, P., Abben, R. and Barry, W. (1987) Dynamic Variations in Resistance of Coronary Arterial Narrowings in Angina Pectoris at Rest. *American Journal of Cardiology*, 59, 66-70. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(87\)80071-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(87)80071-1)

[73] Camici, P., Marraccini, P. and Lorenzoni, R. (1991) Metabolic Markers of Stress-Induced Myocardial Ischemia. *Circulation*, 83, 8-13.

[74] Barandier, C., Tanguy, S., Pucheu, S., Boucher, F. and De Leiris, J. (1999) Effect of Antioxidant Trace Elements on the Response of Cardiac Tissue to Oxidative Stress.

Annals of the New York Academy of Sciences, 874,138-155.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09232.x>

[75] Ide, T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., et al. (1999) Mitochondrial Electron Transport Complex I Is a Potential Source of Oxygen Free Radicals in the Failing Myocardium. *Circulation Research*, 85, 357-363. <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.4.357>

- [76] Ma, X., Gao, F., Lopez, B., Christopher, T. and Vinten-Johansen, J. (2000) Peroxynitrate, a Two-Edged Sword in Post-Ischemic Myocardial Injury: Dichotomy of Action in Crystalloid- versus Blood-Perfused Hearts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292, 912-920.
- [77] Das, D.K. and Maulik, N. (1994) Antioxidant Effectiveness in Ischemia-Reperfusion Tissue Injury. *Methods in Enzymology*, 233, 601-610.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33063-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33063-8)
- [78] Carden, D. and Granger, D. (2000) Pathophysiology of Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Pathology*, 190, 255-266.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200002\)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6)
- [79] Olson, E. (2004) A Decade of Discoveries in Cardiac Biology. *Nature Medicine*, 10, 467-474. <https://doi.org/10.1038/nm0504-467>
- [80] Wehrens, X.H.T., Lehnart, S.E. and Marks, A.R. (2005) Intracellular Calcium Release and Cardiac Disease. *Annual Review of Physiology*, 67, 69-98.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.114521>
- [81] Lehnart, S.E., Maier, L.S. and Hasenfuss, G. (2009) Abnormalities of Calcium Metabolism and Myocardial Contractility Depression in the Failing Heart. *Heart Failure Reviews*, 14, 213-224. <https://doi.org/10.1007/s10741-009-9146-x>
- [82] Yano, M., Yamamoto, T., Ikemoto, N. and Matsuzaki, M. (2005) Abnormal Ryano-

dine Receptor Function in Heart Failure. *Pharmacology & Therapeutics*, 107, 377-

391. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.003>

[83] Vinten-Johansen, J. (2003) Involvement of Neutrophils in the Pathogenesis of

Lethal Myocardial Reperfusion Injury. *Cardiovascular Research*, 61, 481-497.

<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.10.011>

[84] Engler, R.L., Dahlgren, M.D., Peterson, M.A., Dobbs, A. and Schmid-Schönbein,

G.W. (1986) Accumulation of Polymorphonuclear Leucocytes during 3h Experi-

mental Myocardial Ischemia. *American Journal of Physiology*, 251, H93-H100.

[85] Jordan, J.E., Zhao, Z. and Vinten-Johansen, J. (1999) The Role of Neutrophils in

Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Cardiovascular Research*, 43, 860-878.

[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00187-X)

[86] Szekely, A., Heindl, B., Zahler, S., Conzen, P. and Becker, B. (2000) Nonuniform

Behavior of Intravenous Anesthetics on Postischemic Adhesion of Neutrophils in

the Guinea Pig Heart. *Anesthesia & Analgesia*, 90, 1293-1300.

<https://doi.org/10.1097/00000539-200006000-00007>

[87] Budde, J.M., Morris, C.D., Velez, D.A., et al. (2004) Reduction of Infarct Size and

Preservation of Endothelial Function by Multidose Intravenous Adenosine during

Extended Perfusion. *Journal of Surgical Research*, 116, 104-115.

