

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН**

**ДЕСО**

---

**МАРГАРИТА ЛЮБОМИРОВА АЛЕКСАНДРОВА**

**ВЪЗПАЛЕНИЕ И ОКСИДАТИВЕН СТРЕС ПРИ СТАРЕЕНЕ И  
ВЪЗРАСТОВО-ОБУСЛОВЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на научната степен

„ДОКТОР НА НАУКИТЕ”

**Официални рецензенти:**

Проф. Д-р Стефан Костянев, дмн

Проф. Атанас Кръстев, дбн

Проф. Д-р Иван Петров, дмн

Плевен

2012

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен научен съвет на ДЕСО.

Дисертационният труд съдържа 383 страници, 74 фигури и 22 таблици.

Библиографската справка включва 817 заглавия, от които 7 са на кирилица и 810 - на латиница.

## СЪДЪРЖАНИЕ

Предговор .....	6
<b>МОТИВАЦИЯ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА НАУЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ .....</b>	<b>10</b>
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>11</b>
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Клиничен материал .....</b>	<b>13</b>
Клинично-зdravi лица – критерии за подбор .....	13
Пациенти с инсулт .....	13
Пациенти с исхемичен инсулт – критерии за подбор .....	13
Пациенти с хеморагичен инсулт – критерии за подбор .....	14
Оценка на неврологичното състояние на болните с инсулт .....	14
Пациенти с артериална хипертония и диабет – критерии за подбор.....	15
<b>2. Използвани методи .....</b>	<b>15</b>
Колектиране на кръв и урина .....	15
Определяне серумното ниво на С-реактивен протеин .....	16
Хемилуминесцентно оценяване на продукцията на активни форми на кислорода от периферни фагоцити .....	16
Оксидативна активност на плазмата .....	18
Компоненти от антиоксидантната система за защита .....	18
Активност на супероксид дисмутаза в еритроцити .....	18
Обща каталазна активност на кръвта .....	18
Обща глутатион-пероксидазна активност на кръвта .....	18
Обща концентрация на сулфхидрилни групи в кръвта .....	18
Общ антиоксидантен статус на серума .....	18
Степен на оксидативно увреждане .....	18
Липидни хидропероксиди в плазма и серум .....	18
Реактивни съединения на тиобарбитуровата киселина в кръвта .....	18
Статистически анализ .....	18
<b>СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>20</b>
<b>1. Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта при стареене .....</b>	<b>20</b>
Възрастово-обусловени промени в спонтанната и стимулирана оксидативна активност на периферни фагоцити .....	20
Възрастово-обусловени промени в митохондриалната продукция на супероксид от стимулирани периферни фагоцити в цялостна кръв .....	23
Възрастово-обусловени промени в антиоксидантния статус на периферната кръв ..	26
Степен на оксидативно увреждане .....	27
Взаимовръзка между измерените показатели .....	28
Фагоцитната митохондриална продукция на супероксид и активността на	

CuZn SOD намаляват при стари хора .....	28
Полово-специфични различия в антиоксидантния статус на кръвта на здрави лица на пострепродуктивна възраст .....	30
<b>2. Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта при остър исхемичен инсулт .....</b>	<b>32</b>
Оксидативна активност на периферни фагоцити .....	32
C-реактивният протеин – индикатор за тежестта на неврологичния дефицит .....	40
Компоненти от антиоксидантния капацитет на периферната кръв .....	42
Степен на оксидативно увреждане .....	44
Комплексните взаимоотношения между възпалението и съдовите рискови фактори определят когнитивните нарушения през острия стадий на исхемичен инсулт.....	44
<b>3. Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта при остър хеморагичен инсулт .....</b>	<b>47</b>
Оксидативна активност на периферни фагоцити .....	47
C-реактивният протеин – индикатор за клинична тежест и изход .....	50
Компоненти от антиоксидантния капацитет на периферната кръв.....	52
Степен на оксидативно увреждане .....	53
Независими прогностични фактори за инвалидизация и леталитет .....	55
<b>4. Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта в хроничния стадий на мозъчен инсулт .....</b>	<b>60</b>
Оксидативна активност на периферни фагоцити .....	60
Компоненти от антиоксидантния капацитет на периферната кръв .....	61
Степен на оксидативно увреждане .....	63
Независими предиктори за инвалидизация и клиничен изход .....	63
<b>5. Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта на лица с артериална хипертония и диабет. Съпоставка с болни с остър хеморагичен инсулт .....</b>	<b>68</b>
<b>ОБСЪЖДАНЕ .....</b>	<b>76</b>
<b>ИЗВОДИ .....</b>	<b>113</b>
<b>ПРИНОСИ .....</b>	<b>117</b>
<b>СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И СЪОБЩЕНИЯТА ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>119</b>
<b>ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>121</b>

## НАЙ - ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

AA – арахидонова киселина  
ACR – отношение албумин/креатинин  
CRP – С-реактивен протеин  
CTS – каталаза  
DAG – диацилглицерол  
DNA – дезоксирибонуклеинова киселина  
F<sub>c</sub> – кристализиращ фрагмент  
fMLP – формил-метионил-левцил-фенилаланин  
GCS – Glasgow кома скала  
CHL – холестерол  
GLU – кръвна глюкоза  
GOS – Glasgow скала за изход  
GSH – редуциран глутатион  
GSH-Px – глутатион-пероксидаза  
HDL – липопротеини с висока плътност  
IL – интерлевкин  
IP<sub>3</sub> – инозитолтрифосфат  
LCL – луминолова хемилуминесценция  
LDL – липопротеини с ниска плътност  
LgCL – лудигенинова хемилуминесценция  
LTB<sub>4</sub> – левкотриен B<sub>4</sub>  
MAPK – митоген-активирани протеин кинази  
MDA – малонов диалдехид  
MMSE – скала за оценка на глобалната когниция  
MPO – миелопероксидаза  
mRS – модифицирана скала на Rankin  
MSS – инсултна скала по Mathew  
NADPH – редуцирана форма на никотинамид аденин динуклеотид фосфат  
NADP<sup>+</sup> – окислена форма на никотинамид аденин динуклеотид фосфат  
NaN<sub>3</sub> – натриев азид  
NF-κB – нуклеарен фактор капа B  
NMDA – N-метил-D-аспартат  
nNOS – невронална синтаза на NO<sup>•</sup>  
PLT – тромбоцити  
PKC – протеин киназа C  
PMA -форбол мирилат ацетат  
RBC – червени кръвни клетки  
ROS – активни форми на кислорода  
SH – сулфхидрилни групи  
sICH – спонтанен интрацеребрален кръвоизлив  
SOD – супероксиддисмутаза  
TAS – общ антиоксидантен статус  
TBA – тиобарбитурова киселина  
TBARM – реактивни съединения на тиобарбитуровата киселина  
TNF – туморен некротичен фактор  
WBC – бели кръвни клетки

## Предговор

В живите организми непрекъснато протичат свободно-радикални процеси. Потенциално вредни активни форми на кислорода (ROS) се образуват по време на нормалния кислороден метаболизъм. Завишена продукция на ROS съпровожда множество процеси в биологичните системи, в частност процеси, възникващи при въздействие с йонизираща радиация, замърсители на околната среда, хипероксия, хипоксия, фагоцитна клетъчна активност и катализирани от оксидази реакции. Поради високата химична реактивоспособност на радикалите и техните интермедиенти, различни компоненти на организма постоянно претърпяват химични промени по един повече или по-малко случаен начин. Интензивността на оксидативните процеси в организма се контролира от ензимни и неензимни антиоксиданти, които могат да неутрализират образуваните ROS или да предотвратят тяхното образуване. Нещо повече, клетките са екипирани допълнително и с ензимни системи, отстраняващи възникнало оксидативно увреждане (т. нар. репаративни ензими). В норма, процесите на образуване на ROS в живите системи са балансирани от процесите, водещи до тяхната елиминация. За съжаление защитната антиоксидантна система на организма не е съвършена и при определени условия може да възникне състояние на дисбаланс, известно като оксидативен стрес. Оксидативният стрес е относително ново понятие, което напоследък се използва често в биомедицинските научни среди. Смята се, че той в значителна степен участва в патофизиологичните механизми на стареенето и болестни състояния като инсулт, диабет, хипертония, атеросклероза, невродегенеративни заболявания и пр.

Населението на планетата застарява в световен мащаб. През 2006 г. почти 500 милиона души по света са били на възраст по-голяма от 65 години. До 2030 г. се очаква тази цифра да нарастне на 1 милиард. През следващите 10-15 години, заболяемостта и смъртността сред възрастното население ще се дължат главно на хронични заболявания, в частност сърдечно-съдови нарушения, рак и диабет (*Publication No 07-6134, 2007*). Затова трябва да бъдат положени специални усилия в посока превенция на възрастово-обусловените заболявания.

Предполага се, че организмът на възрастните се намира в състояние на оксидативен стрес. Оксидативният стрес предизвиква увеличение на нивото на окислени протеини, липиди и нуклеинови киселини в клетките и може да обуслови нарушаването на редица биологични функции, в частност загуба на физическа активност, когнитивен дефицит и редуциран

метаболически интегритет. Механизмите, лежащи в основата на такива възрастови проявки са сложни и многофакторни. Има данни за ролята на ROS и оксидативния стрес като фактори, определящи продължителността на живот на видовете. Предполага се също така, че оксидативното увреждане на митохондриалните ензими и на самия митохондриален геном е в основата на редица възрастово-обусловени дегенеративни процеси. От друга страна се натрупват доказателства, които сочат ROS като специфични сигнални молекули при физиологични условия. Предстои да се преосмислят съществуващите теории на стареенето и да се отговори на въпроса дали ROS са само периферна мишена, която корелира с продължителността на живот на организмите или са централни регулатори в процесите на стареене.

През последните десетилетия в научната литература бе отделено специално внимание на биологичните ефекти на високо-реактивните ROS в патофизиологичните механизми на редица болестни състояния. Мозъчният инсулт е комплексно заболяване, възникващо и развиващо се на фона на генетична предиспозиция и взаимодействие между различни рискови фактори, хронично увреждащи кръвоносните съдове. Инсултът е водеща причина за смърт и дълготрайна инвалидизация на населението в индустриализираните страни. Всяка година  $\approx 15$  милиона души в света получават нов или повторен инсулт (*Stroke statistics, World Health Organization 2010*). От тях 5 милиона души умират и 5 милиона остават трайно инвалидизирани. Основен приоритет на фундаменталните и клинични науки е търсенето на ефективно лечение на болните с инсулт. Многобройните изследвания, публикувани в литературата показват, че инсултът е заболяване, подлежащо на лечение в хиперактивна фаза, но това лечение е с ограничена ефективност. Те обезпечават оптимизъм за създаване на нови терапии, целящи подобряване на функционалния изход на болните и тяхното възстановяване. От друга страна, лица, преживели инсулт, са с повишен риск от възникване на нов съдов инцидент. Това е проблем със значими социални и икономически последици, тъй като понастоящем в света има повече от 50 милиона лица, преживели инсулт. Затова усилията при болните с инсулт трябва да бъдат насочени не само към стимулация на възстановяващите механизми, но също и към редуциране на вероятността за възникване на последващи мозъчно-съдови инциденти.

Оксидативният стрес вероятно е един от механизмите, участващи в патофизиологичните последици на инсулта. Предполага се, че той

допринася за възникването и задълбочаването на мозъчното увреждане чрез различни взаимосвързани механизми: ексцитотоксичност, предизвикваща активиране на ензими и образуване на ROS; възпаление, водещо до праймиране и активиране на левкоцити и съпроводено със свръхпродукция на радикали; активиране и оксидативно увреждане на съдовия ендотел, съпроводено с намалена бионаличност на азотен оксид; хиперхомоцистеинемия, медирана от свободни радикали; пероксидация на плазмени и клетъчни липиди, включително тези в артериалната стена и пр. Напоследък в литературата се дискутира съществуването на нови, ROS-медиранни пътища в деструктивната каскада на инсулта, предразполагащи към възпаление и съдова оклузия. Идентифицирани са оксидативни процеси, предизвикващи образуването на модулатори на клетъчната апоптоза и нейните субстрати. Изследването на ролята на оксидативния стрес при инсулт се усложнява от комплексността на протичащите събития и сложните взаимодействия между тях, обусловени от наличието на прави и обратни връзки. Продължават да се търсят нови оксидативни маркери за тежестта на неврологични дефицит и клиничен изход. Количествени индекси на оксидативен стрес биха могли да се използват и като критерий за подбор на пациентите, които да бъдат включени в клиничните изследвания. Хроничният стадий на инсулта, от своя страна, също предоставя възможности както за възстановителна терапия, така и за профилактика, целяща редуциране на вероятността от възникване на последващи мозъчно-съдови инциденти. По-доброто разбиране на ролята на рисковите фактори за инсулт, разработването на оптимални методи за редукция на риска от повторен инсулт и инкорпорирането на първичната и вторичната превенция в клиничната практика вероятно ще доведе до подобряване на клиничния изход на болните. Все повече се затвърждава мнението, че лечението на болните с инсулт в остър и хроничен стадий трябва да е комбинирано предвид комплексността на протичащите патологични процеси. Въздействието върху оксидативните процеси обаче трябва да се провежда внимателно, тъй като има звена, които се регулират от оксидативни механизми и дезактивирането им може да има обратен ефект - потенциране или задълбочаване на процесите, водещи до клетъчна смърт.

Сред съдовите рискови фактори, диабетът и хипертонията са водеща причина за сърдечно-съдови и мозъчно-съдови заболявания. През последните години смъртността от диабет нараства бързо в световен мащаб, като тя се увеличава двукратно при наличие и на хипертония. По-



принцип, хипертонията и диабетът се съпровождат и с други съдови рискови фактори като микроалбуминурия, затлъстяване, дислипидемия, хиперкоагулабилитет и увеличен възпалителен статус. Всички те в крайна сметка водят до развитието на съдово заболяване, което е основната причина за преждевременната смърт на пациентите. Епидемиологичните изследвания обезпечават доказателства за наличието на общи звена в патофизиологията на двете заболяванията. Инсулиновата резистентност, възпалението и свръхпродукцията на ROS, резултираща в ендотелна дисфункция, увеличената тъканна ренин-ангиотензин-алдостеронова система и повишената активност на симпатиковата нервна система се смятат за участници в комплексната патофизиология на диабета и хипертонията. Публикувани данни сочат, че диабетът и хипертонията могат да ускорят атеросклеротичния процес и да увеличат честотата от съдов инцидент.

Атеросклерозата е основна причина за леталитет при възрастните, тъй като тя е в основата на повечето съдови заболявания. Свръхпродукцията на ROS допринася за възникването на ендотелна дисфункция посредством консумирането на азотен оксид и образуването на пероксинитрит. Много от проатерогенните действия на ROS възникват посредством образуване на окислени липопротеини с ниска плътност (LDL). Освен акумулиране и окисление на LDL в субендотелното пространство, атерогенезата включва още процеси, като експресия на адхезионни молекули и хемоатрактанти, адхезия на периферни левкоцити, образуване на пенести клетки, продукция на провъзпалителни медиатори и пролиферация на определени клетъчни типове. Тъй като повечето от тези процеси се модулират от ROS, антиоксидантна суплементация може да има протективен ефект при атеросклерозата. Клиничните проучвания обаче не дават убедителни доказателства в тази насока и използването на антиоксиданти за лечение на атеросклероза остава отворен въпрос.

В настоящето проучване е разгледана потенциалната роля на възпалението и оксидативния стрес при стареене и някои болестни нарушения. Статусът на компоненти от антиоксидантната защита на кръвта е изследван симултантно с активността на периферни фагоцити да образуват радикали и нивата на маркери за възпаление и оксидативно увреждане в циркулацията. Въз основа на експериментални резултати е оценена взаимовръзката между прооксиданти и антиоксиданти в периферната кръв при стареене, а при болестни нарушения е търсена връзка между оксидативния стрес и патологичните изменения.

Предложени са провъзпалителни и оксидативни маркери за тежестта на инсулта, клиничния изход и прогнозата на болестния процес. Анализът на данните сочи съществуването на деликатен баланс между оксиданти и прооксиданти, които са свързани по вътрешно-зависим начин. Затова най-вероятно няма да може да се постигне забавяне на стареенето и лечение на възрастово-обусловените заболявания чрез механична редукция на интензивността на оксидативните процеси. Необходимо е преди всичко да се задълбочат познанията ни относно ролята и взаимната връзка между компонентите, определящи про/антиоксидантния статус на организма с цел изработването на комплексна стратегия в борбата за редуциране на скоростта на стареенето и свързаните с него патологични изменения.

### **МОТИВАЦИЯ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА НАУЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ**

Докладваните в литературата резултати относно мястото и ролята на възпалението и оксидативния стрес в процесите на стареене са нееднозначни. Причина за това може да е фактът, че оксидативният статус на организма е комплексна и вариабилна величина, която зависи от много фактори, в това число физиологичното състояние на индивида, генетичните му особености, диетата, качеството на живот и фактори на околната среда. Анализът на литературните данни показва, че при стареене остават неизяснени редица въпроси:

1. Въпреки публикуваните данни, че функцията на фагоцитите се влошава с възрастта и е фактор за имунно стареене, малко е известно за молекулната база на възрастово-обусловената фагоцитна функционална алтерация. Нещо повече, обобщени заключения за продукцията на ROS от клетките се правят въз основа използването на методи, които по различен начин отразяват и не винаги разграничават продукцията на ROS между извън- и вътреклетъчната среда.

2. Малко са данните относно ефекта на възрастта върху кинетиката на процеса на радикалообразуване от клетките. Няма симултанни проучвания на възрастово-обусловените промени в кинетиката на спонтанната и стимулираната обща и екстрацелуларна ROS генерация от периферни фагоцити.

3. Публикуваните данни за статуса на ключови антиоксидантни ензими и показатели за оксидативно увреждане в циркулацията на възрастните са противоречиви. Доколкото ни е известно няма работи, в които едновременно да е изследвана скоростта на радикалообразуването от периферни фагоцити, параметри от антиоксидантния потенциал на

организма и показатели за степента на оксидативно увреждане в циркулацията.

4. Ограничена е наличната информация за полово-обусловените различия в про/антиоксидантния статус на кръвта на лица в пост-репродуктивна възраст.

От друга страна, мозъчният инсулт като възрастово-обусловено критично състояние на организма създава условия за праймиране на периферните левкоцити и възникване на оксидативен стрес със завишен морбиден и мортален риск за пациентите. Анализът на литературните данни показва, че при инсулт има неизяснени редица въпроси:

1. Как се променя оксидативната активност на периферните фагоцити и по-специално екстрацелуларното образуване на ROS през различните фази на инсулта – остра и хронична?

2. Има ли връзка между фагоцитната оксидативна активност и процесите на липидна пероксидация? Свързани ли са те с тежестта на неврологичния дефицит, инвалидизирането на пациентите и тяхното възстановяване?

3. Наблюдава ли се разлика във фагоцитната оксидативна активност между болните и контролата при различен вид стимулация на клетките?

4. Какъв е статусът на антиоксидантния капацитет на кръвта при инсулт и каква е връзката му с тежестта на неврологичния дефицит и степента на мозъчното увреждане?

5. Каква е ролята на възпалението и оксидативния стрес по отношение прогнозата за тежестта на неврологичното увреждане и смъртен изход?

6. Каква е ролята на възпалението и оксидативния стрес по отношение задълбочаването на съдовите увреждания на лица със съдови рискови фактори без съдов инцидент.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Във връзка с нерешените въпроси ние си поставихме за цел да проучим активността на периферните фагоцити за образуване на ROS при различни видове стимулация на клетките и локализация на радикалообразуването, нивата на молекулни маркери на възпаление, състоянието на антиоксидантния потенциал и нивото на липидна пероксидация на кръвта при клинично здрави лица като функция на възрастта, както и при болни след прекаран мозъчен инсулт (исхемичен и хеморагичен) в остър и хроничен стадий. Наша цел също така бе да потърсим надеждни маркери за инвалидизация и леталитет на болните с

инсулт, както и да изследваме про/антиоксидантния статус на кръвта на лица със съдови рискови фактори, но без съдов инцидент.