[https://doi.org/10.1016/S0022-4804\(03\)00356-1](https://doi.org/10.1016/S0022-4804(03)00356-1)

- [88] Verma, S., Fedak, P.W., Weisel, R.D., et al. (2002) Fundamentals of Reperfusion Injury for the Clinical Cardiologist. *Circulation*, 105, 2332-2336.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000016602.96363.36>
- [89] Kruzliak, P., Pechanova, O. and Kara, T. (2013) New Perspectives of Nitric Oxide Donors in Cardiac Arrest and Cardiopulmonary Resuscitation Treatment. *Heart Failure Reviews*, 19, 383. <https://doi.org/10.1007/s10741-013-9397-4>
- [90] Armstrong, J.S. (2006) The Role of the Mitochondrial Permeability Transition in Cell Death. *Mitochondrion*, 6, 225-234.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.07.006>
- [91] Lopaschuk, G.D., Barr, R., Thomas, P.D. and Dyck, J.R. (2003) Beneficial Effects of Trimetazidine in Ex Vivo Working Ischemic Hearts Are Due to a Stimulation of Glucose Oxidation Secondary to Inhibition of Long-Chain 3-Ketoacyl Coenzyme a Thiolase. *Circulation Research*, 93, e33-e37.
<https://doi.org/10.1161/01.res.0000086964.07404.a5>
- [92] Kantor, P.F., Lucien, A., Kozak, R. and Lopaschuk, G.D. (2000) The Antianginal Drug Trimetazidine Shifts Cardiac Energy Metabolism from Fatty Acid Oxidation to Glucose Oxidation by Inhibiting Mitochondrial Long-Chain 3-Ketoacyl Coenzyme a Thiolase. *Circulation Research*, 86, 580-588.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.86.5.580>
- [93] Guarnieri, C. and Muscari, C. (1993) Effect of Trimetazidine on Mitochondrial

Function and Oxidative Damage during Reperfusion of Ischemic Hypertrophied Rat Myocardium. *Pharmacology*, 46, 324-331.

<https://doi.org/10.1159/000139070>

[94] Harper, C., Clauser, P., Labrid, C., Freyria, J.L. and Poirier, J.P. (1989) Trimetazidine, a Cellular Anti-Ischemic Agent. *Cardiovascular Therapeutics*, 6, 292-312.

[95] Pantos, C., Bescond-Jacquet, A., Tzeis, S., et al. (2005) Trimetazidine Protects

Isolated Rat Hearts against Ischemia-Reperfusion Injury in an Experimental Timing-Dependent Manner. *Basic Research in Cardiology*, 100, 154-160.

<https://doi.org/10.1007/s00395-004-0505-4>

[96] Tritto, I., Wang, P., Kuppusamy, P., Giraldez, R., Zweier, J.L. and Ambrosio, G.

(2005) The Anti-Anginal Drug Trimetazidine Reduces Neutrophil-Mediated Car-

diac Reperfusion Injury. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46, 89-98.

<https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000164091.81198.a3>

[97] Danchin, N. (2006) Clinical Benefits of a Metabolic Approach with Trimetazidine in

Revascularized Patients with Angina. *American Journal of Cardiology*, 98, 8-13.

<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.07.003>

[98] Chen, Y.D., Zhao, L.K., Tian, F., et al. (2010) Evaluation of the Myocardial Protec-

tion of Trimetazidine during Percutaneous Coronary Intervention: A Multi-Center-randomised and Controlled Clinical Study. *Chinese Journal of Internal Medicine*,

49, 473-476.

- [99] Fabiani, J.N., Ponzio, O., Emerit, I., et al. (1992) Cardioprotective Effect of Trimetazidine during Coronary Artery Graft Surgery. *Journal of Cardiovascular Surgery*, 33, 486-491.
- [100] Aussedat, J., Ray, A., Kay, L., et al. (1993) Improvement of Long-Term Preservation of Isolated Arrested Rat Heart: Beneficial Effect of the Anti-Ischemic Agent Trimetazidine. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 21, 128-135.
<https://doi.org/10.1097/00005344-199301000-00019>
- [101] El-Banani, H., Bernard, M., Baetz, D., et al. (2000) Changes in Intracellular Sodium and pH during Ischemia-Reperfusion Are Attenuated by Trimetazidine. Comparison between Low- and Zero-Flow Ischemia. *Cardiovascular Research*, 47, 688-696.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00136-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00136-X)
- [102] Vendrinne, J.M., Vedrinne, C., Bompard, D., et al. (1996) Myocardial Protection during Coronary Artery Bypass Graft Surgery: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study with Trimetazidine. *Anesthesia & Analgesia*, 82, 712-718.
- [103] Martins, G.F., Siqueira-Filho, A.G., Santos, J.B.F., et al. (2011) Trimetazidine on Ischemic Injury and Reperfusion in Coronary Artery Bypass Grafting. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 97, 209-216.
<https://doi.org/10.1590/S0066-782X2011005000079>

- [104] Turnerir, B., Colak, O., Alatas, O., et al. (1999) Measurement of Troponin T to Detect Cardioprotective Effect of Trimetazidine during Coronary Artery Bypass Grafting. *Annals of Thoracic Surgery*, 68, 2173-2176.
[https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(99\)01126-1](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(99)01126-1)
- [105] Kuralay, E., Demirkiliç, U., Özal, E., Uzun, M. and Tatar, H. (1999) Myocardial Ischemia after Coronary Bypass: Comparison of Trimetazidine and Diltiazem. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*, 7, 84-89.
<https://doi.org/10.1177/021849239900700203>
- [106] Ruzyllo, W., Szwed, H., Sadowski, Z., et al. (2004) Efficacy of Trimetazidine in Patients with Recurrent Angina: A Subgroup Analysis of the TRIMPOL II Study. *Current Medical Research and Opinion*, 20, 1447-1454.
<https://doi.org/10.1185/030079904X2637>
- [107] Banach, M., Rysz, J., Zastonka, J., et al. (2005) The Cardioprotective Effect of Trimetazidine in Patients Undergoing Surgical Revascularization. *Russian Journal of Medicine*, 13, 1269-1271.
- [108] Iskesen, I., Saribulbul, O., Cerrahoglu, M., et al. (2006) Trimetazidine Reduces Oxidative Stress in Cardiac Surgery. *Circulation Journal*, 70, 1169-1173.
<https://doi.org/10.1253/circj.70.1169>
- [109] Lopatin, I.U.M. and Dronova, E.P. (2009) Clinical-Pharmacoeconomic Aspects of Trimetazidine Modified Release Use in Patients with Ischemic Heart Disease Un-

dergoing CABG. *Kardiologia*, 49, 15-21.

[110] Martins, G.F., Siqueira, F.A.G., Santos, J.B., et al. (2012) Trimetazidine and Inflammation

Response in Coronary Artery Bypass Grafting. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 99, 688-696. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2012005000066>

[111] Martins, G.F., Siqueira, F.A.G., Santos, J.B., et al. (2011) Trimetazidine and Cellular

Response in Cardiopulmonary Bypass. *World Journal of Cardiovascular Surgery*, 3,

171-179. <https://doi.org/10.4236/wjcs.2013.35035>

[112] Lei, H., et al. (2015) The Effectiveness of Preoperative Trimetazidine on Myocardial

Preservation in Coronary Artery Bypass Graft Patients: A Systematic Review and

Meta-Analysis. *Cardiology*, 131, 86-96. <https://doi.org/10.1159/000375289>

[113] Danchin, N., et al. (2011) Efficacy Comparison of Trimetazidine with Therapeutic

Alternatives in Stable Angina Pectoris; a Network Meta-Analysis. *Cardiology*, 120,

59-72. <https://doi.org/10.1159/000332369>

[114] Marzilli, M. and Klein, W.W. (2003) Efficacy and Tolerability of Trimetazidine in

Stable Angina: A Meta-Analysis of Randomized, Double-Blind, Controlled Trials.

Coronary Artery Disease, 14, 171-179.

<https://doi.org/10.1097/00019501-200304000-00010>

[115] Ciapponi, A., Pizzarro, R. and Harrison, J. (2005) Trimetazidine for Stable Angina.