За постигане на целта бяха поставени за изпълнение следните задачи:

1. Да се апробира подход за изследване активността на праймирани периферни фагоцити.

2. Симултантно да се регистрира и анализира кинетиката на процеса на радикалообразуване от периферни фагоцити като функция на възрастта, като се отчита локализацията на образуваните ROS.

3. Да се изучат промените с възрастта в митохондриалната продукция на супероксид от стимулирани периферни фагоцити.

4. Да се проучи състоянието на компоненти от антиоксидантната система на защита и маркерите на оксидативно увреждане на кръвта като функция на възрастта, както и взаимната връзка между показателите предвид комплексността на протичащите процеси.

5. Да се изследва фагоцитната оксидативна активност при болни с остър исхемичен и хеморагичен инсулт.

6. Да се установи има ли връзка между фагоцитната оксидативна активност, тежестта на болестния процес и неговата динамика.

7. Да се потърсят оксидативни индикатори за клиничната тежест и изхода от исхемичния и хеморагичен инсулт.

8. Да се разработят предиктивни модели за леталитет и клиничен изход, базирани върху оценката на маркери за възпаление и оксидативен стрес.

9. Да се потърсят показатели от про/антиоксидантния статус в хроничния стадий на инсулта, имащи отношение към увеличената вероятност от възникване на повторен инсулт.

10. Да се изследва времевият профил на биохимични показатели на кръвта, неврологичен и когнитивен статус на болни с инсулт без базова деменция в продължение на една година след инцидента. Да се установи има ли разлика в тези показатели между лицата с нормална когниция и тези, развили когнитивно нарушение.

11. Да се потърсят независими предиктори за когнитивен дефицит при изписване и на първата година след инсулта, отчитайки три различни нива на когнитивен статус на болните.

12. Да се проучи състоянието на про/антиоксидантния статус на кръвта при лица с артериална хипертония и диабет без съдов инцидент и да се съпоставят получените резултати с тези на лица, преживели съдов инцидент.

## **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **1. Клиничен материал**

Изследвани са 301 лица. От изследваните лица 83 са клинично-здрави доброволци, 88 са пациенти с исхемичен инсулт (25 от които са проследявани трикратно в рамките на острия стадий, а 63 са проследявани в продължение на 12 месеца), 111 са пациенти с хеморагичен инсулт (42 от които са проследявани двукратно в рамките на острия стадий, а 69 са проследявани за период от 6 месеца) и 19 лица с артериална хипертония и диабет. Проучването е одобрено от Етичната комисия при Медицински Университет-Плевен.

#### ***Клинично-здрави лица - критерии за подбор***

Всички изследвани лица са участвали доброволно в проучването. По времето на провеждане на експериментите, те са били в добро здраве, без симптоми за инфекция или друго остро заболяване, артериална хипертония, диабет, рак или ендокринно заболяване. Никой от изследваната лица не е вземал медикаменти, повлияващи антиоксидантния статус на организма, в частност витамини, минерали или други хранителни добавки с антиоксидантни свойства.

#### ***Пациенти с инсулт***

##### ***Пациенти с исхемичен инсулт - критерии за подбор***

Изследвани са болни с исхемичен инсулт, постъпили за лечение в рамките на 48 часа от появата на симптомите в Клиниката по неврология и неврохирургия при УМБАЛ-Плевен. В проучването не са включени лица с данни за остра или хронична инфекция, друго остро исхемично съдово заболяване (например остър миокарден инфаркт), съпътстващи злокачествени, чернодробни и бъбречни заболявания или хирургична интервенция. Изключени са също така лица със субарахноиден и интрацеребрален кръвоизлив, липса на компютърна томография на глава при постъпване, деменция преди инсулта, друго неврологично или психиатрично нарушение.

##### ***Пациенти с хеморагичен инсулт - критерии за подбор***

Изследвани са болни след спонтанен интрацеребрален кръвоизлив (sICH), постъпили за лечение в рамките на 48 часа от възникването на симптомите в Клиниката по неврология и неврохирургия при УМБАЛ-Плевен. В проучването не са включени лица с вторичен кръвоизлив от мозъчен тумор, травма, хеморагична трансформация на церебрален инфаркт, аневризма или разкъсване на съдовете поради съдова

малформация. Пациенти, имащи кръв във вентрикуларната система или субарахноидното пространство и органична сърдечна болест са също изключени от изследването. Изключени са също така болни с история на остра или хронична инфекция, раково, бъбречно, чернодробно заболяване или хирургична интервенция.

#### *Оценка на неврологичното състояние на болните с инсулт*

Подробен въпросник, оценяващ медицинската история и физикалното състояние на пациентите, е попълван от опитен невролог.

Наличието на артериална хипертензия е дефинирано като средно систолично кръвно налягане  $>140$  mm Hg и средно диастолично налягане  $>90$  mm Hg. Наличието на захарен диабет е дефинирано като ниво на кръвна захар  $> 7.1$  mmol/l.

За начало на инсулта е разглеждан най-ранният момент от време, в който пациентът, негов близък или придружител за пръв път са забелязали определена неврологична дисфункция. Стадиите на заболяването са определени въз основа на критериите на Световната Здравна Организация. Всички пациенти са изследвани с компютърен томограф при постъпване в клиниката, а при нужда и при дехоспитализацията. Размерът на инфаркта е оценяван въз основа на най-големия диаметър на лезията. Обемът на хематома е определян по формулата за обем на елипсоид  $ABC/2$ , където А е най-големият диаметър от най-големия срез, В е перпендикулярният на А диаметър и С е приблизителният брой аксиални срезове, умножен по дебелината на среза.

За оценка на първоначалната тежест на инсулта и нивото на съзнание е използвана Glasgow кома скала (GCS) при постъпване на болните в клиниката. Тежестта на неврологичния дефицит при постъпване в болницата и прогнозата са оценявани с инсултната скала по Mathew (*Mathew NT et al, 1972*). Според нея пациентите, имащи до 20 т. са с изключително лоша прогноза за изхода от заболяването. Пациенти с  $> 40$  т. по скалата на Mathew са разглеждани като болни с лек инсулт, а тези с  $< 40$  т. – като болни с тежък инсулт. Степента на неврологичния дефицит и клиничния изход при изписване и в хронична фаза са оценявани с National Institutes of Health Stroke Scale (*Bessenyey M et al, 2001*). Модифицираната скала на Rankin (mRS) (*Van Swieten JC et al, 1988*) и Glasgow скалата за изход (GOS) са използвани за оценката на клиничния изход на болните при изписване и в хронична фаза. Пациенти с  $mRS \leq 2$  са смятани, че имат добър изход, а тези с  $mRS \geq 3$  – неблагоприятен.

Подобрението в неврологичния статус през острата фаза е дефинирано като относителната промяна на неврологичния дефицит за триседмичен период, изчислена по формулата (Akopov S E et al, 1996):

$$X = \frac{100(Y_t - Y_0)}{(100 - Y_0)},$$

където  $Y_0$  и  $Y_t$  са точките по скалата на Mathew при постъпването в болницата и на 21-ия ден (края на периода на острата фаза), съответно.

Когнитивните функции на пациентите са определяни с помощта на скалата за оценка на общия когнитивен капацитет (Mini Mental State Examination, MMSE). Максималният брой точки е 30, като по-ниският брой точки е индикатор за нарушена глобална когниция. При изучаването на динамиката на изследваните показатели, когнитивният статус на пациентите е представен като дихотомна променлива с нива: липса на когнитивно нарушение при  $MMSE > 24$  точки (код 0) и наличие на когнитивно нарушение при  $MMSE < 24$  точки (код 1). С цел установяването на независими предиктори за когнитивен дефицит, неврологичният статус на пациентите на първата година е оценяван като „нормален” (код 1) при  $MMSE > 28$  точки; „риск за възникване на когнитивен дефицит” (код 2) при  $MMSE$  точки в интервала 24-28 и „лек до умерен когнитивен дефицит” (код 3) при  $MMSE$  точки в интервала 23-10. Скринингът за възможна депресия бе осъществен с оценъчната скала на Хамилтон за депресия (Hamilton M, 1960), като от изследването бяха изключени пациенти с показания за наличието на такава.

### ***Пациенти с артериална хипертония и диабет - критерии за подбор***

В тази група са включени лица с анамнеза за артериална хипертония и захарен диабет тип 2, които не са преживявали мозъчно-съдови инциденти. Клиничната оценка на болните включва история на заболяванията и оценка на физикалното състояние. Колектирани са данни относно възрастта, тютюнопушенето, злоупотребата с алкохол и ползвани медикаменти. Пациентите са лекувани с антихипертензивни и антидиабетни медикаменти без антиоксиданти. Болни с коронарна сърдечна болест, хронична бъбречна недостатъчност, чернодробно или злокачествено заболяване са изключени от проучването.

## **2. Използвани методи**

### ***Колектиране на кръв и урина***

Периферна венозна кръв е вземана на гладно от изследваните лица. Експериментите са започвани в рамките на 30 min след вземането на кръвта. Биохимичният анализ на кръвта е провеждан със стандартни методи. За определянето на нивата на CRP и липидните хидропероксиди е

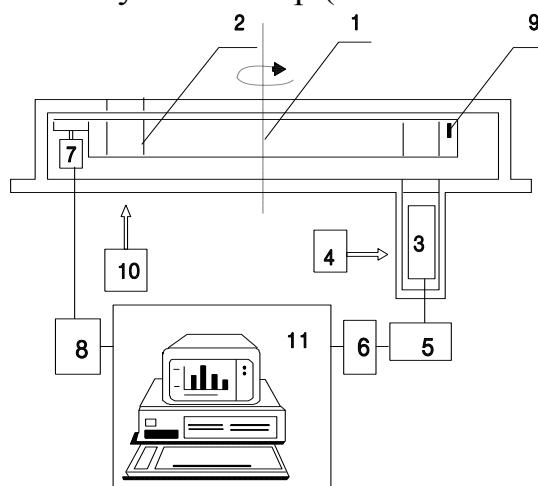
отделян серум, който е съхраняван в хладилна камера при  $-20^{\circ}\text{C}$ . За някои експерименти е колектирана сутрешна и 24-часова стерилна урина.

### **Определяне серумното ниво на С-реактивен протеин**

Серумното ниво на С-реактивния протеин (CRP) е определяно със CRP Latex Test (BIOTEC Laboratories Ltd.). Аналитичната чувствителност на метода е 6 (5-10) mg/l. Диагностичната чувствителност е 95.6%, а диагностичната специфичност - 96.2%. Серумната концентрация на високо-чувствителния CRP (hs-CRP) е определяна чрез латексов имунотурбидиметричен метод на биохимичен анализатор ABX Pentra 400 (референтни граници  $< 5\text{mg/l}$ ) (Dominici R et al, 2004).

### **Хемилуминесцентно оценяване продукцията на активни форми на кислорода от периферни фагоцити**

Хемилуминесцентните кинетики, отразяващи активността на периферните фагоцити да образуват ROS, са регистрирани с компютърен хемилуминометър (Bochev P et al, 1992) (Фиг. 1).



**Фиг. 1** Блок-схема на хемилуминесцентната апаратура

1. ротационен кюветодържател за 6 кювети;
2. кювети;
3. фотоелектронен умножител;
4. високоволтово захранване;
5. импулсен усилвател и амплитуден дискриминатор;
6. интерфейс;
7. стъпков електродвигател;
8. интерфейс;
9. датчици за позиция;
10. термостат;
11. компютърна конфигурация.

Хемилуминометърът изпълнява следните основни функции:

- ✓ Регистрира под компютърно управление светлинното излъчване от 6 проби в квантометричен режим;
- ✓ Въвежда получаваните данни в оперативната памет на компютъра и симултантно мониторира кинетиката на хемилуминесцентния процес;
- ✓ Съхранява получените данни след завършване на измерванията.

Активността на фагоцитите е оценявана в разрежена цялостна кръв. За опсонин-зависима стимулация на клетките е използван опсонизиран зимозан. Последният е активатор на алтернативния път на комплемента. Зимозанът се разпознава и фагоцитира от неутрофили и моноцити. Той води до образуване на опсонизиращи и течни активиращи фактори. За стимулация по опсонин-независим механизъм е използван хемотаксичният трипептид fMLP, важен



медиатор на възпалителния процес. fMLP активира неутрофили и моноцити, предизвиквайки адхезия, отделяне на оксиданти, протеази и липидни метаболити. Двата стимула активират левкоцитите по различен механизъм, което се съпровожда с образуване на различни по количество и вид ROS. Наблюдават се различия и в пропорцията между извънклетъчната и вътреклетъчна хемилуминесценция (Kopprash S et al, 1998).

Луминол-зависима Хемилуминесценция (LCL). Тъй като луминолът прониква свободно в левкоцитите, LCL регистрира общата NADPH-оксидазна миелопероксидазо (MPO)-зависима активност (вътре- и извънклетъчна). От значение е количеството на извънклетъчните ROS, тъй като най-вероятно те предизвикват тъканно увреждане. В настоящето проучване с помощта на моделни системи са регистрирани:

*Спонтанна LCL* - представя екстрацелуларната MPO-обусловена ROS продукция от фагоцити (основно неутрофили) в цялостна кръв при отсъствие на стимулиращ агент.

*Стимулирана Тотална LCL (Total LCL)* - представя MPO-обусловената интегрална продукция на ROS от стимулирани фагоцити (основно неутрофили).

*Стимулирана Извънклетъчна LCL (Extra LCL)* - представя извънклетъчната продукция на супероксид от стимулирани фагоцити (неутрофили и моноцити). Моделната система съдържа  $\text{NaN}_3$ , който инхибира MPO и екзогенна пероксидаза от хрян, която регенерира LCL.

Необходимо е да се отбележи, че Extra LCL не е MPO-зависима и като такава не отразява целия извънклетъчен хемилуминесцентен отговор, а само частта от него, свързана с генерираните ROS. Нещо повече, не е възможно да се сравняват абсолютните стойности на Total LCL и Extra LCL интензитети поради влиянието на добавените субстанции върху процесите, водещи до хемилуминесценция.

Луцигенин-усилена Хемилуминесценция (LgCL) - представя екстрацелуларната генерация на супероксид от NADPH оксидазата на стимулирани фагоцити и митохондриалната продукция на супероксид.

Чрез параметрите на хемилуминесцентните кинетични криви е получавана информация за следните аспекти на фагоцитната активност по отношение генерирането на ROS:

1. Скорост на активиране – пропорционална на реципрочната стойност на параметъра  $T_{\max}$  (времето от стартирането на хемилуминесцентния отговор до достигане на максимум в кинетиката).

2. Максимална оксидативна активност – представя се от параметъра  $I_{\max}$

(максималната стойност на хемилуминесцентния интензитет).

**3. Общ оксидативен капацитет** – пропорционален е на параметъра S (площта под кинетичната крива за 25 минутен интервал след стартиране на отговора). Тъй като получените резултати за  $I_{\max}$  тясно корелират с тези за S ( $r = (0.90-0.96)$ ,  $p=0.0000$ ), в някои случаи са приведени данни само за единия параметър. За да бъдат сравнявани хемилуминесцентните отговори от различни лица, данните са нормирани по отношение на общия брой левкоцити и абсорбционната способност на еритроцитите в кръвната проба (Bechev B et al, 1993).

#### ***Оксидативна активност на плазмата***

Определяна е по метода на Mathews SB и сътр. (1984) чрез измерване на окислението на адреналин до адренохром в единици за литър (U/l), където 1 единица съответства на преобразуването на  $1\mu\text{mol}$  адреналин до адренохром.

#### ***Компоненти от антиоксидантната система на защита***

##### ***Активност на супероксид дисмутаза в еритроцити (CuZn SOD)***

Определяна е по метода на Maral J и сътр. (1977) и нормирана спрямо броя на еритроцитите в пробата. Резултатите са представени в  $U/10^9$  RBC.

##### ***Обща каталазна активност на кръвта (CTS)***

Изследвана е съгласно Sigma Chemie Catalog (1996) и представена в kU/ml кръв.

##### ***Обща глутатион-пероксидазна активност на кръвта (GSH-Px)***

Изследвана е по метода на Pereslegina I (1989) и изразена в  $\mu\text{mol}$  GSSG/min/ml кръв.

##### ***Обща концентрация на сулфхидрилни групи (SH) в кръвта***

Оценявана е по метода на Ellman G (1959). Резултатите са изразени в  $\mu\text{mol}$  SH/ml кръв.

##### ***Общ антиоксидантен статус на серума (TAS)***

Определян е по метода на Erel O (2004) на автоматичен анализатор с кит на фирмата Mega Tip San ve Tic Ltd Sti и представен в mmol Trolox екв./l.

#### ***Степен на оксидативно увреждане***

##### ***Липидни хидропероксиди в плазмата/серума (ROOH)***

Определяни са по метода на Yagi K (1987) и са представени в nmol/ml.

##### ***Реактивни съединения на тиобарбитуровата киселина в кръвта (TBARS)***

Определяни са съгласно метода на Asakawa T и сътр. (1980) и са изразени в nmol/ml.

### **3. Статистически анализ**

Сравняването на пропорциите между групите пациенти е осъществявано с  $\chi^2$ -теста. Интервалните променливи са представени като средна стойност

(стандартно отклонение, SD) или медиана (25–75 пърсентил) в зависимост от типа разпределение на данните. Нормалността на разпределението е проверявана с теста на Shapiro-Wilk. Логаритмична трансформация бе приложена за обезпечаване на изискването за нормалност при някои показатели. Значимостта на разликите между групите при нормално разпределените данни е установявана със Student's t test и еднофакторен и двуфакторен анализ на варианса (ANOVA), а при тези, отклоняващи се от нормалното разпределение – с теста на Mann-Whitney и Kruskal Wallis. Spearman или Pearson product moment correlations са използвани при анализа на връзката между клиничните променливи и биохимичните показатели.

Бинарна логистична регресия бе използвана за оценка на прогностичната стойност на статистически значимите фактори върху дихотомните зависими променливи „леталитет през първата седмица” и „клиничен изход от инсулта при изписване”. Калибрирането на моделите за леталитет и изход бе осъществено с помощта на Hosmer-Lemeshow Goodness-of-fit теста. Дискриминационната способност на моделите, а именно капацитетът им да разграничават преживели от починали и пациенти с добър от тези с лош изход бе определена с receiver operating characteristic (ROC) curve analysis посредством оценката на площта под ROC кривите. Връзката между статистически значимите фактори и леталитета, в частност времето на преживяемост на болните след инцидента, бе изследвана с Kaplan-Meier survival analysis при значимост определена от Log-rang теста. Корекцията на резултатите по отношение на демографските фактори е проведена с помощта на COX-регресионен анализ. За праг на статистическа значимост е разглеждана стойността на  $p < 0.05$ .

За изследване динамиката на биохимичните показатели, неврологичния и когнитивен статус в хроничния стадий на инсулта бяха използвани два подхода. При нормално разпределените данни е използван General Linear Model Repeated Measures анализ, в рамките на който е прилаган Univariate подход за анализ на Within-Subjects ефекта. При нарушаване на условието за сферичност са използвани коригираните  $p$  стойности на Greenhouse-Geisser. За определянето на  $p$  стойността при множествени сравнения е прилаган post hoc анализ с Bonferroni корекция. За данните, отклоняващи се от нормалното разпределение, е прилаган Friedman test с последващ Wilcoxon rank test и post-hoc анализ с Bonferroni корекция. Последната в нашия случай от 4 нива и 6 сравнявания по двойки задава ниво на значимост  $P < 0.0083$ .