Cochrane Database of Systematic Reviews, 4, Article ID: CD003614.

<https://doi.org/10.1002/14651858.cd003614.pub2>

[116] Kowal P, Chatterji S, Naidoo N, Biritwum R, Wu F, Lopez Ridaura R, Maximova T, Arokiasamy P,

Phaswana-Mafuya N, Williams SR, Snodgrass JJ, Minicuci N, D'Este C, Boerma JT. 2012. Cohort profile:

The WHO Study on global AGEing and adult health (SAGE). *Int J Epidemiol* 41: 1639-1649

[117]García-de-la-Asunción, J., Pastor, E., Perez-Griera, J., Belda, F. J., Moreno, T., García-del-Olmo, E., & Martí, F. (2013). Oxidative stress injury after on-pump cardiac surgery: Effects of aortic cross clamp time and type of surgery. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 18(5), 193-199. <https://doi.org/10.1179/1351000213Y.0000000060>

[118]Clermont G, Vergely C, Jazayeri S, Lahet JJ, Goudeau JJ, Lecour S, et al.. Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2002;96:80–7. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

[119]Ferrari R, Alfieri O, Curello S, Ceconi C, Cargnoni A, Marzollo P, et al.. Occurrence of oxidative stress during reperfusion of the human heart. *Circulation* 1990;81:201–11. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

[120] Castillo R, Rodrigo R, Perez F, Cereceda M, Asenjo R, Zamorano J, et al.. Antioxidant therapy reduces oxidative and inflammatory tissue damage in patients subjected to cardiac surgery with extracorporeal circulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;108:256–62. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

[121] Akila VP, D'souza B, Vishwanath P, D'souza V. Oxidative injury and antioxidants in coronary artery bypass graft surgery: off-pump CABG significantly reduces oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2007;375:147–52. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

- [122] Millar JE, Fanning JP, McDonald CI, McAuley DF, Fraser JF. The Inflammatory Response to Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO): A Review of the Pathophysiology. *Crit Care (London England)* (2016) 20(1):387. doi: 10.1186/s13054-016-1570-4 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- [123] McDonald CI, Fraser JF, Coombes JS, Fung YL. Oxidative Stress During Extracorporeal Circulation. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* (2014) 46(6):937–43. doi: 10.1093/ejcts/ezt637 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- [124]Benedict McDonaugh,Martin B. Whyte The Evolution and Future Direction of The Cardiac Biomarker. *EMJ Cardiol.* 2020;8[1]:97-106. <https://doi.org/10.33590/emjcardiol/20-00045>.

Х. Приложения

Приложение 1

Протоколи за регистрация и следоперативно проследяване

Протокол за регистрация

<i>Име:</i>	
<i>Възраст:</i>	
<i>Пол:</i>	<i>М</i> <i>Ж</i>
<i>Предоперативни данни</i>	
<i>ФИ</i>	
<i>СРК-МВ</i>	
<i>TrT</i>	
<i>МДА</i>	
<i>Захарен диабет</i>	
<i>АХ</i>	
<i>Оперативна интервенция:</i>	
<i>ЕКК</i>	
<i>Клампаж</i>	
<i>Брой байпаси</i>	
<i>Венозни графтове</i>	

Протокол за следоперативно проследяване

<i>Име:</i>	
<i>Възраст:</i>	
<i>Пол:</i>	М Ж
<i>Общ престой в R (часове)</i>	
<i>Общ болничен престой (дни)</i>	
<i>Обща кръвозагуба</i>	
ФИ	
<i>на 1-ви час</i>	
<i>при изписване</i>	
<i>на 6-ти месец</i>	
Серумни нива на СК-МВ	
<i>на 12-ти час</i>	
<i>на 6-ти месец</i>	
Серумни нива на TrT	
<i>на 12-ти час</i>	
<i>на 6-ти месец</i>	
Серумни нива на MDA	
<i>на 12-ти час</i>	
<i>на 1-ви месец</i>	
<i>на 6-ти месец</i>	

Приложение 2

ИЗМЕРВАНЕ НА ЧОВЕШКИ МАЛОНДИАЛДЕХИД(МДА) ПОСРЕДСТВОМ МЕТОДА НА ELISA

Определянето на Човешки Малондиалдехид(МДА) посредством ELISA кит е подходящо за in-vitro количествено откриване на естествен и рекомбинантен човешки МДА в човешки серум, плазма или клетъчни култури, като се използва с научна цел.

За целта се използва метода на двойният “сандвич“ от антитела. Принципът на тази техника се основава на характеристиките на целевия анализ (т.е. специфичното вещество, чието присъствие се анализира количествено или качествено) в течна проба по метод, който продължава да използва течни реактиви по време на анализ. Анализът представлява контролирана последователност от биохимични реакции, която ще генерира сигнал, който може лесно да бъде количествено определен и интерпретиран като мярка за количеството на анализа в пробата), който остава течен и остава в реакционната камера или добре необходим за поддържане на съдържащите се реагенти. Възможните Епитопи(антигенни детерминанти) могат да бъдат повече от два и могат да бъдат идентифицирани както от предварително покритото антитело за улавяне, така и от антитялото за откриване едновременно. Процесът е както следва:

1. Подготвя се повърхност, към която е свързано известно количество улавящо антитяло, като се блокират всички неспецифични места за свързване на повърхността. Плочата се измива, за да се отстрани несвързаният антиген.
2. Пробата, съдържаща целевия анализ се нанася върху плаката, което което довежда до това целевия анализ да бъде имобилизиран от анализ-специфичните улавящи антитела, като по този начин се

образува комплекса антиген-антитяло. Плаката отново се измива, за да се отстранят всички несвързани частици и примеси антитяло-ензим.

3. Добавят се биотин-белязани антитела, което е специфично за целевия анализ и води до сформирание на антитяло-антиген-антитяло комплекси. Отново измиване на плаката за премахване на всички примеси.
4. Следващата стъпка е добавяне на HRP (Хрянова пероксидаза) и авидин които се свързват с биотин-белязаните антитела. Количеството на горепосочения ензим корелира с количеството на целевия анализ в самата проба. Отново промиване на плаката.
5. Накрая се добавят субстрати за HRP реакцията, като след тази стъпка МДА концентрациите в пробите могат да бъдат изчислени от получените промени в оцветяването. Антителата могат да бъдат маркирани с множество молекули биотин, които могат да се свържат с HRP-Avidin и водят до множество HRP-антитяло комплекси. Това показва по-висока чувствителност и усилващи ефекти в сравнение с традиционните директни HRP-антитела.

Принцип на откриване на човешки МДА с ELISA кит

Както бе споменато по-горе, този комплект използва техниката ELISA с метода на двойният “сандвич“ от антитела. Предварително покритото антитяло е анти-човешко MDA моноклонално антитяло, докато антитялото за откриване представлява биотинилирано поликлонално антитяло.

Пробите и биотинилираните антитела се добавят в плаките на ELISA и се измиват с фосфат-буфериран физиологичен разтвор(PBS) или трисаминометан-буфериран физиологичен разтвор(TBS) след съответните

им добавяния в плаките. След това, авидин-пероксидазните конюгати се добавят към плаките.

Тетраметилбензидиновият (ТМВ) субстрат се използва за оцветяване, след като ензимният конюгат вече е напълно измит от плаките чрез PBS или TBS. ТМВ реагира и образува син продукт от пероксидазната активност, като след това се превръща в жълт, след добавянето на стоп-разтвора (цветен реактив С). Цветът, интензитетът и количеството на целевия анализ в пробата са положително корелирани.