Ординална логистична регресия бе използвана за оценка на прогностичната стойност на значимите фактори върху когнитивния статус

(представен в три категории) на първата година след инцидента. Посоката на връзката между променливите и цялостния когнитивен статус е определяна въз основа на знака на регресионните коефициенти, като е направена класификация на всички нива на когнитивния статус и е оценена точността на класификационните резултати.

## СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

### 1. Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта при стареене

Изследвани са 45 клинично здрави доброволци във възрастовия диапазон 40 - 80 години (Таблица 1).

*Таблица 1 Биохимични показатели на кръвта на изследваните лица*

Параметър	1 група	2 група	3 група	4 група
WBC [ $10^9/l$ ]	6,0 (5,0 – 7,6)	6,5 (5,9 – 8,3)	7,9 (6,3 – 9,3)	7,5 (6,3 – 7,8)
GRA [ $10^9/l$ ]	4,1 (3,1 – 4,6)	3,7 (3,0 – 4,5)	4,6 (3,9 – 4,9)	5,7 (4,0 – 8,4)
PLT [ $10^9/l$ ]	250 (75)	262 (53)	256 (34)	240 (9)
LYM [ $10^9/l$ ]	1,8 (1,3 – 2,3)	2,5 (2,2 – 3,2)	3,0 (2,1 – 3,7)	2,0 (1,6 – 2,0)
RBC [ $10^{12}/l$ ]	4,5 (0,5)	4,7 (0,4)	4,9 (0,2)	4,5 (0,3)
Hb [g/l]	133(16)	137(11)	144(10)	132(15)

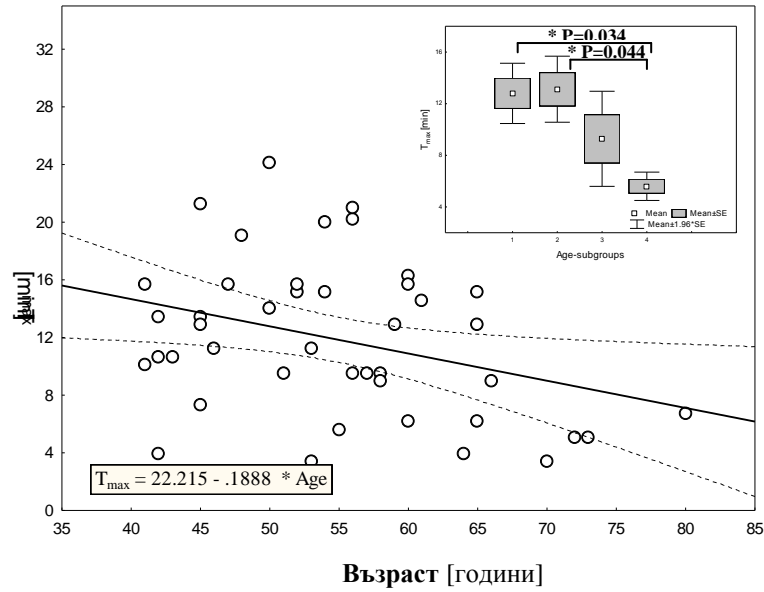
*Данните са представени като средна стойност (SD) или медиана (25-75 пърсентил)*

Не се установява статистически значима промяна с възрастта в общия брой периферни левкоцити ( $p=0.13$ ), в броя на гранулоцитите ( $p=0.49$ ), моноцитите ( $p=0.46$ ) и лимфоцитите ( $p=0.08$ ).

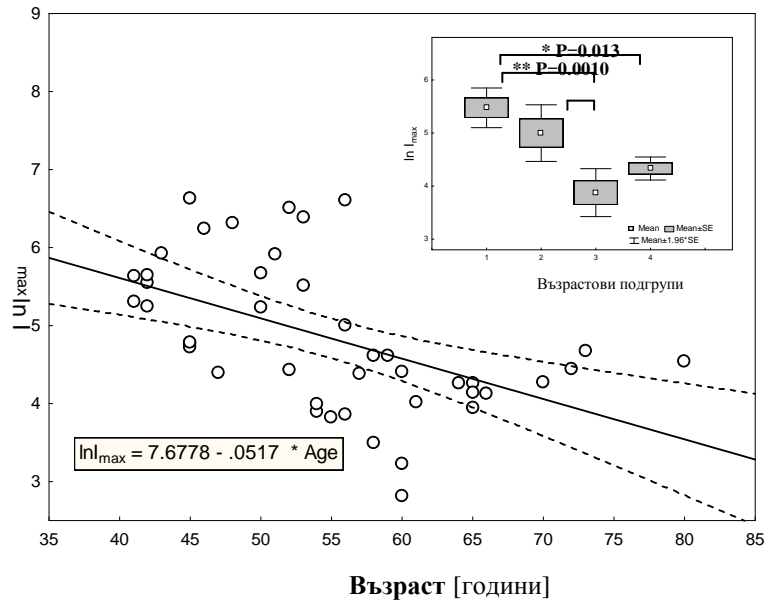
#### ***Възрастово-Обусловени Промени в Спонтанната и Стимулирана Оксидативна Активност на Периферни Фагоцити***

##### *Спонтанна продукция на ROS от периферни фагоцити*

Оксидативната активност на периферните фагоцити бе изследвана в отсъствие на стимулиращ агент при тяхната адхезия върху стъклената повърхност на измерителните камери. Установява се, че с възрастта се увеличава скоростта на активиране на клетките, респективно намалява времето до пика  $T_{max}$  при адхезия ( $r=-0.37$ ,  $p=0.019$ ) (Фиг.2 А). Максималната оксидативна активност и интегралният оксидативен капацитет на фагоцитите, оценени чрез максималния LCL интензитет  $I_{max}$  ( $r=-0.52$ ,  $p=0.00036$ ) и площта под LCL крива S ( $r=-0.48$ ,  $p=0.0011$ ), намаляват с възрастта (Фиг.2 В).



A



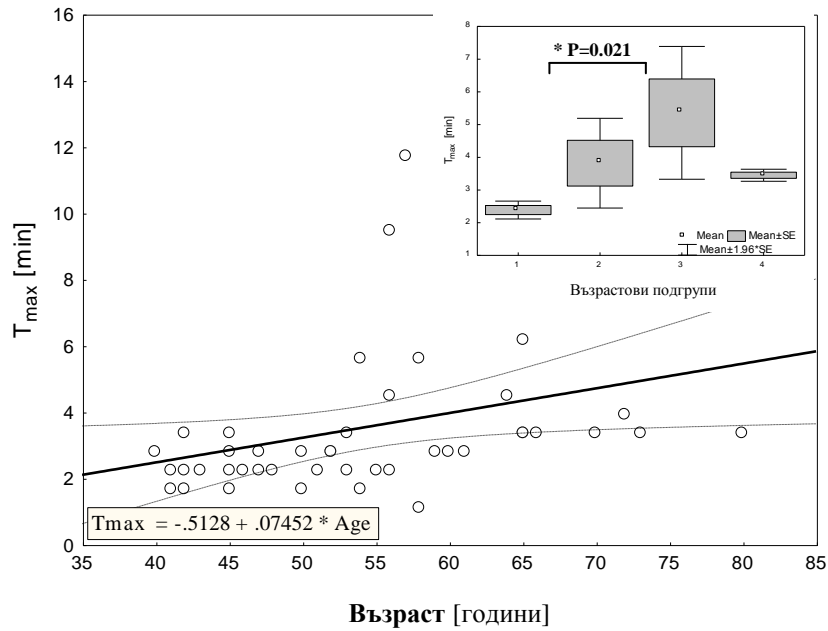
B

**Фиг.2** (A) Корелационна зависимост между времето до пика  $T_{max}$  на спонтанната LCL и възрастта. Вложка: ефект на фактора „възраст” върху  $T_{max}$  ( $F=2.71$ ,  $p=0.05$ ). (B) Корелационна зависимост между логаритмично-трансформираниите стойности на максималния интензитет  $I_{max}$  на спонтанната LCL и възрастта. Вложка: ефект на фактора „възраст” върху  $I_{max}$  ( $F=7.06$ ,  $p=0.00072$ )

*Стимулирана продукция на ROS от периферни фагоцити*

*Обща продукция на ROS при опсонин-независима стимулация*

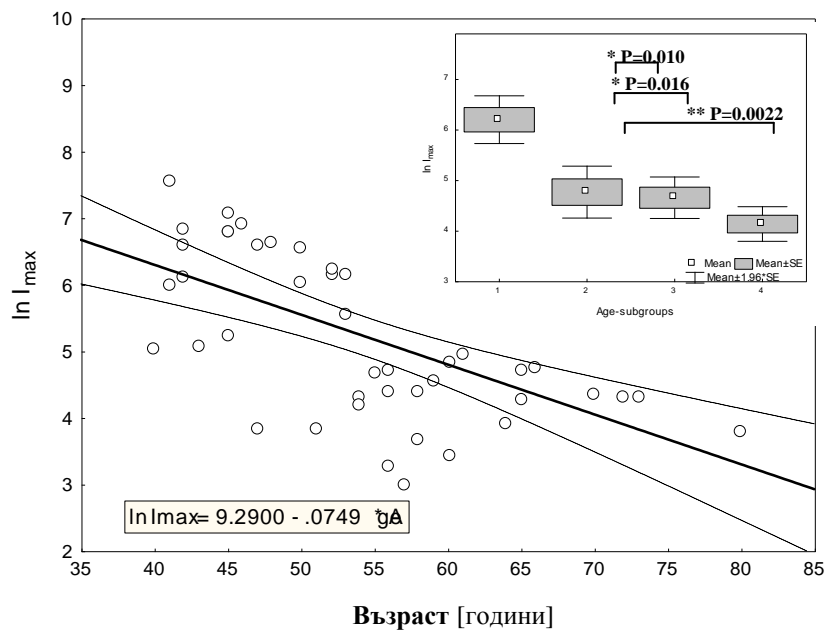
При стимулацията на периферни фагоцити в цялостна кръв с хемотаксичния пептид fMLP, не се установява възрастово-обусловена зависимост на максималната оксидативна активност и интегралния оксидативен клетъчен капацитет. С възрастта намалява скоростта на активиране на фагоцитите, оценена чрез реципрочната стойност на  $T_{max}$  ( $r=-0.32$ ,  $p=0.033$ ) (Фиг. 3)



**Фиг. 3** Корелационна зависимост между времето до пика  $T_{max}$  на *fMLP*-стимулираната Тотална LCL и възрастта. Вложка: ефект на фактора „възраст“ върху  $T_{max}$  ( $F=3.33$ ,  $p=0.029$ )

#### Извънклетъчна продукция на ROS при опсонин-независима стимулация

Скоростта на активиране на фагоцитите за екстрацелуларно образуване на супероксид в отговор на използвания хемоатрактант не се променя с възрастта. С възрастта намаляват максималната оксидативна активност и интегралният оксидативен капацитет на клетките, оценени чрез  $I_{max}$  ( $r=-0.60$ ,  $p=0.00016$ ) и  $S$  под Extra LCL крива ( $r=-0.44$ ,  $p=0.0028$ ) (Фиг. 4).



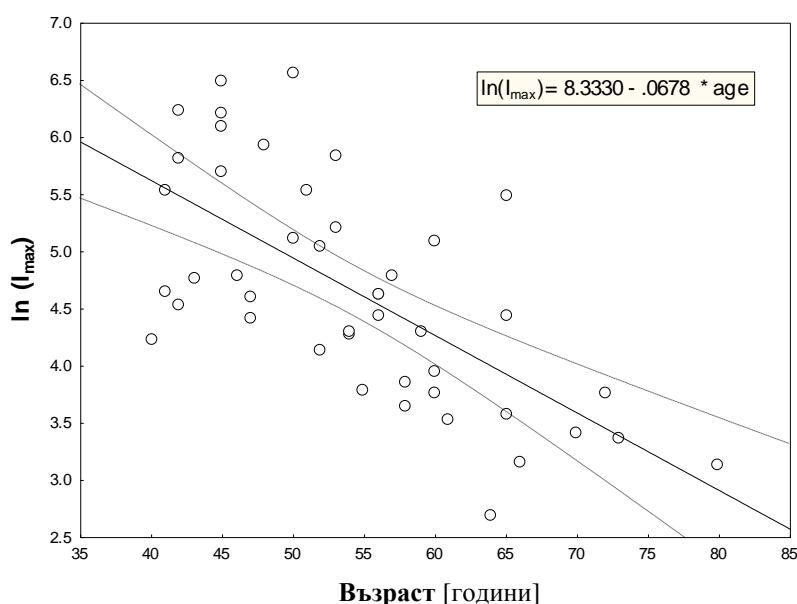
**Фиг. 4** Корелационна зависимост между логаритмично-трансформираниите стойности на максималния интензитет  $I_{max}$  на *fMLP*-стимулираната Extra LCL и възрастта. Вложка: ефект на фактора „възраст“ върху логаритмично-трансформираниите стойности на  $I_{max}$  ( $F=7.59$ ,  $p=0.00039$ )

### Обща продукция на ROS при опсонин-зависима стимулация

При слаба стимулация на периферни фагоцити в цялостна кръв (зимозан 0.5 mg/ml), не се установява зависимост от възрастта на нито един от параметрите, оценяващи общата оксидативна активност на клетките.

### Извънклетъчна продукция на ROS при опсонин-зависима стимулация

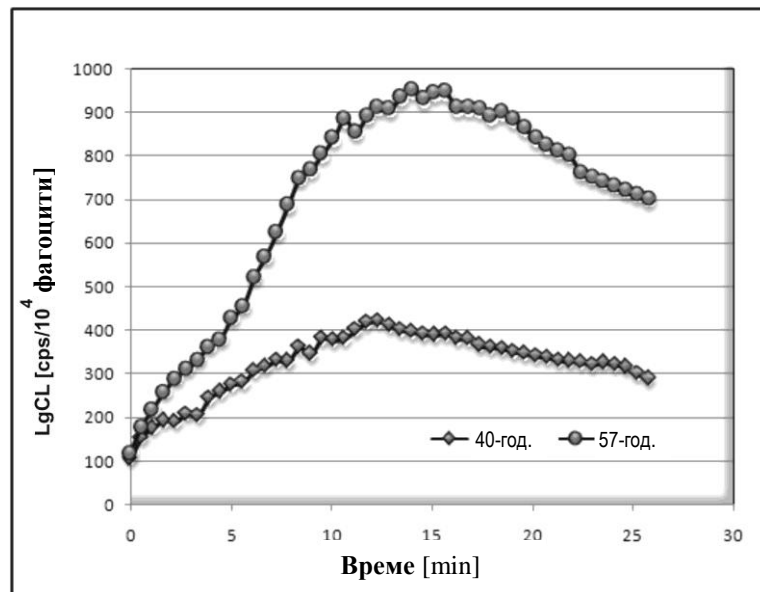
Скоростта на активиране на фагоцитите за екстрацелуларно радикалообразуване не се променя с възрастта. Намалява максималната оксидативна активност на клетките в отговор на опсонизиран зимозан, оценена чрез  $I_{\max}$  на Extra LCL ( $r=-0.67$ ,  $p=0.000001$ ) (Фиг. 5).



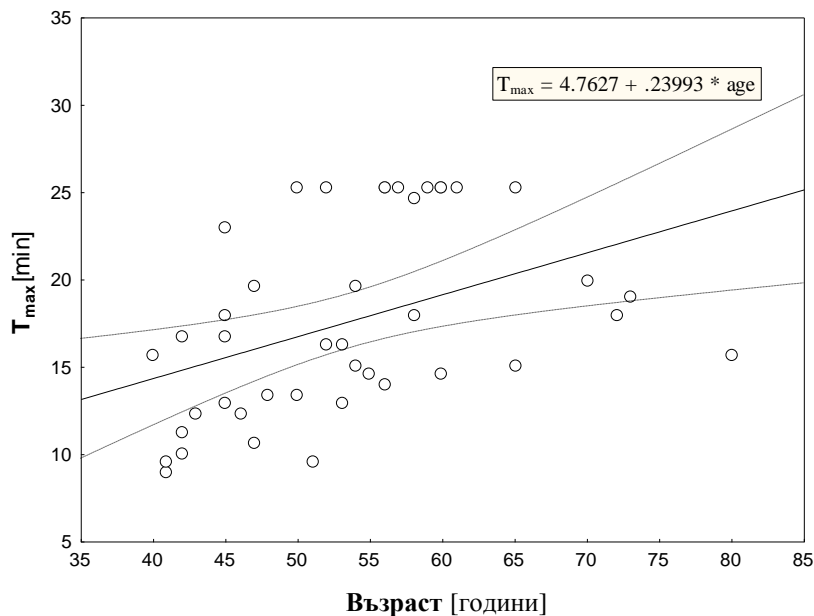
**Фиг. 5.** Корелационна зависимост между логаритмично-трансформираните стойности на максималния интензитет  $I_{\max}$  на зимозан-стимулираната Екстра LCL и възрастта

### Възrastово-обусловени Промени в Митохондриалната Продукция на Супероксид от Стимулирани Периферни Фагоцити в Цялостна Кръв

Лицигениновата хемилуминесценция (LgCL) се разглежда като специфичен индикатор на образувания от периферните фагоцити супероксид (Tosi M et al, 1992). Луцигенинът има способността да навлиза в клетките и да се локализира в митохондриите, определяйки по този начин значим хемилуминесцентен отговор, дължащ се на взаимодействието си с интрамитохондриалния супероксид (Chen H et al, 2001). Затова LgCL кинетика се обуславя от два различни процеса – продукция на супероксид при активирането на респираторния взрив и продукция на супероксид в митохондриите. Представителни LgCL кинетични криви на лица на различна възраст са представени на фиг. 6.



**Фиг. 6** Представителни LgCL кинетични криви, регистрирани от периферни фагоцити на 40-годишен и 57 годишен здрав донор

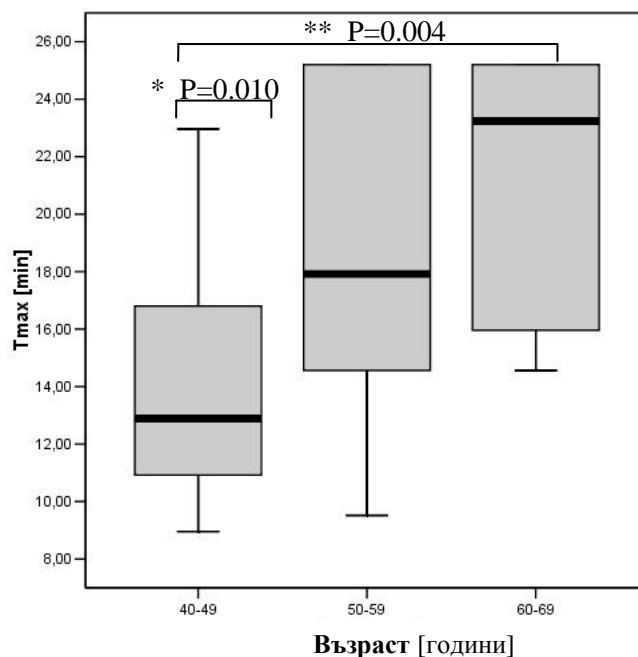


**Фиг. 7** Корелационна зависимост между времето до пика  $T_{max}$  на зимозан-стимулираната LgCL и възрастта

### Скорост на активиране на фагоцитите

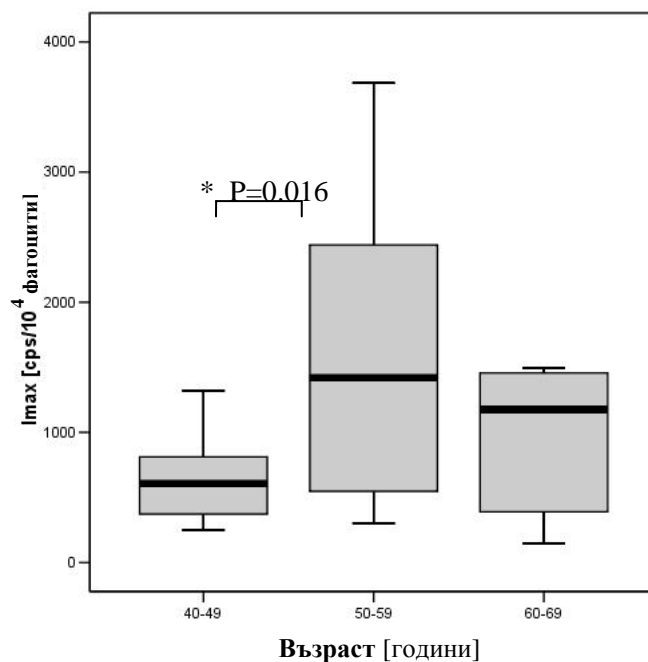
Скоростта на активиране на фагоцитите за образуване на супероксид в отговор на опсонизиран зимозан е оценена чрез реципрочната стойност на  $T_{max}$  - времето до достигане на максимум в LgCL кинетика (Фиг. 7).





**Фиг. 8** Време до пика  $T_{max}$  на зимозан-стимулираната LgCL в зависимост от възрастта. Данните са представени като медиана (min-max стойност)

Факторът „възраст“ е значим по отношение на скоростта на активиране на фагоцитите (*Kruskal Wallis test*,  $\chi^2=6.646$ ,  $p=0.010$ ). Стойността на параметъра  $T_{max}$  нараства значимо с възрастта, т. е. скоростта на активиране на клетките намалява (Фиг. 8)



**Фиг. 9** Максимален интензитет  $I_{max}$  на зимозан-стимулираната LgCL в зависимост от възрастта

### Максимална оксидативна активност и общ оксидативен капацитет

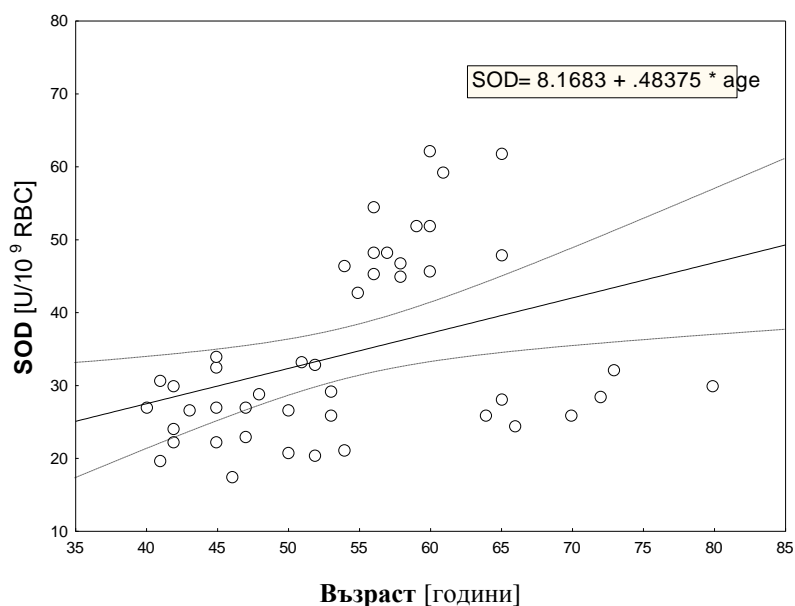
Факторът „възраст” приближава, но не достига значимост по отношение на максималната оксидативна активност на фагоцитите, оценена чрез максималния интензитет  $I_{\max}$  на LgCL кинетика (*Kruskal Wallis test*,  $\chi^2=5.610$ ,  $p=0.061$ ) (Фиг. 9). Максималната оксидативна активност на клетките първоначално нараства с възрастта и във възрастовия диапазон от 50-70 години остава неразличима. Подобен възрастово-обусловен типаж показва и общият оксидативен капацитет на клетките (*Kruskal Wallis test*,  $\chi^2=4.823$ ,  $p=0.090$ ).

### Възрастово-Обусловени Промени в Антиоксидантния Статус на Периферната Кръв

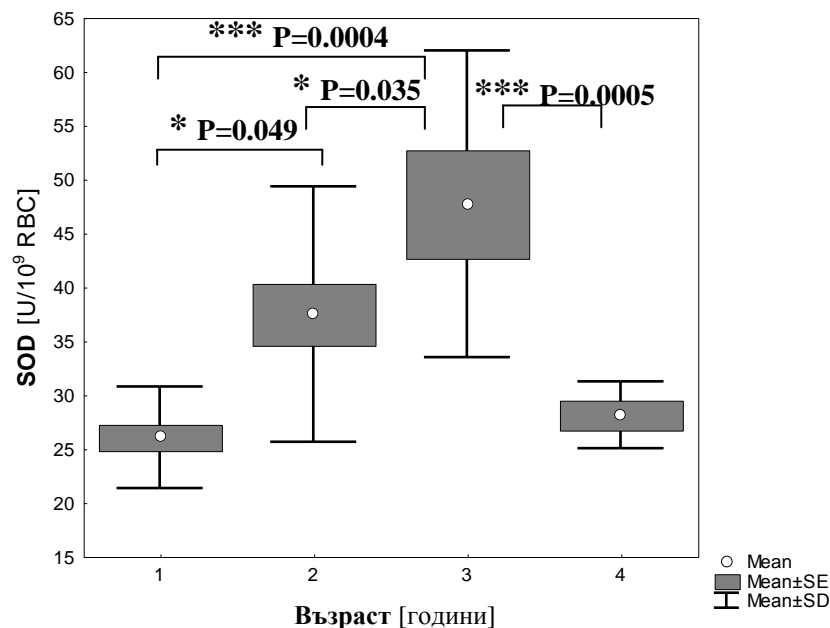
Активността на CuZn SOD в еритроцитите нараства с възрастта ( $r=0.38$ ,  $p=0.011$ ) (Фиг. 10). Това нарастване не е линейно в целия изследван възрастов диапазон. Факторният анализ на варианса ( $F=6.09$ ,  $p=0.0016$ ) с последващо *post-hoc* сравняване показва, че активността на ензима намалява при лицата от най-възрастната група ( $>70$  години) (Фиг. 11).

С тенденция към нарастване, без достигане на статистическа значимост е каталазната активност на кръвта ( $r=0.27$ ,  $p=0.08$ ) ( $29.7\pm 5.9$ ;  $31.7\pm 5.5$ ;  $32.4\pm 4.1$  и  $33.8\pm 7.1$  kU/ml за 1<sup>-ва</sup>–4<sup>-та</sup> възрастови подгрупи, съответно). Не се установяват промени в глутатион-пероксидазната активност на кръвта с възрастта ( $9.8\pm 0.8$ ;  $9.9\pm 0.2$ ;  $9.4\pm 1.3$  и  $8.4\pm 0.8$   $\mu\text{mol GSSG}/\text{min}/\text{ml}$  за 1<sup>-ва</sup>–4<sup>-та</sup> подгрупи, съответно).

Намалява общото съдържание на SH групи в кръвта с възрастта ( $r= - 0.31$ ,  $p=0.044$ ) (Фиг. 12).



**Фиг. 10** Корелационна зависимост между активността на еритроцитната CuZn SOD и възрастта (*Pearson product moment correlation*)



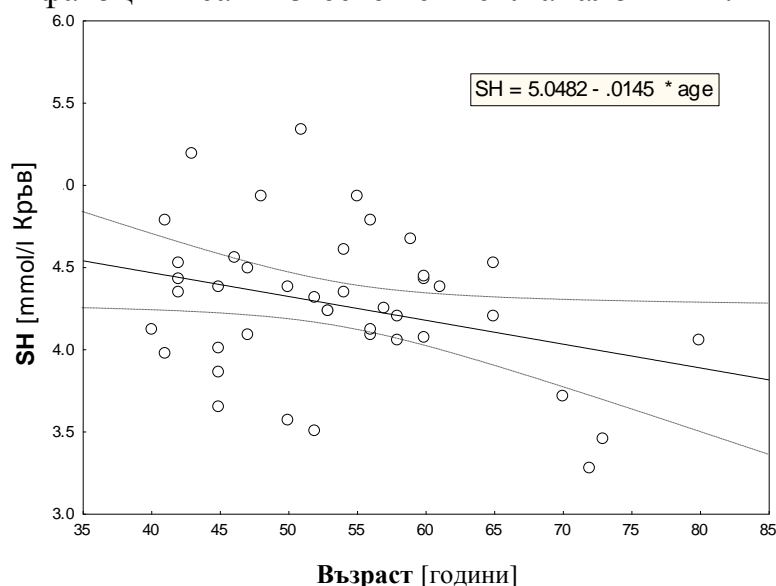
**Фиг. 11** Активност на еритроцитната CuZn SOD като функция на възрастта. За определяне точната разлика между отделните подгрупи е проведен Post-hoc Newman-Keuls multiple range test

### Степен на Оксидативно Увреждане

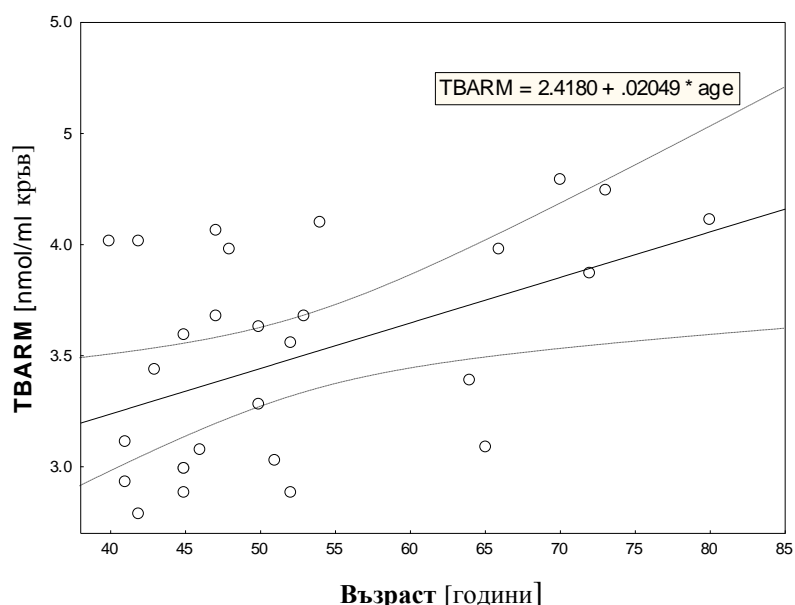
Не се променя с възрастта нивото на ROOH в плазмата ( $3.2 \pm 1.0$ ;  $3.7 \pm 0.5$ ;  $3.9 \pm 0.7$  и  $3.7 \pm 1.2$  nmol/ml за 1<sup>-ва</sup>–4<sup>-та</sup> подгрупи, съответно). Увеличение с възрастта показват ТВARM ( $r = 0.45$ ,  $p = 0.013$ ) (Фиг. 12).

### Взаимовръзка между Измерените Показатели

Симултанно получените в работата резултати относно ефекта на възрастта върху спонтанната и опсонин-независимата продукция на ROS от периферни фагоцити са в известен смисъл аналогични.



**Фиг. 12** Корелационна зависимост между общото съдържание на SH-групи в кръвта и възрастта (Pearson product moment correlation)



**Фиг. 13** Корелационна зависимост между концентрацията на TBARM- в кръвта и възрастта (Pearson product moment correlation)

Значима асоциация съществува между  $I_{\max}$  на спонтанната LCL и  $I_{\max}$  на стимулираната Total LCL ( $r=0.44$ ,  $p=0.004$ ), както и между  $I_{\max}$  на спонтанната LCL и  $I_{\max}$  на fMLP-стимулираната Екстра LCL ( $r=0.50$ ,  $p=0.00099$ ). Броят периферни фагоцити позитивно корелира с концентрацията на TBARM в кръвта ( $r=0.51$ ,  $p=0.0051$ ). Любопитно обаче,  $I_{\max}$  на Extra LCL (зимозан) ( $r=-0.41$ ,  $p=0.029$ ) и Extra LCL (fMLP) ( $r=-0.39$ ,  $p=0.035$ ) негативно корелират с концентрацията на TBARM в кръвта. Изключително значима позитивна корелационна зависимост има между нормираната CuZn SOD активност и концентрацията на липидните ROOH в плазмата ( $r=0.81$ ,  $p=0.0000$ ). Активността на нормираната CuZn SOD корелира с  $I_{\max}$  на Extra LCL (fMLP) ( $r=-0.39$ ,  $p=0.0087$ ),  $T_{\max}$  на LgCL ( $r=0.59$ ,  $p=0.000078$ ) и  $I_{\max}$  на LgCL ( $r=-0.37$ ,  $p=0.020$ ). CuZn SOD и GSH-Rx активности на кръвта корелират позитивно с броя периферни моноцити. Нивото на SH-групите в кръвта позитивно корелира с концентрацията на еритроцитите ( $r=0.34$ ,  $p=0.020$ ) и преди всичко с тази на хемоглобина ( $r=0.43$ ,  $p=0.0032$ ). Времето до пика  $T_{\max}$  ( $r=0.45$ ,  $p=0.020$ ) и  $I_{\max}$  на LgCL ( $r=0.49$ ,  $p=0.016$ ) позитивно корелират с плазмената концентрация на липидните ROOH.

### **Фагоцитната Митохондриална Продукция на Супероксид и Активността на CuZn SOD Намаляват при Стари Хора**

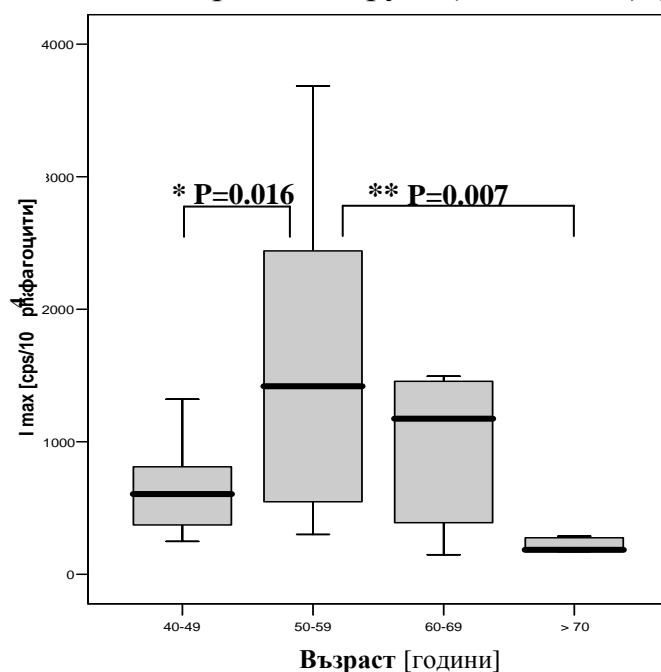
#### *Максимална оксидативна активност на периферни фагоцити*

Факторът „възраст“ е значим по отношение на максималната оксидативна активност на фагоцитите при опсонин-зависима стимулация (*Kruskal Wallis test*,  $\chi^2=14.958$ ,  $p=0.002$ ). Ефектът обаче не е еднопосочен. Първоначално тази

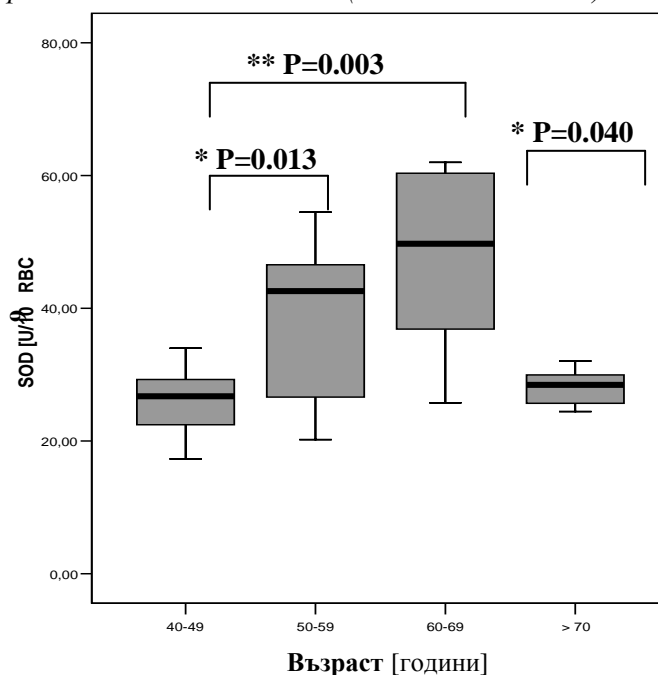
активност нараства с възрастта, след което при лицата над 70-годишна възраст намалява (Фиг. 14).

#### Активност на CuZn SOD в еритроцити

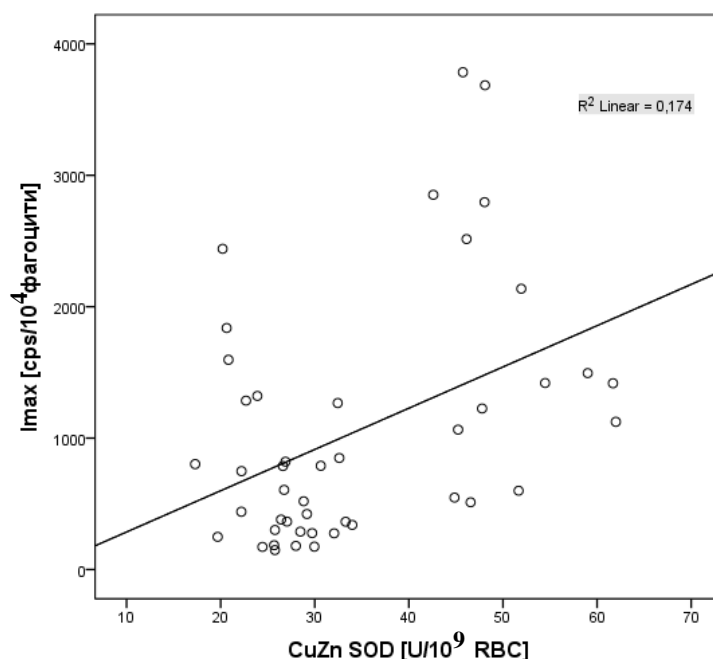
Активността на CuZn SOD в еритроцитите се променя с възрастта (*Kruskal Wallis test*,  $\chi^2=13.227$ ,  $p=0.004$ ). Тази промяна не е линейна в целия изследван възрастов диапазон. След първоначално нарастване, активността на ензима намалява при лицата от най-възрастната група (>70 години) (Фиг. 15).



**Фиг. 14** Максимален интензитет  $I_{max}$  на зимозан-стимулираната LgCL в зависимост от възрастта. Данните са представени като медиана (min-max стойност)



**Фиг. 15** Активност на еритроцитната CuZn SOD като функция на възрастта



**Фиг. 16** Корелационна зависимост между максималния интензитет  $I_{max}$  на LgCL и еритроцитната CuZn SOD активност

Корелационният анализ на Spearman потвърди наличието на подобие между възрастово-обусловената промяна на митохондриалната оксидативна активност на фагоцитите и еритроцитната супероксид дисмутазна активност ( $r=0,345$ ,  $p=0.020$ ) (Фиг. 16).

### ***Полово-специфични Различия в Антиоксидантния Статус на Кръвта на Здрави Лица на Пострепродуктивна Възраст***

Базовите характеристики на изследваните лица в пострепродуктивна възраст са представени в Таблица 2. Не се установява значима разлика във възрастта на мъжете и жените от изследваната група ( $p=0.142$ ). Нивата на компоненти от антиоксидантния потенциал на кръвта са представени в Таблица 3.