Нужни материали за провеждане на изследването:

1. Четец на микроплаки с филтър за откриване с дължина на вълната 450nm, като по избор може да се добавят и филтри за корекция на дължината на вълната, с дължина 570nm или 630nm).
2. Апарат за промиване с регулируем обем на инжектиране, за да се гарантира, че всяка ямка от плаката получава 350µl без при това да се получи преливане.
3. Системи за биологична безопасност и аспиратори.
4. Високопрецизна едноканална пипета с обхват 0,5-10µl-20µl, 20-200µl, 200-1000µl).
5. Високопрецизна многоканална пипета (8 или 12, обхват от 50-300µl от).
6. 37 °C инкубатор.
7. Нискотемпературна центрофуга.
8. Хладилници с работна температура: 4 °C, -20 °C, -86 °C.
9. Аналитичен баланс.
10. Ножици, пинсети, клещи.
11. Плоча-миксер и нискочестотен осцилатор.

Необходими допълнителни материали:

1. Епрувети за центрофугиране (еместимост 1,5 ml, 5 ml и др.).
2. Накрайници за пипета за еднократна употреба (диапазон от 0,5-10 μ l-20 μ l, 20-200 μ l, 200-1000 μ l).
3. Дестилирана вода.
4. Координатна хартия.
5. Абсорбираща хартия.
6. EDTA, натриев цитрат, хепарин.

Събиране на пробите:

1. Моноветите за вземане на кръв трябва да са без пирогени и ендотоксини.
2. Не се препоръчва използването на хемолизирани или хиперлипидемични проби.
3. Пробите трябва да са прозрачни. Всички частици трябва да бъдат отстранени чрез центрофугиране.
4. Ако събраните проби не се изработват на момента на взимането, те трябва да бъдат разделени и съхранени в замразено състояние при температури -20-80 °C, като задължително се избягва повторно замразяване-размразяване.
5. Оптимизацията на разреждането на пробата често е необходима за правилното разделяне на пробата в рамките на стандартната крива. Винаги се препоръчва да се извършват предварителни експерименти, преди провеждането на по-голямата част от пробите, с цел преценка дали трябва да бъде извършено оптимизиращо разреждане на пробите.
6. Препоръчително е да се съберат достатъчно проби за провеждане на множество тестове, с цел предотвратяване на загуба на данни.

7. За безопасността на всички участващи в събирането на пробите и тяхната изработка, препоръчително е да се работи със защитни материали: ръкавици, манти, респиратори и др.). Също така, всички участващи трябва да са наясно с всички потенциални рискове, свързани с боравенето на пробите.
8. Обработката на пробите трябва да се извършва в помещение оборудвано с адекватна биологична безопасност.

Приготвяне на пробите:

1. Серум: Събраната кръв се поставя в хладилник при 4 °C за една нощ. След това се центрофугира за 10 минути при 1000-3000 об/мин. Супернатантът се взима и се тества незабавно, или пробите се поставят в хладилник при -20 °C / -80 °C за съхранение. Съхранението може да продължи 1-3 месеца.
2. Плазма: Като антикоагуланти се използват EDTA, натриев цитрат или хепарин и се добавят към плазмата. Смесват се добре. Сместа се центрофугира за 10 минути при 1000-3000 об/мин. Отново, супернатанта може да се тества незабавно, или пробите се съхраняват в хладилник при -20 °C / -80 °C. Съхранението може да продължи 1-3 месеца.
3. Тъканен хомогенат: Тъканните късчета се измиват в 0,01M PBS. Добавя се реагент за екстракция на тъканни протеини в съотношение 1g до 5-10mL и се разбърква на ледена баня. След достатъчно хомогенизиране се продължава с центрофугиране за 10 минути при 5000-10000 об/мин. Взима се супернатанта и се тества незабавно. Пробите също могат да бъдат съхранявани като по гореописания начин.