**Таблица 2** Базови характеристики на изследваните лица

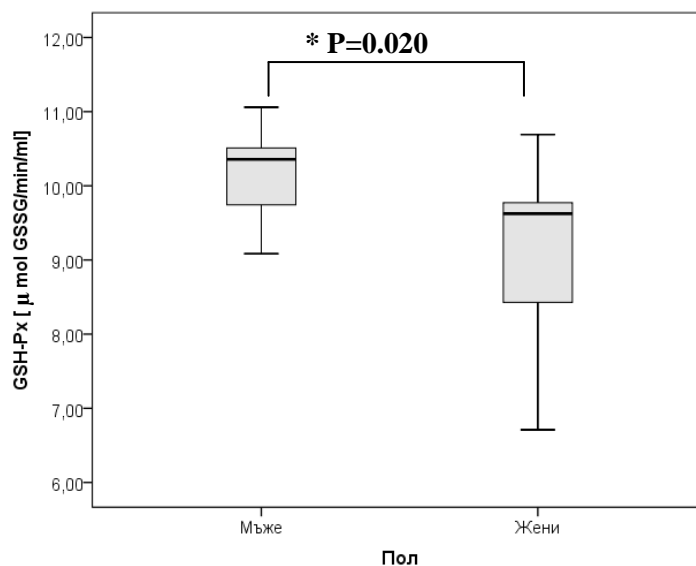
Параметър	n= 35
Възраст [години], средна стойност (SD)	62 (7)
Мъжки пол, n (%)	14 (21)
Тютюнопушене, n (%)	12 (30)
WBC [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	7.0 (3.1)
RBC [ $\times 10^{12}/l$ ], средна стойност (SD)	4.5 (0.4)
PLT [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	244 (38)

Не се установява полово-специфична разлика в активността на CuZn SOD в еритроцитите ( $F=0.204$ ,  $p=0.654$ ) и CTS активност на кръвта ( $r=0.439$ ,  $p=0.512$ ).

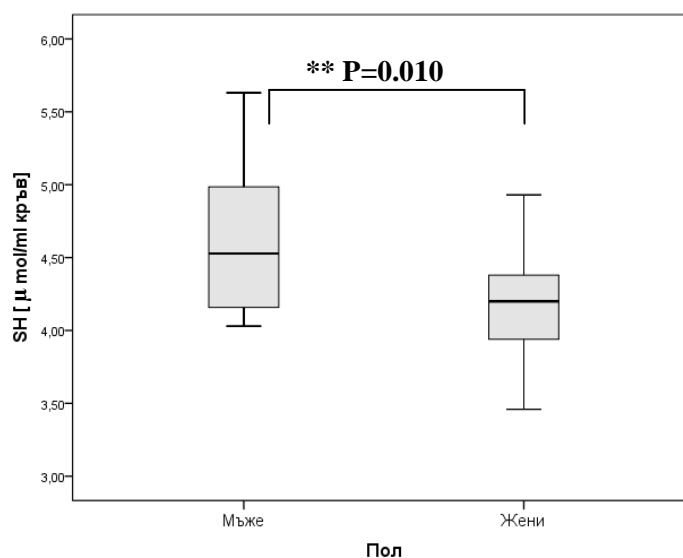
**Таблица 3** Нива на компоненти от антиоксидантната система на защита

Параметър	Всички (n= 35)	Мъже (n= 17)	Жени (n= 18)
SOD [U/10 <sup>9</sup> RBC], (SD)	35.0 (9.0)	36.5 (10.6)	34.1 (8.2)
CTS [kU/ml кръв], (SD)	32.8 (6.1)	33.7 (7.1)	32.3 (5.6)
GSH-Px [μmol GSSG/min/ml кръв], медиана (25 –75 пърсентил)	9.7 (9.2 – 10.4)	10.4 (9.6 – 10.5)	9.6 (8.3 – 9.9)
SH групи [μmol/ml кръв], (SD)	4.3(0.6)	4.6(0.6)	4.1(0.5)

Полът е статистически значим фактор за нивото на глутатион-пероксидазната активност на кръвта ( $Z=-2.327$ ,  $p=0.020$ ) и общото ниво на SH групи в кръвта ( $Z=-2.581$ ,  $p=0.010$ ). Данните сочат, че на пострепродуктивна възраст жените имат по-ниска GSH-Px активност (Фиг. 17) и по-ниско общо съдържание на SH групи в кръвта (Фиг. 18).



**Фиг. 17** GSH-Px активност на кръвта като функция на пола (Mann-Whitney)



**Фиг. 18** Ниво на SH-групи в кръвта като функция на пола (Mann-Whitney). Данните са представени като медиана (min-max стойност)

## 2. Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта при остър исхемичен инсулт

### *Оксидативна Активност на Периферни Фагоцити*

Базовите характеристики на изследваните пациенти са представени в Таблица 4. Изследваните лица са разделени на 2 групи – с лек инсулт ( $\geq 40$  т.) и тежък ( $< 40$  т. по скалата на Mathew).

*Таблица 4 Демографски и клинични характеристики на пациентите*

Параметър	Пациенти с остър исхемичен инсулт (n=25)
Възраст [години], средна стойност (SD)	64.7 (9.1)
Мъжки пол, n (%)	18 (72)
<b>Съдови рискови фактори</b>	
Артериална хипертония, n (%)	17 (68)
Диабет, n (%)	5 (20)
Тютюнопушене, n (%)	7 (28)
<b>Неврологична оценка</b>	
mRS при изписване, медиана (25 –75 пърсентил)	3 (1-3)
<b>Локализация на инфаркта</b>	
Дясна хемисфера, n (%)	7 (28)
Лява хемисфера, n (%)	13 (52)
Малък мозък, n (%)	2 (8)
Вертебро-базиларна система, n (%)	3 (12)
<b>Биохимични показатели при постъпване</b>	
WBC [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	9,3 (3,8)
Неутрофили [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	6,9 (3,1)
Лимфоцити [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	1,9 (1,0)
Тромбоцити [ $\times 10^9/l$ ] [g/l], средна стойност (SD)	268 (54)
RBC [ $\times 10^{12}/l$ ], медиана (25 –75 пърсентил)	5 (4-5)

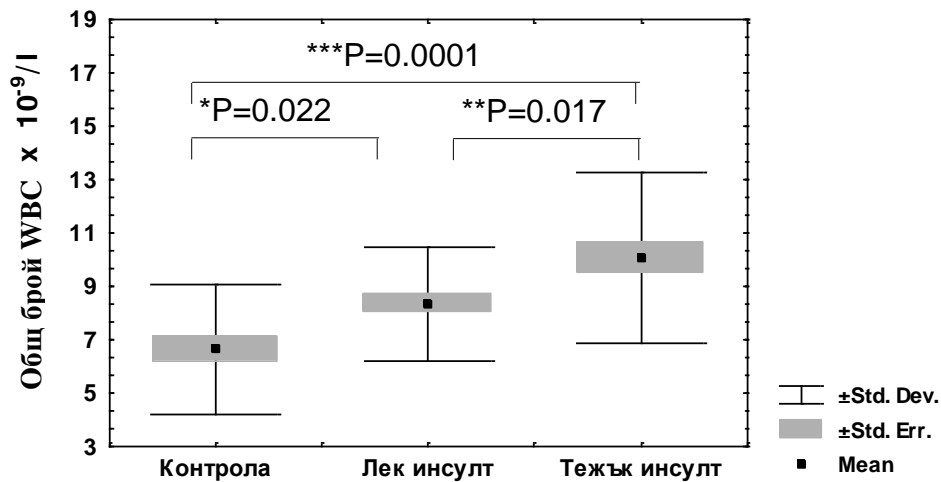
С цел проследяване динамиката на свободно-радикалните процеси в хода на острия стадий на болестта от пациентите е вземана венозна кръв, антикоагулирана с хепарин (10 U/ml) в рамките на 1-3 ден; 4-7 ден; 8-14 ден; 15-21 ден от началото на инсулта. Тъй като няма значими различия между резултатите за 1-3 ден и 4-7 ден, те са обединени в една група – първа седмица от началото на инсулта. Изследвани са факторите “тежест на инсулта”, и “време от началото на заболяването”. Независимостта на тези фактори е установена с Pearson  $\chi^2$  test.

### *Брой циркулиращи левкоцити и тромбоцити*

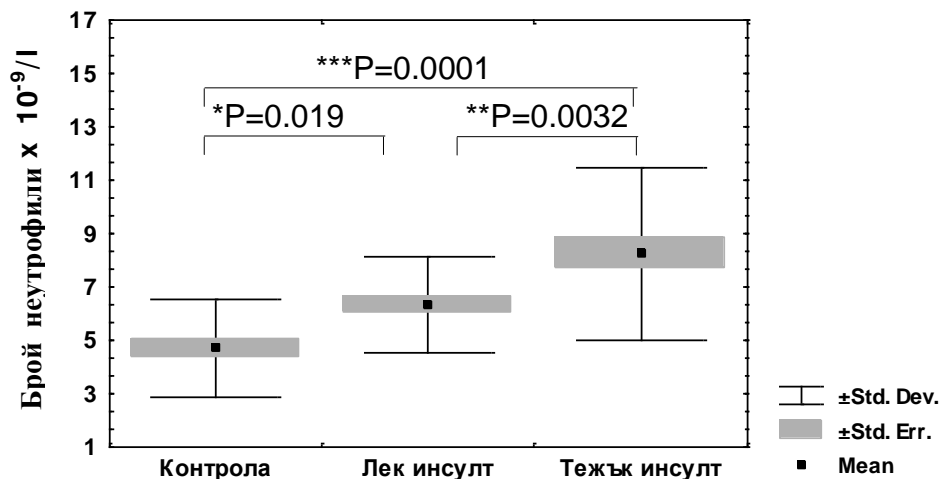
Развитието на локална възпалителна реакция е добре познато явление при болни с исхемичен инсулт. В настоящето проучване броят левкоцити е измерен трикратно в хода на заболяването. Ние установяваме увеличен брой периферни левкоцити при пациентите с инсулт спрямо контрола, което е в съгласие с работата на Pozzilli C и сътр. (1985). Пациентите с тежък инсулт имат по-висок брой WBC (F=5.80; p=0.020) и неутрофили



( $F=8.08$ ;  $p=0.0064$ ) спрямо тези с лек инсулт, а броят на WBC и неутрофилите при двете групи пациенти е по-висок от този на контролната група (Фиг. 19 А,В).



А

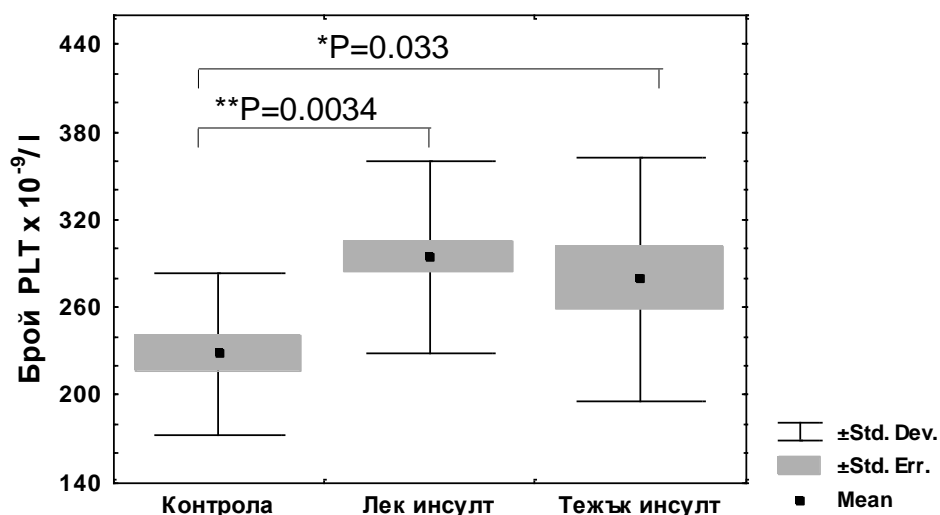


В

**Фиг. 19** Зависимост на броя WBC и неутрофили от тежестта на исхемичния инсулт

Освен това, ние намираме, че броят нутрофили остава висок през целия остър стадий на заболяването. Този брой позитивно корелира с размера на инфаркта ( $r=0.35$ ;  $p=0.0075$ ), негативно корелира с подобрението в неврологичния статус ( $r=-0.44$ ,  $p=0.00067$ ) и позитивно корелира с нивото на инвалидност ( $R_s=0.41$ ;  $p=0.0017$ ). Аналогичен резултат получаваме и за общия брой WBC. По-голямо подобрение в неврологичния статус за периода на острата фаза се наблюдава при пациенти с по-малък брой левкоцити. Затова този брой може да се разглежда като допълнителен индикатор за изхода от заболяването. Броят на периферните тромбоцити (PLT) по нашите данни не зависи от тежестта на неврологичния дефицит. Той обаче е по-висок при пациентите с инсулт

спрямо контролата (Фиг. 20), което е в противоречие с намереното от Kim GW и сътр. (1996) и D'Erasmio E и сътр. (1991). Увеличен брой PLT се установява през цялото време на острата фаза на инсульта. Установеното от нас увеличение в броя PLT е от значение, тъй като при инсулт тромбоцитите могат директно да предизвикат увреждане чрез образуване на агрегати и индиректно - чрез отделяне на медиатори и последващо активиране на левкоцити (Kochanek PM, 1990).



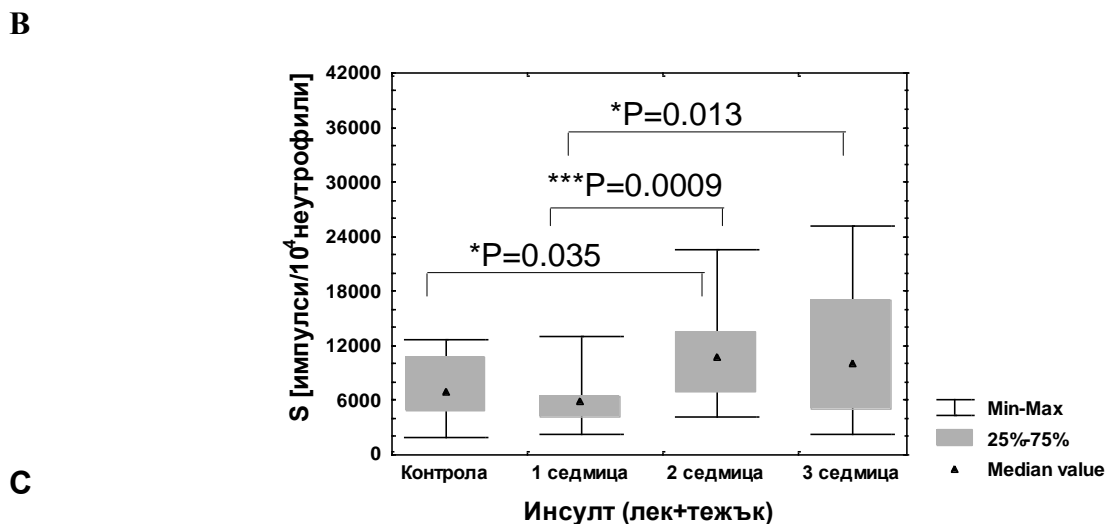
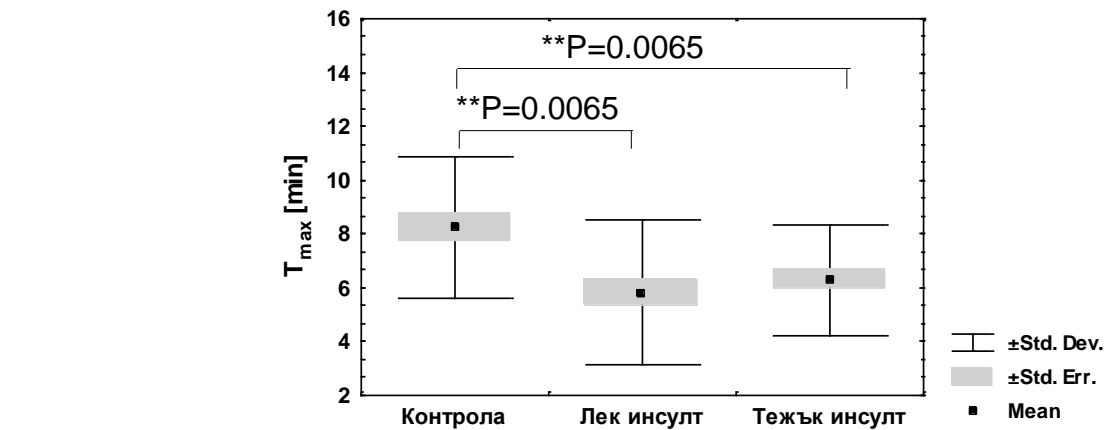
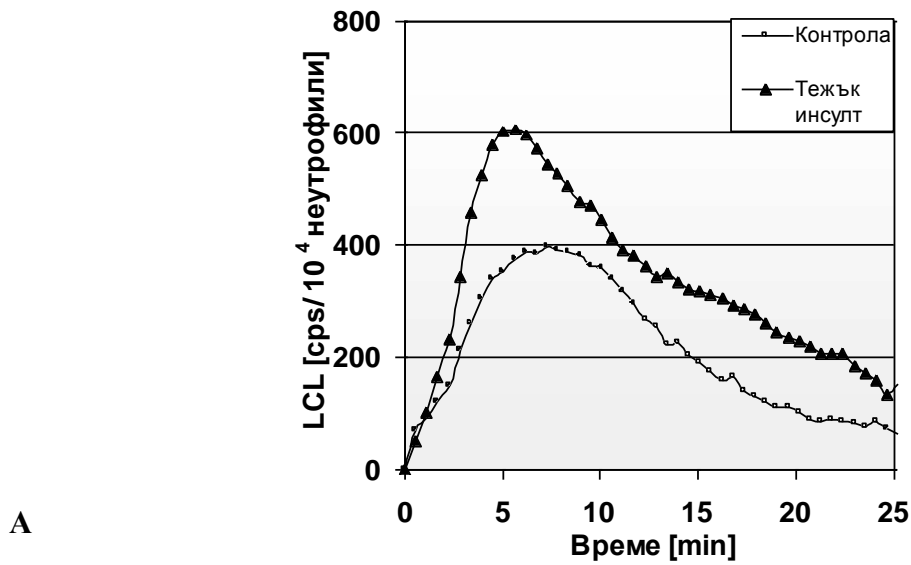
**Фиг. 20** Брой тромбоцити при исхемичен инсулт с различна тежест

#### *Стимулирана продукция на ROS от периферни фагоцити*

Циркулиращите левкоцити при пациенти с инсулт са активирани (Floyd RA, 1990; A. Elneihout AM et al, 1996). Те проявяват увеличена адхезивност и при адхезия върху ендотела генерират токсични ROS и деструктивни протеази (Grau AJ et al, 1992). В настоящата работа кинетиката и степента на продукция на ROS от фагоцитите е оценявана чрез регистриране и анализ на кинетиката на съпровождащата я LCL.

#### *Обща продукция на ROS при опсонин-независима стимулация*

Предполага се, че активирането на системата на комплемента е важен механизъм за инициране на ендотелно клетъчно увреждане при исхемия/реперфузия (Lucchesi B, 1993). Затова при болни с инсулт сме изследвали продукцията на ROS от фагоцити, стимулирани по опсонин-зависим механизъм. Brown GE и сътр. (1999) установяват, че LCL на левкоцити в отговор на опсонизиран зимозан силно корелира с експресията на опсонинови рецептори върху клетъчната повърхност в присъствие на възпалителни медиатори. В *in vivo* условия циркулиращите левкоцити при пациенти с инсулт са изложени на въздействието на възпалителни медиатори (Elneihout AM et al, 1996; Kim JS et al, 1996) и следователно може да се очаква променена продукция на ROS по този механизъм.



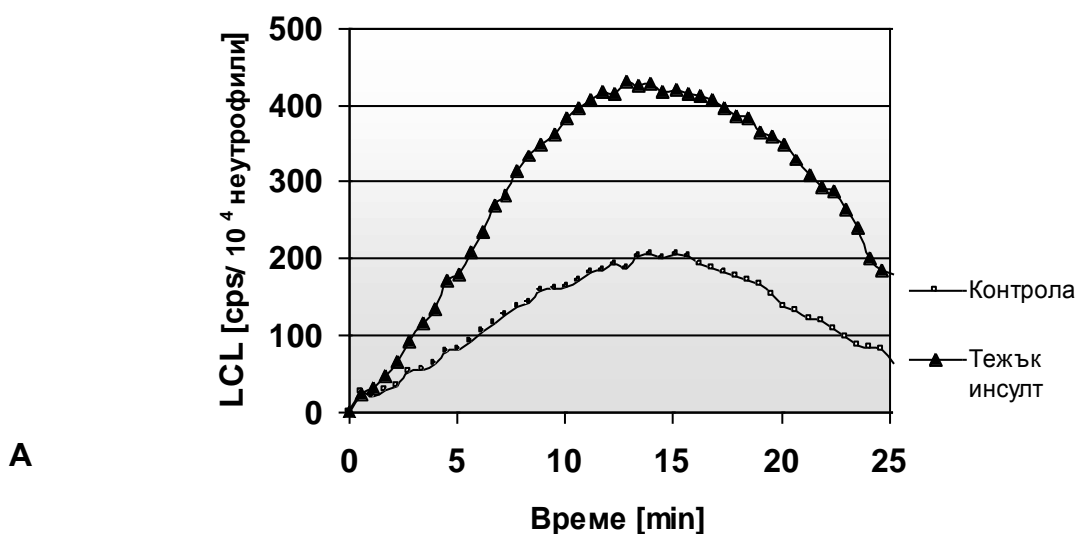
**Фиг. 21** Зимозан-стимулирана Тотална LCL при пациенти с исхемичен инсулт. (A) Представителни кинетики на Тотална LCL от левкоцити на здрав донор и пациент с тежък инсулт през втората седмица от началото на заболяването. (B) Тотална LCL, време до пика  $T_{max}$ . (C) Общ оксидативен капацитет през острата фаза на инсулта

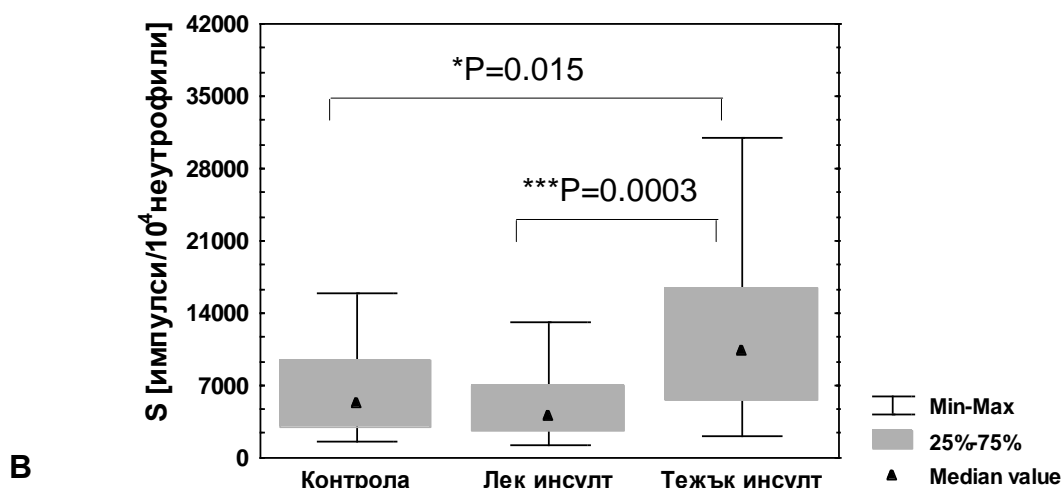
На фиг. 21 А са изобразени представителни LCL криви, отразяващи зимозан-стимулираната обща продукция на ROS от левкоцити в кръвта на здрав донор и пациент с тежък исхемичен инсулт на втората седмица от заболяването. Факторите “тежест на инсулта” и “време” не са значими за параметъра  $T_{max}$ . Стойността на  $T_{max}$  на пациентите е по-малка от тази на контролната група (Фиг. 21 В). Параметърът  $S$  не диференцира тежестта на заболяването, но се променя с времето ( $F=4.52$ ;  $p=0.016$ ). Стойността на  $S$  на първата седмица от болестта е по-ниска от тази на втората и третата седмици. Спрямо контролата са достоверно различни стойностите на втората и третата седмици (Фиг.21 С).

Получените резултати показват, че скоростта на активиране на фагоцитите при болните е по-голяма от тази при контролите. На втората седмица от началото на съдовия инцидент се увеличава и общият оксидативен капацитет на левкоцитите. Той се запазва висок повече от три седмици и не зависи от тежестта на инсулта. Zgliczynski J и сътр. (1988) са докладвали намалено време до пика и увеличен максимален LCL интензитет при праймирани левкоцити, стимулирани с частичков стимулант. Ето защо може да се предположи, че периферните левкоцити при инсулт са праймирани за увеличено генериране на ROS по опсонин-зависим механизъм и това увеличение не зависи от тежестта на неврологичния дефицит.

#### *Извънклетъчна продукция на ROS при опсонин-независима стимулация*

На фиг. 22А са показани типични LCL криви, отразяващи зимозан-стимулирана извънклетъчна ROS продукция от фагоцити на здрав донор и болен с тежък исхемичен инсулт на втората седмица от заболяването.





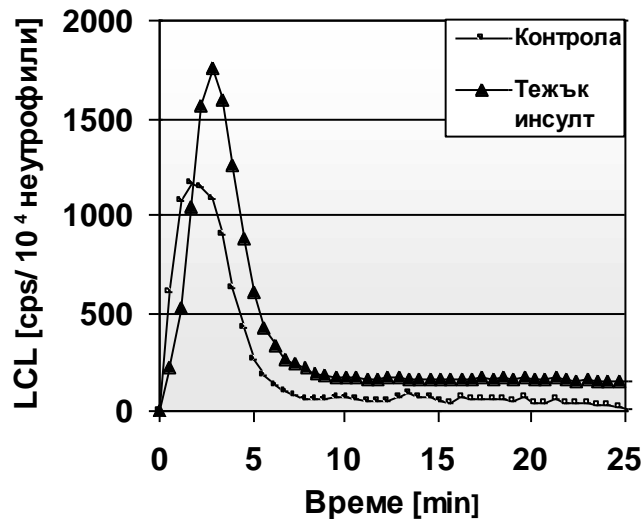
**Фиг.22** Зимозан-стимулирана Екстра LCL при исхемичен инсулт. (А) Представителни Екстра LCL кинетики от неутрофили на здрав донор и пациент на втората седмица от началото на тежък инсулт. (В) Екстра LCL, площ под кривата S.

Факторът “тежест на инсулта” не е значим за параметъра  $T_{max}$ . Освен това, този показател не се променя с времето. Факторът “тежест на инсулта” е значим за параметъра S ( $H=13.34$ ,  $p=0.0003$ ;  $F=11.6$ ;  $p=0.0014$ ), но не и факторът “време”. Стойността на S е достоверно по-висока при болните с тежък спрямо тези с лек неврологичен дефицит. Спрямо контролата е различна стойността на S само за тежките инсулти (Фиг. 22 В). Стойността на S позитивно корелира с размера на инфаркта ( $r=0.55$ ;  $p=0.000024$ ), негативно корелира с подобрението на неврологичния статус ( $r=-0.47$ ;  $p=0.00056$ ) и позитивно корелира с нивото на инвалидност ( $R_s=0.51$ ;  $p=0.00008$ ).

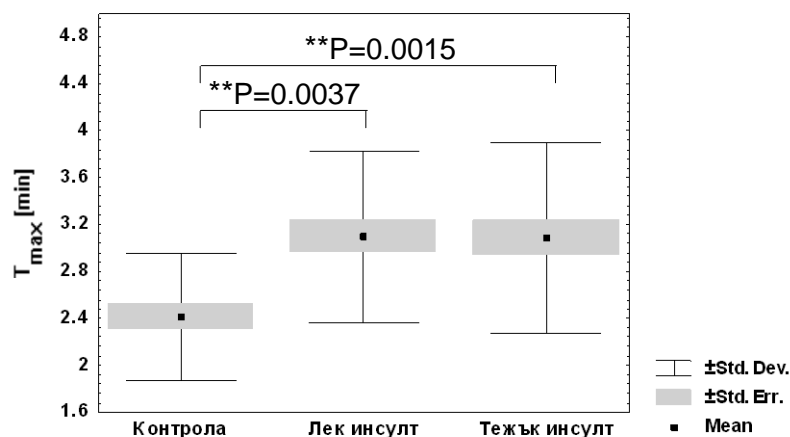
#### Обща продукция на ROS при опсонин-зависима стимулация

На фиг. 23 А са показани представителни LCL криви, отразяващи fMLP-стимулираната обща продукция на ROS от фагоцити в кръв на здрав донор и болен с тежък исхемичен инсулт на втората седмица от инсулта.

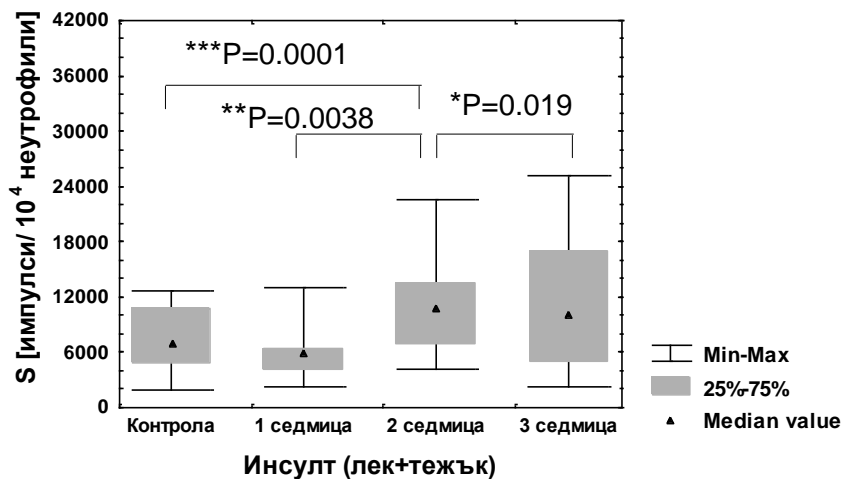
Ние намираме, че стойността на  $T_{max}$  не зависи от фактора “тежест на инсулта” и не се променя с времето в хода на болестта. Стойността на  $T_{max}$  е по-голяма при болните с тежък и лек инсулт спрямо контролната група (Фиг. 23 В). Параметърът S не отразява тежестта на заболяването, но значимо се променя с времето ( $F=4.48$ ;  $p=0.016$ ). На втората седмица се наблюдава увеличен LCL капацитет спрямо контрола, този на първата и третата седмици от началото на заболяването (Фиг.23 С). Следователно скоростта на активиране на фагоцитите при болните е по-малка от тази на контролите. На втората седмица от заболяването се увеличава общият оксидативен капацитет на клетките. Увеличено време до пика и увеличен LCL интензитет се установява за праймирани левкоцити, стимулирани с fMLP (Liu L et al, 1998).



A



B



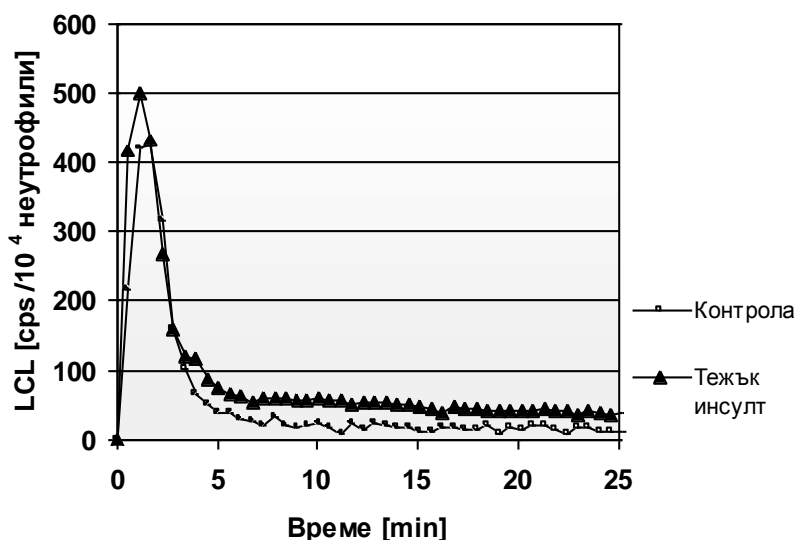
C

**Фиг.23** fMLP-стимулирана Тотална LCL при исхемичен инсулт. (A) Представителни кинетики на Тотална LCL от фагоцити на здрав индивид и пациент с тежък инсулт през втората седмица от началото на заболяването. (B) Тотална LCL, време до пика  $T_{max}$ . (C) Тотална LCL, площ под кривата S

Затова може да се предположи, че периферните левкоцити при инсулт са праймирани за увеличено генериране на оксиданти в отговор на опсонин-независимия fMLP. Това увеличение не зависи от тежестта на неврологичното увреждане.

### Извънклетъчна продукция на ROS при опсонин-зависима стимулация

На фиг. 24 са показани представителни LCL криви, отразяващи fMLP-стимулираната извънклетъчна продукция на ROS от фагоцити в кръв на здрав донор и пациент с тежък исхемичен инсулт на втората седмица от заболяването.

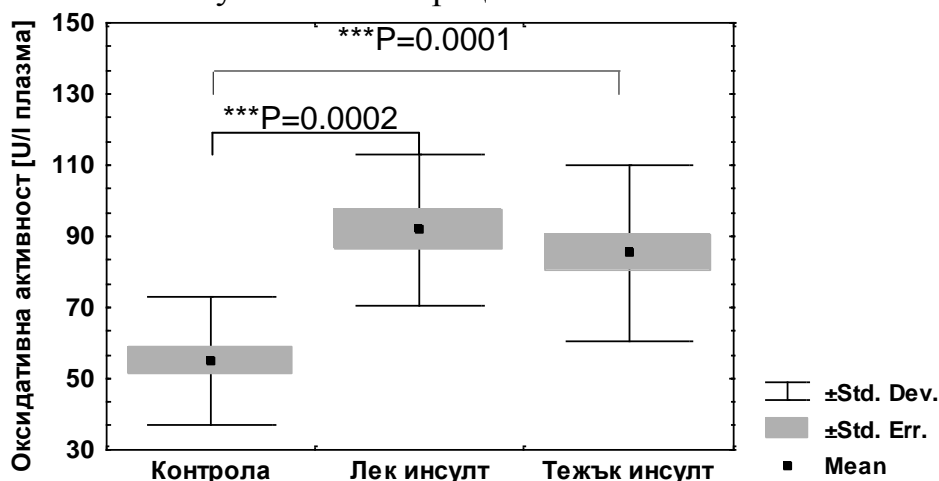


**Фиг.24** Представителни fMLP-стимулирани Екстра LCL кинетики от фагоцити на здрав донор и пациент с тежък исхемичен инсулт на втората седмица от инцидента.

Статистическият анализ показва, че факторите “тежест на инсулта” и “време” не са определящи за стойността на параметрите  $T_{max}$  и  $S$ . Няма разлика между тези параметри на пациентите с инсулт и контролата. Следователно скоростта на активиране на фагоцитите и общата извънклетъчна продукция на ROS в отговор на fMLP са неразличими между болните и контролната група. Последното е в съгласие с публикувани литературни данни за липса на промяна в нивото на генерирания супероксид от стимулирани с fMLP циркулиращи неутрофили при пациенти с инсулт (Grau AJ et al, 1992).

Използваната екстрацелуларна моделна система не отразява целия извънклетъчен отговор, а само частта от него, свързана с генерираните ROS (приносът на MPO не се отчита, защото екстрацелуларната система съдържа  $NaN_3$ , който инактивира неутрофилната MPO). От друга страна, fMLP-стимулираната Тотална LCL е MPO-зависима. По литературни данни тотална fMLP-стимулирана LCL, която има максимум в първите 1-2 min след старта на отговора, се свързва основно с извънклетъчни събития (Briheim G et al, 1984). В нашите експерименти, LCL пикът се достигаше на втората минута и поради това най-вероятно има екстрацелуларен произход. Тъй като няма разлика в количеството на извънклетъчно генерираните ROS и в същото

време Тоталната LCL е увеличена (която най-вероятно е също екстрацелуларна), следователно разликата се дължи на другия участник в извънклетъчния отговор - секретираната МРО от клетките. По тази причина ние предполагахме, че наблюдаваната промяна в Тоталната LCL в отговор на fMLP се дължи главно на увеличена секреция на МРО от клетките.



**Фиг.25** Оксидативна активност на плазмата на болни с исхемичен инсулт и контроли

В подкрепа на това предположение ние измерихме оксидативната активност на плазмата. Предполага се, че последната се дължи на МРО, освободена от активираните левкоцити в извънклетъчната среда. Изследванията ни показват, че тежестта на инсулта и времето от неговото начало не оказват влияние върху оксидативната активност на плазмата. Тя обаче винаги е значимо по-висока при болните с инсулт спрямо контролата (Фиг. 25). Ето защо ние смятаме, че при пациенти с исхемичен инсулт циркулиращите фагоцити са праймирани за увеличена секреция на МРО при стимулация с fMLP.

### **CRP – индикатор за тежестта на неврологичния дефицит**

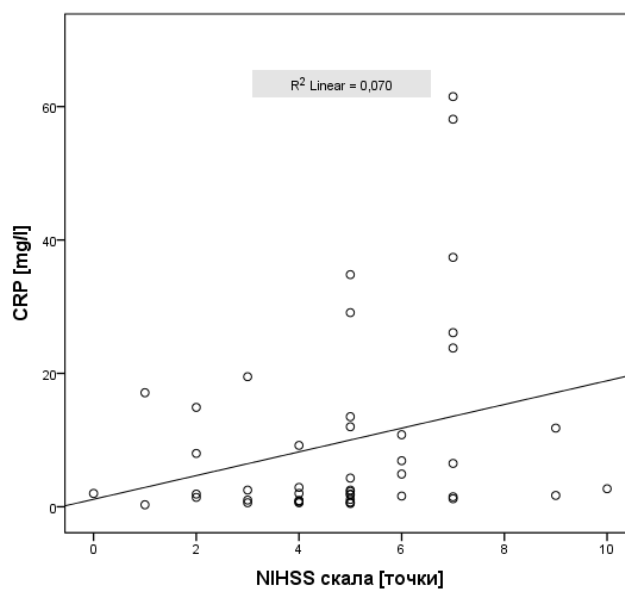
Ролята на възпалението и ендотелната дисфункция бе изследвана в група от 47 пациенти с лек исхемичен инсулт. Базовите характеристики на болните са представени в Таблица 5.