Ограничения на теста:

1. Не се допуска повторното замразяване на веднъж размразените проби.
2. При разклащане/обръщане на тубите от комплекта по време на транспорта, може да се наложи центрофугиране за да се консолидира съдържащия се в него материал. Тубите трябва да се разклатят ръчно или да се центрофугират за 1 минута при 1000 об/мин, за да се събере целият материал на дъното.
3. Концентрираният измиващ буфер понякога може да кристализира. При тези случаи се използва водна баня което подобрява разтварянето по време на процеса на разреждане. При приготвянето на измиващия буфер, кристалите трябва да бъдат напълно разтворени.
4. Използват се само реагенти, които се доставят директно с този комплект. Смесването на различни партии не е препоръчително.
5. Важно е да сме сигурни, че реагентите са добре смесени. Адекватното смесване на реактивите в микроплаката е особено важно за получаване на точните резултати от тестовете. Препоръчително е използването на микроосцилатор, работещ на най-ниската честота. При липсата на такъв, микроплаката се разклаща ръчно с кръгови движения за 1 минута.
6. Преди началото на тестването, китът трябва да е приведен до стайна температура.
7. Неизползваните ленти от микроплаките могат да се съхраняват на температура 2-8 °C, при условие, че лентите ще се използват в сравнително кратък срок.
8. Излагането на хромогенния реагент на светлина е противопоказано, тъй като е чувствителен към светлина.

9. Когато се използва ELISA четец с двойна дължина на вълната, същата трябва да бъде настроена на 450nm и 630nm.
10. Добавянето на пробата винаги трябва да се извършва с пипета или подобен инструмент. Калибрирането на апарата преди провеждане на тестирането е задължително, за избягване на експериментални грешки.
11. Проби, съдържащи NaN_3 не могат да бъдат тествани поради инхибиращия му ефект върху активността на ензима HRP.
12. Хемолизираните проби могат да покажат фалшиво положителни резултати, и използването им не е удачно.
13. По време на тестването, влажността на въздуха трябва да е не по-висока от 60%.
14. Редовната проверка и калибриране на термостата е важна за нужната стабилна температура на инкубация (37°C).

Подготовка за тестирането:

1. ELISA китовете се изваждат от хладилника поне 20 минути преди началото, и тестирането започва след като китовете достигнат стайна температура.
2. Концентрирания измиващ буфер се разрежда с двойно дестилирана вода в съотношение 1:25.
3. Стандарт: Добавя се 1ml разредител към лиофилизирания стандарт и се оставя да престои 30 минути. След като стандартът е напълно разтворен, миксира се и се маркира с етикет върху епруветката. Препоръчва се да се използват следните концентрирани стойности за стандартната крива: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 nmol/ml. Преди да се продължи към следващата стъпка, важно е да се уверим, че лиофилизираният стандарт е напълно разтворен и добре миксиран.

4. Легенда за метода за разреждане на пробата: Вземат се 7 чисти епруветки и се маркират с концентрациите им (50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0 nmol / ml). Добавят се 300 μ L стандартен разредител във всяка епруветка. С пипета се взимат 300 μ l разредител от разтворения стандарт и се добавят към епруветката с етикет 50 nmol / mL и се миксира добре.
5. Отново с пипета се отделят 300 μ l разредител от епруветката с 50 nmol/mL , и се добавят към епруветката с етикет 25 nmol/ml, като се смесват добре. Горепописаната стъпка се повтаря до епруветката отбелязана с етикет 1,56 nmol/mL. Стандартният разредител в епруветката 0 nmol/mL е отрицателната контрола. Пригответият разтвор (100 nmol/mL) трябва да се изхвърли след провеждане на тестирането - тъй като не може да бъде използван отново.
6. Биотинилирано антитяло: Взима се разтвор на биотинилирано антитяло, и се разрежда с разредител за антитела в съотношение 1: 100. По-горе обяснената процедура трябва да се проведе 30 минути преди началото на тестването. Не се препоръчва повторното използване на вече пригответия разтвор за нови изследвания на по-късен етап.
7. Ензимен конюгат: Взима се разтвор на ензимен конюгат, и се разрежда с ензимен разредител в съотношение 1: 100. По-горе обяснената процедура трябва да се проведе 30 минути преди началото на тестването. Не се препоръчва повторното използване на вече пригответия разтвор за нови изследвания на по-късен етап.
8. Цветен реактив: Разтворът за цветния реактив се приготвя 30 минути преди началото на тестирането, в съотношение 9: 1 за цветен реактив А и цветен реактив Б, съответно.