**Таблица 5** Демографски и клинични характеристики на болни с лек исхемичен инсулт

Параметър	Остър исхемичен инсулт (n= 47)	
Възраст [години], медиана (25 –75 пърсентил)	63	(59-69)
Мъжки пол, n (%)	26	(55)
Образование, n (%)		
Основно	9	(19)
Средно	24	(51)
Средно специално	5	(11)
Висше	9	(19)



<b>Съдови рискови фактори</b>		
Артериална хипертония, n (%)	45	(96)
Систолично P [mm Hg], медиана (25–75 пърсентил)	160	(140-180)
Диастолично P [mmHg], медиана (25–75 пърсентил)	90	(90-100)
Диабет, n (%)	13	(28)
Злоупотреба с алкохол, n (%)	10	(21)
Тютюнопушене, n (%)	19	(40)
Предшестващ инсулт, n (%)	10	(21)
<b>Неврологична оценка</b>		
NIHSS [точки], медиана (25 –75 пърсентил)	5	(4-6)
mRS [точки], медиана (25 –75 пърсентил)	1	(1-2)
<b>Радиологични променливи</b>		
Локализация, n (%)		
Хемисфериален	39	(83)
Лакунарен	3	(6)
Стволов	5	(11)
<b>Биохимични показатели при постъпване</b>		
WBC [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	7.8	(1.7)
Кръвна захар [mmol/l], медиана (25 –75 пърсентил)	5.5	(5.1-6.8)
CHL [mmol/l], медиана (25–75 пърсентил)	5.1	(4.5-5.6)
LDL [mmol/l], медиана (25 –75 пърсентил)	3.3	(2.6-3.7)
HDL [mmol/l], медиана (25 –75 пърсентил)	1.1	(1.0-1.3)
TG [mmol/l], медиана (25 –75 пърсентил)	1.6	(1.2-2.0)
hs-CRP [mg/l], медиана (25 –75 пърсентил)	2.5	(1.2-13.5)
ACR [mg/mmol], медиана (25 –75 пърсентил)	0.8	(0.5-1.6)



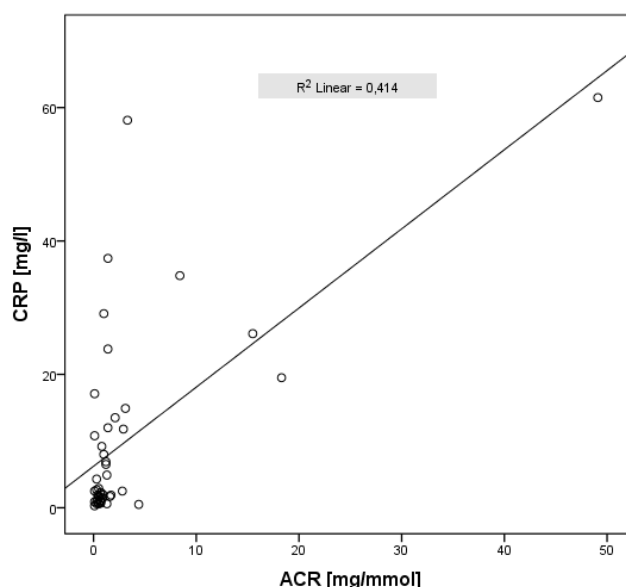
**Фиг. 26** Корелационна зависимост между серумното ниво на CRP и тежестта на неврологичния дефицит, оценена по NIHSS скала

Установяваме, че нивото на hs-CRP в серума корелира с тежестта на неврологичния дефицит, съгласно NIHSS скалата ( $R_s=0.301$ ,  $p=0.042$ ) (Фиг. 26). В същото време, нивото на възпалителния маркер корелира с

отношението албумин/креатенин (ACR) в урината, един маркер за ендотелна дисфункция ( $R_s=0.504$ ,  $p=0.000$ ) (фиг. 27) и броя на гранулоцитите в циркулацията ( $R_s=0.359$ ,  $p=0.014$ ). Съдовите рискови фактори допринасят за завишения възпалителен статус на кръвта на болните, тъй като съществува позитивна връзка между WBC ( $R_s=0.365$ ,  $p=0.012$ ) и гранулоцитите ( $R_s=0.319$ ,  $p=0.029$ ), от една страна, и кръвно-захарното ниво при постъпване, от друга, както и между WBC и това на TG ( $R_s=0.473$ ,  $p=0.001$ ) и HDL ( $R_s=-0.305$ ,  $p=0.037$ ).

### ***Компоненти от Антиоксидантния Капацитет на Периферната Кръв***

Известно е, че активността и концентрацията на ензимни и неензимни антиоксиданти в биологични течности, тъкани и органи се променя при редица патологични състояния (*Halliwel B, 2001*). Малко е известно за ролята на антиоксидантите в патофизиологичните механизми на мозъчно увреждане след инсулт, както и за връзката между антиоксидантната активност и риска от инсулт. Публикуваните в литературата данни за статуса на компоненти от антиоксидантния потенциал на кръвта при исхемичен инсулт са противоречиви (*Leinonen JS et al, 2000; Chang CY et al, 1998*).



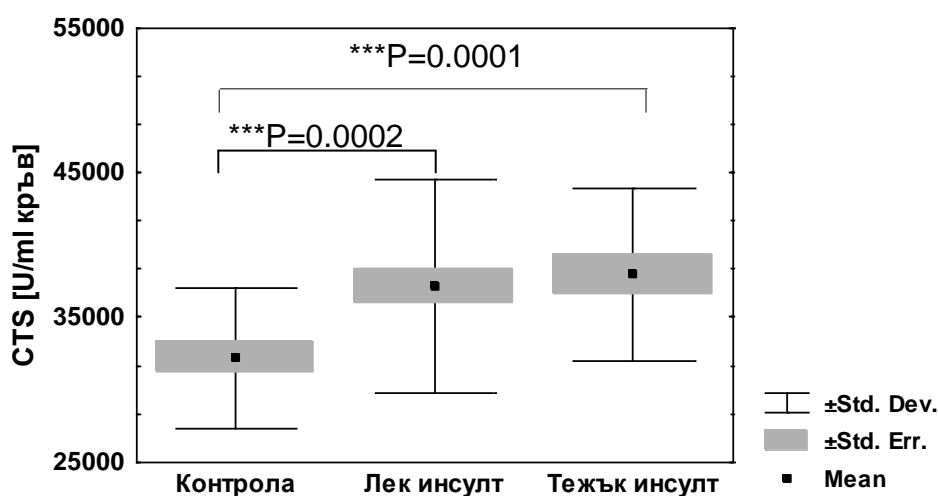
**Фиг. 27** Корелационна зависимост между серумното ниво на hs-CRP и отношението албумин/креатенин в урината

Ние установяваме увеличени антиоксидантни възможности на кръвта на пациентите с инсулт. Резултатите за активността на CuZn SOD, CTS и GSH-Px и концентрацията на SH групите в трите времеви интервала са представени в Таблица 6.

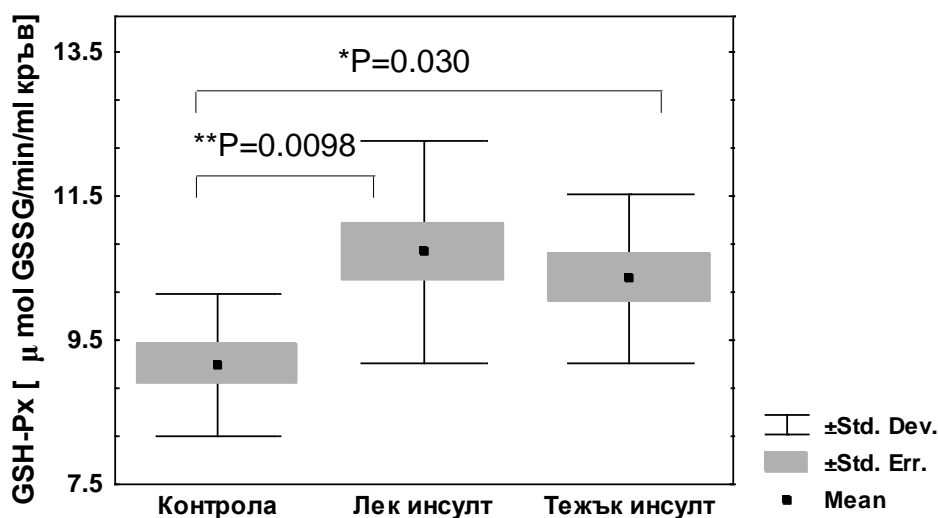
**Таблица 6** Някои параметри на кръвния антиоксидантен капацитет при исхемичен инсулт и контроли

Параметър	Контрола	Лек инсулт			Тежък инсулт		
		1 седмица	2 седмица	3 седмица	1 седмица	2 седмица	3 седмица
<b>SOD</b> [U/10 <sup>9</sup> RBC]	26.9 ± 3.8	26.5 ± 11.2	27.6 ± 6.5	27.1 ± 7.5	32.4 ± 5.1	29.2 ± 4.6	28.3 ± 6.6
<b>CTS</b> [kU/ml]	32.18 ± 4.83	38.74 ± 8.54**	37.02 ± 6.28**	36.00 ± 7.79	38.53 ± 7.90***	38.19 ± 7.41***	37.21 ± 3.04**
<b>GSH-Px</b> [μmol GSSG/min/ml]	9.15 ± 0.99	9.48 ± 3.19	11.18 ± 1.06**	10.87 ± 0.60**	9.74 ± 1.30	10.63 ± 0.67*	10.69 ± 1.78*
<b>SH</b> [μmol/ml]	4.38 ± 0.69	3.93 ± 0.54	4.37 ± 0.83	4.25 ± 0.47	4.27 ± 0.55	4.48 ± 0.44	4.12 ± 0.63

Забележка: Статистическите сравнения са спрямо контролата. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$



**Фиг. 28** Каталазна активност на кръвта при исхемичен инсулт с различна тежест  
Брой измервания: контрола,  $n=20$ ; лек инсулт,  $n=44$ ; тежък инсулт,  $n=29$



**Фиг. 29** Глутатион-пероксидазна активност на кръвта при исхемичен инсулт с различна тежест. Брой измервания: контрола,  $n=20$ ; лек инсулт,  $n=44$ ; тежък инсулт,  $n=29$

CTS и GSH-Px активности на кръвта не отразяват тежестта на неврологичния дефицит и остават без промяна в изследваните времеви периоди. Спрямо контролата, кръвта на пациентите с инсулт има достоверно по-висока CTS и GSH-Px активност (Фиг. 28 и Фиг. 29). Не се установява разлика в активността на CuZn SOD и концентрацията на SH групи между болните с инсулт и контролата.

### ***Степен на Оксидативно Увреждане***

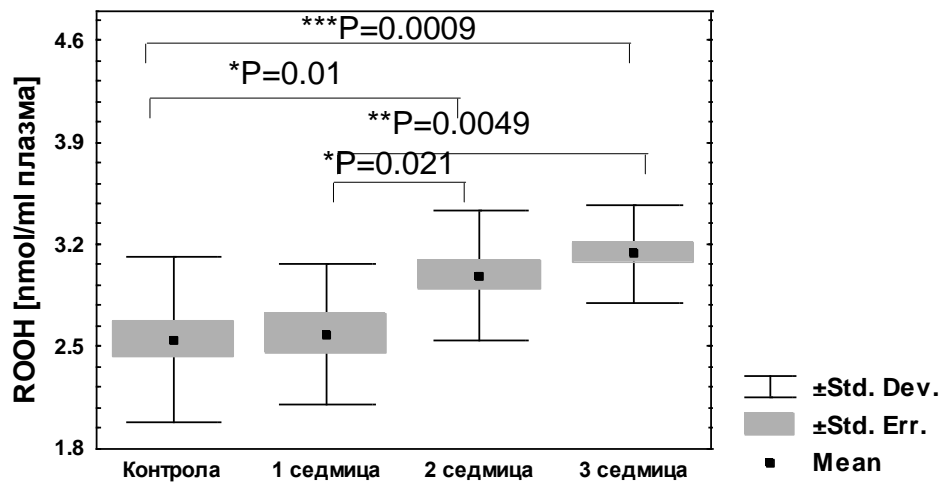
Концентрацията на ROOH през острата фаза на инсулта не зависи от тежестта на неврологичния дефицит, но се увеличава в хода на заболяването ( $F=5.28$ ;  $p=0.0091$ ). Нивото на ROOH на втората и третата седмици е по-високо от това на първата седмица и контролата (Фиг. 30 А). То не корелира значимо с размера на инфаркта, подобрението в неврологичния статус и нивото на инвалидност. От друга страна, нивото на TBARM в кръвта зависи от “тежестта на инсулта” ( $F=11.22$ ;  $p=0.0018$ ) (Фиг. 30В) и “времето” ( $F=3.96$ ;  $p=0.027$ ) (Фиг. 30С). Значимо количество TBARM се натрупват при болните с тежък инсулт след втората седмица от началото на болестта (Фиг. 30 С). Нещо повече, концентрацията на TBARM достоверно корелира с размера на инфаркта ( $r=0.54$ ;  $p=0.00011$ ) и с нивото на инвалидност ( $R_s=0.35$ ;  $p=0.012$ ). По отношение на този показател леките инсулти са неразличими от контролата.

### ***Комплексните Взаимоотношения между Възпалението и Съдовите Рискови Фактори Определят Когнитивните Нарушения през Острия Стадий на Ишемичен Инсулт***

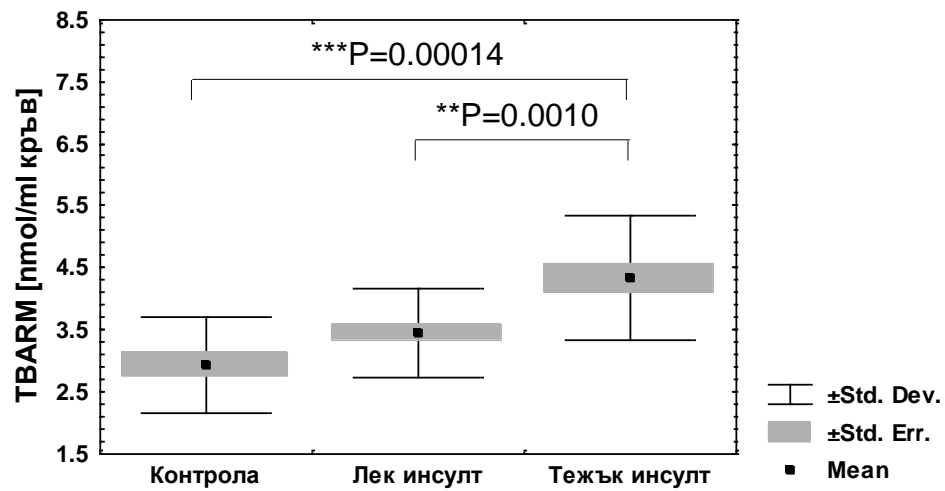
Базовите характеристики, свързани с когнитивния статус на болни с лек ишемичен инсулт при изписване са представени в Таблица 7. Пациентите са на средна възраст 63 години (59-69), като 55 % от тях са мъже. Степента на неврологичния дефицит при изписване по NIHSS е 5 (4-6) точки, а клиничният изход, оценен с mRS е 1 (1-2).

От 47 пациенти, 20 (43%) са били с нормален когнитивен статус, а 27 (57%) са показали когнитивни нарушения. Възрастта, полът, нивото на образование, систоличното кръвно налягане, нивото на глюкоза в кръвта и hs-CRP в серума при постъпване в болницата са значими фактори по отношение когнитивния статус на болните при изписване (Таблица 7).

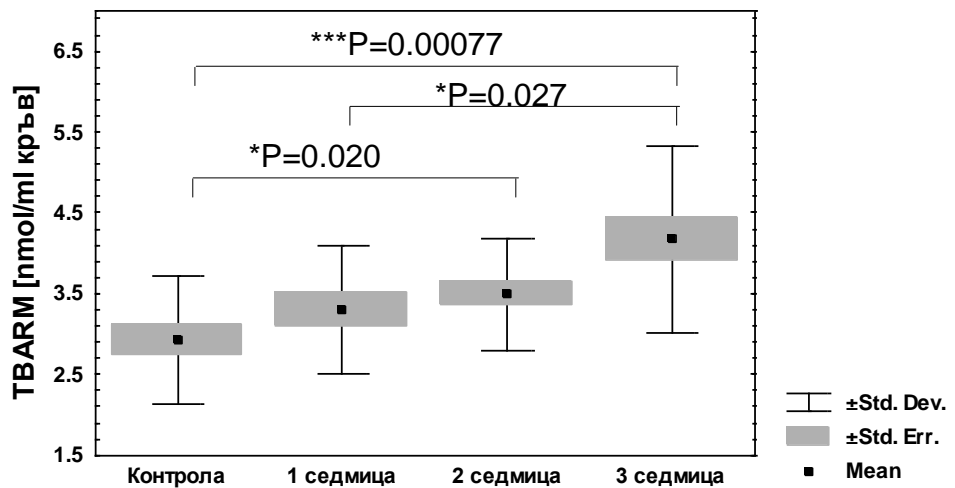
С цел установяването на независими предиктори за съдово когнитивно нарушение при изписване бяха конструирани два бинарни логистични регресионни модела. В нито един от моделите не бе включено нивото на образование поради относително малкия брой случаи в отделните подгрупи. В първия модел бяха включени възрастта, полът и серумното ниво на hs-CRP (Таблица 8).



A



B



C

**Фиг. 30** Продукти на липидната пероксидация при остър исхемичен инсулт (A) Концентрация на плазмените ROOH в хода на болестта. (B) Концентрация на TBARM в кръвта в зависимост от тежестта на инсулта. (C) Промяна на TBARM с времето

Такъв модел добре описва данните ( $\chi^2=28.27$ ;  $p=0.000$ ). Съгласно Nagelkerke's  $R^2$ , 61% от вариабилността може да бъде обяснена с участието на включените три независими променливи.

**Таблица 7** Базови характеристики на пациенти с лек исхемичен инсулт в зависимост от когнитивния им статус при изписване

Параметър	Когнитивен статус при изписване				p
	Нормален статус, n= 20		Съдови когн. нарушения, n= 27		
Възраст [години]	61	(57-63)	67	(63-71)	0.000*
Мъжки пол, n (%)	16	(80)	10	(37)	0.003*
Образование, n (%)					0.001*
Основно	0	(0)	9	(33)	
Средно	10	(50)	14	(52)	
Средно специално	5	(25)	0	(0)	
Висше	5	(25)	4	(15)	
<b>Съдови рискови фактори</b>					
Артериална хипертония, n (%)	18	(90)	27	(100)	0.176
Систолично P [mm Hg]	145	(123-160)	160	(158-190)	0.015*
Диастолично P [mm Hg]	90	(83-100)	100	(90-100)	0.213
Диабет, n (%)	2	(10)	11	(41)	0.020*
Злоупотреба с алкохол, n (%)	5	(25)	5	(19)	0.723
Тютюнопушене, n (%)	11	(55)	8	(30)	0.080
Предшествващ инсулт, n (%)	4	(20)	6	(22)	0.854
<b>Неврологична оценка</b>					
NIHSS [точки]	5	(3-6)	5	(4-7)	0.498
mRS [точки]	1	(1-2)	2	(1-2)	0.073
<b>Радиологични променливи</b>					
Локализация, n (%)					0.244
Хемисферален	15	(75)	24	(89)	
Лакунарен	1	(5)	2	(7)	
Стволов	4	(20)	1	(4)	
<b>Биохимични показатели при постъпване</b>					
WBC [ $\times 10^9/l$ ]	7.6	(1.3)	8.1	(2.2)	0.374
GLU [mmol/l]	5.3	(4.9-5.9)	5.7	(5.3-6.9)	0.021*
CHL [mmol/l]	5.4	(4.8-5.7)	4.9	(4.5-5.3)	0.439
LDL [mmol/l]	3.4	(2.7-3.8)	2.9	(2.5-3.6)	0.576
HDL [mmol/l]	1.1	(1.0-1.3)	1.1	(1.0-1.3)	0.636
TG [mmol/l]	1.6	(1.3-2.0)	1.4	(1.2-1.9)	0.675
hs-CRP [mg/l]	2.0	(1.1-6.1)	8.0	(1.4-26.1)	0.050

Данните са представени като средна стойност (SD) или медиана (25-75 перцентил)

Възрастта, полът и hs-CRP са значими предиктори за когнитивно влошаване при изписване. Нарастването на възрастта с 1 година и на hs-CRP с 1 mg/l води съответно до почти 30% и 12% увеличение в odds болните да имат съдово когнитивно нарушение при изписване (Таблица 7). Нещо повече, 6 пъти е по-вероятно жените да имат когнитивно нарушение в острата фаза на инсулта в сравнение с мъжете. Дискриминационната способност на модела бе оценена с ROC анализ (ROC = 0.937 (0.873-1.001)). В почти 94 % от случаите на всички възможни двойки болни, при

които единият е с нормален когнитивен статус, а другият с когнитивно нарушение, моделът ще покаже по-голяма вероятност за лицето с когнитивна дисфункция. Оптималната чувствителност на модела е 90%, а специфичността – 82 %. Добавянето на систоличното кръвно налягане към комплекса от независими променливи (модел 2) доведе до значимо подобрение в описанието на данните ( $\chi^2=34.64$ ;  $p=0.000$ ). Четирите независими променливи обясняват 70% от варианса. Възрастта и hs-CRP остават значими прогностични фактори за когнитивния статус, но полът не достига статистическа значимост. Значим предиктор е и систоличното кръвно налягане при постъпване. Отпадането на значимостта на пола може да се обясни с полово-специфичната вариация на кръвното налягане, обусловена от генетични фактори (*Franceschini N et al, 2006*). Площта под ROC кривата е 0.896 (0.806-0.986). Оптималната чувствителност на модела е 80 %, а специфичността - 81%. Модел с независима променлива ниво на глюкоза в кръвта при постъпване не бе конструиран поради наличието на корелационна връзка със систоличното кръвно налягане ( $R_s=0.358$ ;  $p=0.016$ ), а също и за да се отговори на изискването минималната стойност на отношението брой случаи/брой независими променливи да е  $>10$ .