Начин на промиване:

1. Автоматично промиване: Необходимото количество измиващ буфер е около 350µl, като интервалите на впръскване и премахване трябва да бъдат между 20 и 30 секунди.
2. Ръчно промиване на плаката: добавя се около 350µl измиващ буфер във всяка ямка и оставете да престои 30сек. Плаката се разклаща, за да отстрани възможно най-голямо количество течност. Ако това е недостатъчно, плаката допълнително се подсушава с абсорбираща хартия. При ръчното промиване възможността за замърсяване на пробите е значително по-голяма и трябва да се обърне повече внимание за предотвратяването му.

Стъпки за провеждане на теста:

1. Изваждат се желаните броя ELISA плаки за тестване и се оставят да се адаптират на стайна температура. Останалите се поставят обратно и се запечатват в специалната алуминиевата торбичка от сета, за съхранение при 2-8 °C.
2. Празните ямки се слагат настрана (ако се тества с използване на двойна дължина на вълната, празните ямки се игнорират).
3. Добавят се пробите към съответните ямки (100 µl за всяка ямка). Ямките или цялата плака се запечатва със самозалепяща се лента от кита. Плаките се инкубират на 37°C за 90 минути.
4. Предварително се подготвя необходимото количество биотинилирано анти тяло (поне 30 минути).
5. Измиване на ELISA плаката 2 пъти.
6. Добавя се приготвеното биотинилирано анти тяло към всяка ямка(100µL на ямка). Ямките се запечатват с ленти и се инкубират на 37°C за 60 минути.

7. Предварително се приготвя необходимото количество ензимен конюгат (поне 30 минути).
8. 3-кратно промиване на ELISA плаките.
9. Добавя се предварително приготвения ензимен конюгат към всички ямки, без празните (100 μ L на ямка). Ямките се запечатват с ленти и се инкубират на 37°C за 30 минути.
10. 5-кратно промиване на ELISA плаките.
11. Добавят се 100 μ L от приготвения цветен реактив към отделните ямки и се инкубират защитени от светлина при 37 °C. Когато оцветяването на най-високо стоящите проби стане по-тъмно и се появи цветен градиент, процеса на инкубация може да бъде спряен. Хромогенната реакция трябва да бъде контролирана в рамките на 30 минути.
12. Добавя се цветен реактив С (стоп-реактив) към всяка ямка. Смесва се добре. Получените данни от OD (оптичната плътност) се отчитат в рамките на 10 минути.

Определяне на резултатите:

1. От получените стойности на OD за всяка проба трябва да се извадят стойностите получени от празните ямки.
2. Стандартната крива се чертае ръчно. Стойностите на пробите се отбелязват като X- а тези от OD се нанасят като Y-координати. Използва се гладка линия, за да се свърже всяка координата със стойностите от пробите. Концентрацията на пробите може да бъде намерена чрез въвеждане на стойностите на OD на пробата в линейното уравнение за стандартната крива. За максимално точен анализ и изчисляване на резултатите се препоръчва използването на професионален софтуер за криви (на пример Curve Expert 1.3).

3. Ако стойността на OD на пробата е по-висок от този на най-високия стандарт в стандартната крива, пробата трябва да бъде допълнително разреждана и анализът да бъде повторен. Резултатите се умножават по коефициента на разреждане, когато се изчислява неизвестното.

Обобщение на оперативните процедури:

Стъпка	Обобщение
1	Приготвяне на реактивите, пробите и стандартите.
2	Добавят се приготвените проби и стандарт и се инкубират при 37 °C за 90 минути.
3	Двукратно измиване. Добавяне разтвор на биотинилирано антитяло и инкубиране при 37 °C за 60 минути.
4	Трикратно измиване. Добавяне на ензимния работен разтвор и инкубиране при 37 °C за 30 минути.
5	Петкратно измиване. Добавяне на разтвора за цветен реагент и инкубиране при 37 °C до 30 минути.
6	Добавяне на цветния реактив С.
7	Използване на четец на микроплаки, за измерване на OD в рамките на 10 минути след добавянето на цветния реактив С.
8	Изчисляване на съдържанието на тестваните проби.