**Таблица 8** Логистични регресионни модели на прогностични фактори за когнитивно влошаване при изписване

	В	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	95,0% C.I. for EXP(B)		
							Долна	Горна	
Модел 1	Възраст	0.261	0.090	8.318	1	0.004*	1.298	1.087	1.549
	Пол	1.786	0.888	4.046	1	0.044*	5.966	1.047	33.997
	hs-CRP	0.112	0.057	3.862	1	0.049*	1.118	1.000	1.250
	Константа	-19.592	6.112	10.276	1	0.001	0.000		
Модел 2	Възраст	0.332	0.121	7.513	1	0.006*	1.394	1.099	1.767
	Пол	1.295	1.016	1.625	1	0.202	3.649	0.499	26.712
	hs-CRP	0.148	0.075	3.906	1	0.048*	1.159	1.001	1.342
	Систолично Р	0.052	0.026	4.189	1	0.041*	1.054	1.002	1.108
	Constant	-31.846	10.790	8.710	1	0.003	0.000		

### 3. Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта при остър хеморагичен инсулт

#### *Оксидативна Активност на Периферни Фагоцити*

Базовите характеристики на изследваните болни са представени в Таблица 9. Пациентите са на възраст  $63\pm 12$  години, 50% – мъже. При постъпване в клиниката, оценката (медиана, 25–75 пърсентил) на неврологичния статус по Glasgow кома скалата е 11 (9-12) точки. Тежестта

на неврологичния дефицит при постъпване в клиниката по скалата на Mathew е 46 (32-60), а при изписване, съгласно NIHSS, е 19 (16-25) точки.

**Таблица 9** Демографски и клинични характеристики на болни с остър sICH

Параметър	Остър sICH (n= 46)	
Възраст [години]	63	(12)
Мъжки пол, n (%)	23	(50.0)
<b>Съдови рискови фактори</b>		
Артериална хипертония, n (%)	40	(87)
Систолично кръвно налягане [mm Hg]	186	(35)
Диастолично кръвно налягане [mm Hg]	103	(18)
Ишемична болест на сърцето, n (%)	10	(22)
Диабет, n (%)	4	(9)
Злоупотреба с алкохол, n (%)	28	(61)
Тютюнопушене, n (%)	17	(37)
<b>Неврологична оценка</b>		
MSS при постъпване [точки]	46	(32-60)
GCS при постъпване [точки]	11	(9-12)
NIHSS при изписване [точки]	19	(16-25)
<b>Радиологични променливи</b>		
Локализация, n (%)		
Базални ганглии	34	(74)
Лобарен	6	(13)
Субтенториален	6	(13)
Обем на хематома [ml]	37.9	(16.5)
<b>Биохимични показатели при постъпване</b>		
WBC [ $\times 10^9/l$ ]	10.2	(3.5)
GLU [mmol/l]	6.6	(5.5-8.1)
CHL [mmol/l]	5.90	(1.32)
Фибриноген [g/l]	3.85	(1.17)
TG [mmol/l]	1.45	(0.67)

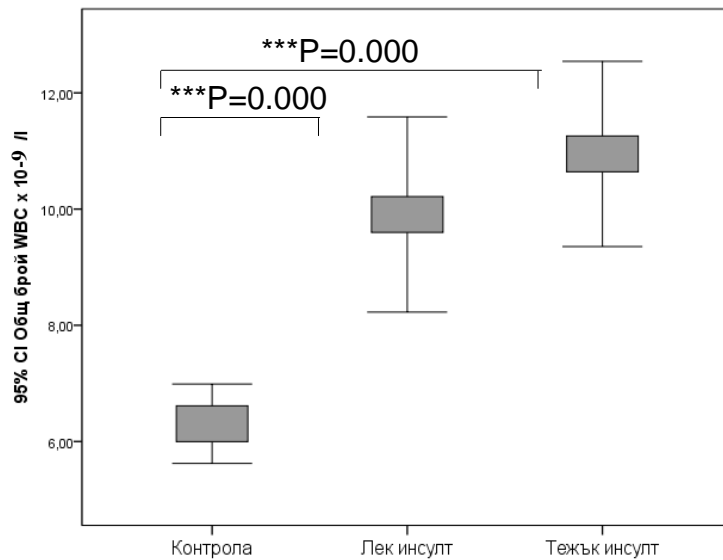
Данните са представени като средна стойност (SD) или медиана (25-75 перцентил)

Двадесет и осем % от болните са починали през първата седмица, а 76 % от преживелите инсулта лица са с неблагоприятен клиничен изход.

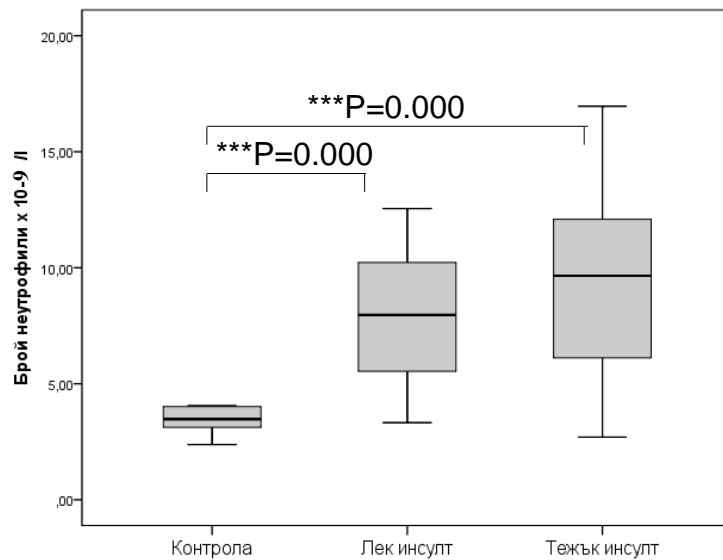
#### *Биохимични показатели на кръвта*

Установяваме увеличен брой WBC ( $F=22.180$ ,  $p=0.000$ ) и неутрофили ( $\chi^2=18.326$ ,  $p=0.000$ ) при болните с хеморагичен инсулт през първите 48 часа от началото на инцидента в сравнение с контролата. Увеличеният брой се запазва и през втората седмица след инцидента (Paired sample t test,  $p=0.236$ ). Броят WBC корелира с тежестта на неврологичния дефицит, съгласно NIHSS ( $r=0.32$ ;  $p=0.042$ ) и скалата на Mathew ( $R_s=-0.28$ ;  $p=0.034$ ). Значимо намалява броят лимфоцити на болните със sICH спрямо контролата ( $\chi^2=7.742$ ,  $p=0.005$ ). Факторът „тежест на инсулта” не е значим за този брой. Няма разлика в броя на другите клетки на кръвта, нивото на общия холестерол, фибриногена и триглицеридите.

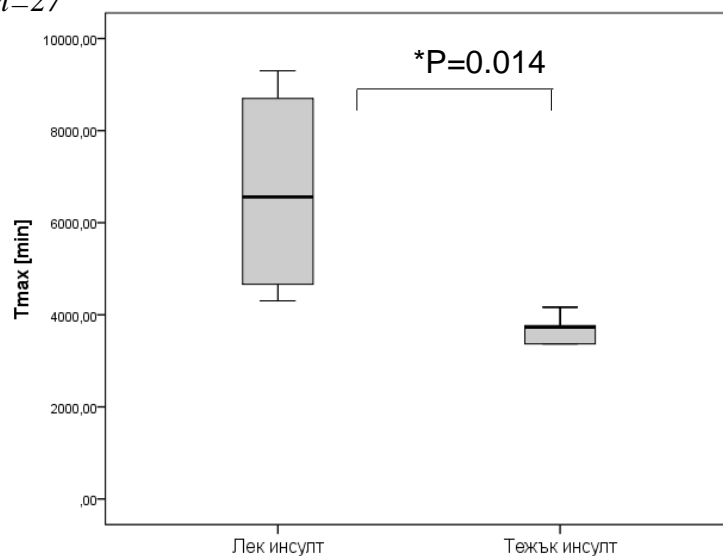




**Фиг. 31** Брой левкоцити при хеморагичен инсулт. Контрола,  $n=18$ ; лек инсулт,  $n=31$ ; тежък инсулт  $n=27$



**Фиг. 32** Брой неутрофили при хеморагичен инсулт. Контрола,  $n=18$ ; лек инсулт,  $n=31$ ; тежък инсулт  $n=27$



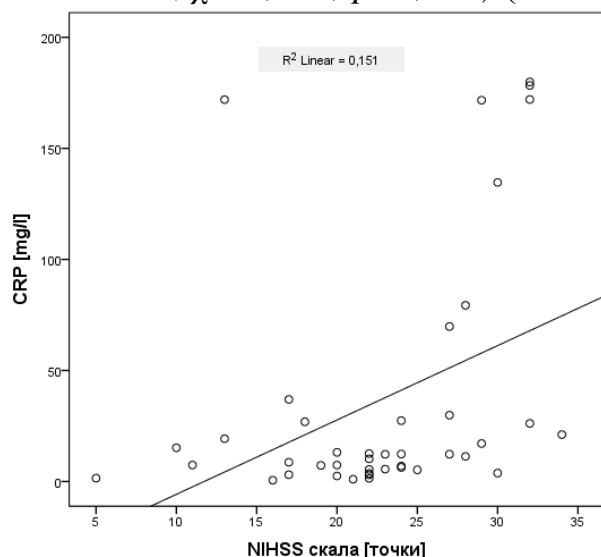
**Фиг. 33** fMLP-стимулирана Extra LCL при хеморагичен инсулт, време до пика  $T_{max}$

### Стимулирана продукция на ROS от периферни фагоцити

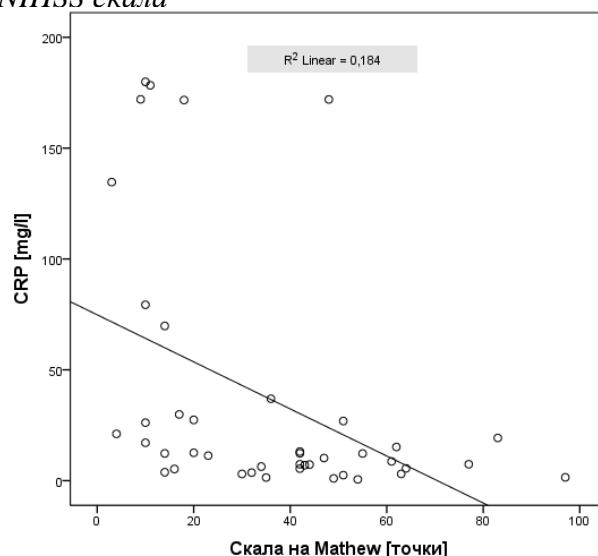
Времето до пика  $T_{max}$  на Extra LCL (fMLP) е по-малко при болните с тежък спрямо тези с лек инсулт, т.е. скоростта на активиране на клетките за извънклетъчно радикалообразуване при тях е по-висока (Фиг. 33).

### ***С-Реактивният Протеин – Индикатор за Клинична Тежест и Изход***

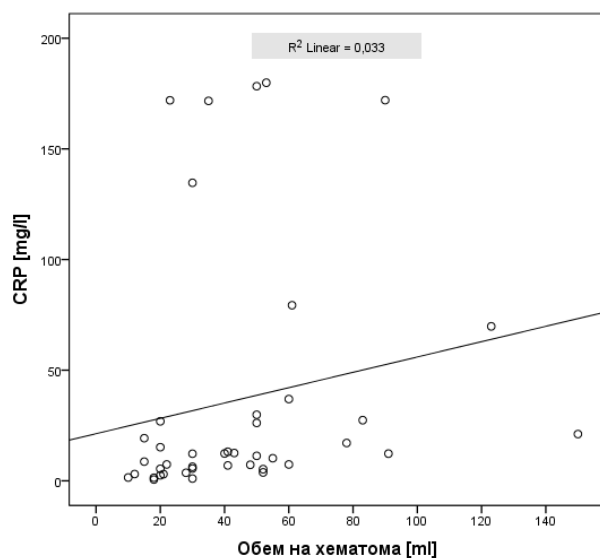
По-високи са серумните нива на CRP при болни с по-голяма степен на неврологичен дефицит (NIHSS,  $R_s= 0.440$ ,  $p=0.004$ ; Mathew,  $R_s=- 0.511$ ,  $p=0.001$ ) (Фиг. 34 и 35), както и с по-голям размер на хематома ( $R_s=0.504$ ,  $p=0.001$ ) (Фиг. 36). Най-високо е нивото на CRP при починалите пациенти ( $\chi^2=7.876$ ;  $p=0,019$ ) (Фиг. 37). Болни, показващи клинично влошаване също имат по-високи нива на CRP в сравнение с лицата с постепенно подобряващ се статус (*Kruskal Wallis test*,  $\chi^2=8,629$ ;  $p=0,013$ ) (Фиг. 37).



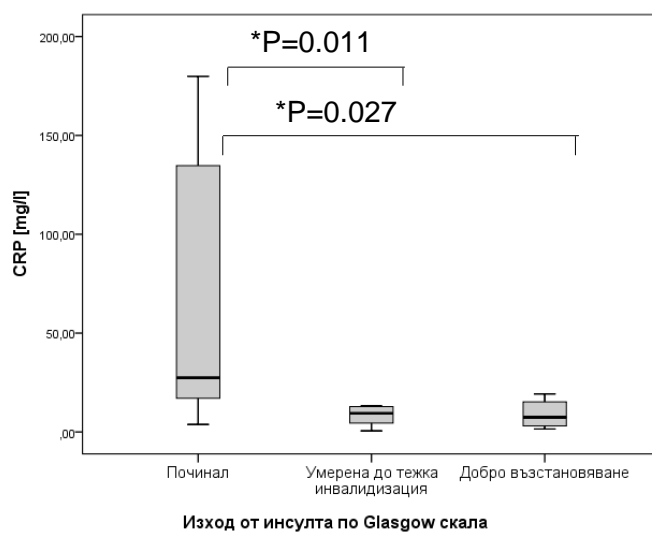
**Фиг. 34** Корелационна зависимост между CRP и тежестта на неврологичния дефицит, съгласно NIHSS скала



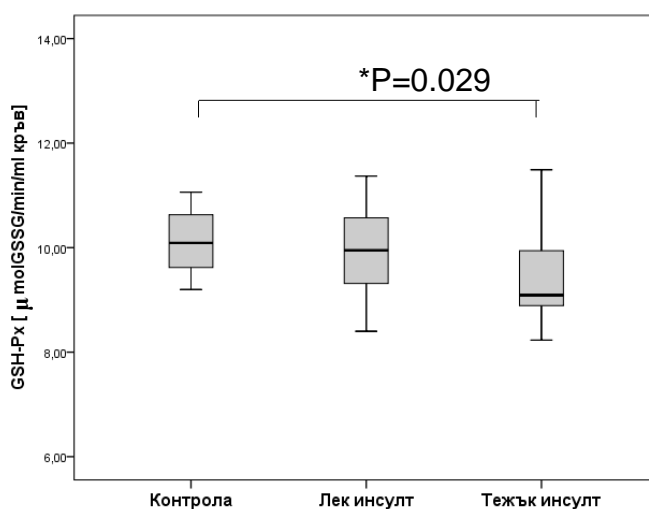
**Фиг. 35** Корелационна зависимост между CRP и тежестта на неврологичния дефицит на болните, оценен по скалата на Mathew



**Фиг. 36** Корелационна зависимост между серумното ниво на CRP и обема на хематома



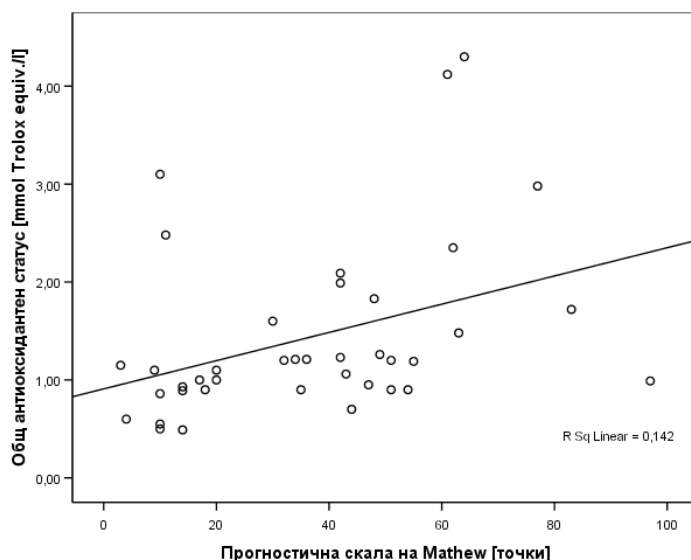
**Фиг. 37** CRP в зависимост от изхода от инсульта, оценен по скалата на Glasgow



**Фиг. 38** Глутатион пероксидазна активност на кръвта в зависимост от тежестта на инсульта

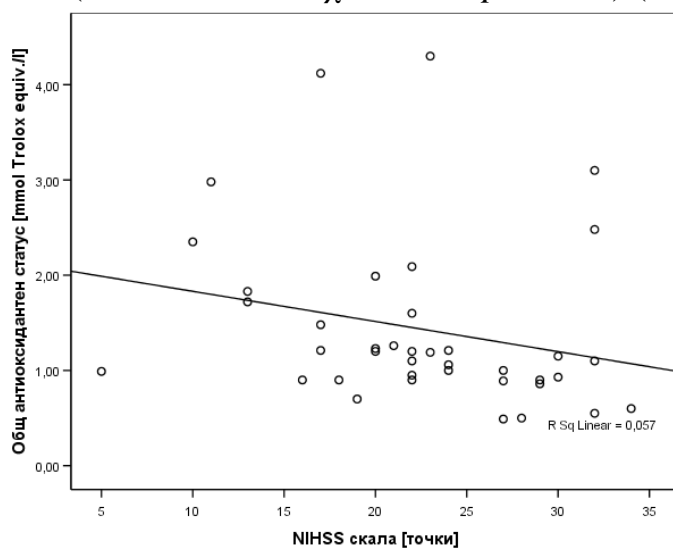
### Компоненти от Антиоксидантния Капацитет на Периферната Кръв

Не се установява разлика в CTS активност на кръвта, CuZn SOD в еритроцитите и съдържанието на SH групи в кръвта между контролата и болните при постъпване в клиниката. Глутатион-пероксидазната активност на кръвта намалява само в групата на тежките инсулти (Фиг. 38). Бе установено също така, че TAS корелира с тежестта на неврологичния дефицит, оценен по скалата на Mathew ( $R_s=0.441$ ,  $p=0.005$ ) (Фиг. 39) и NIHSS скалата ( $R_s=-0.368$ ,  $p=0.021$ ) (Фиг. 40).

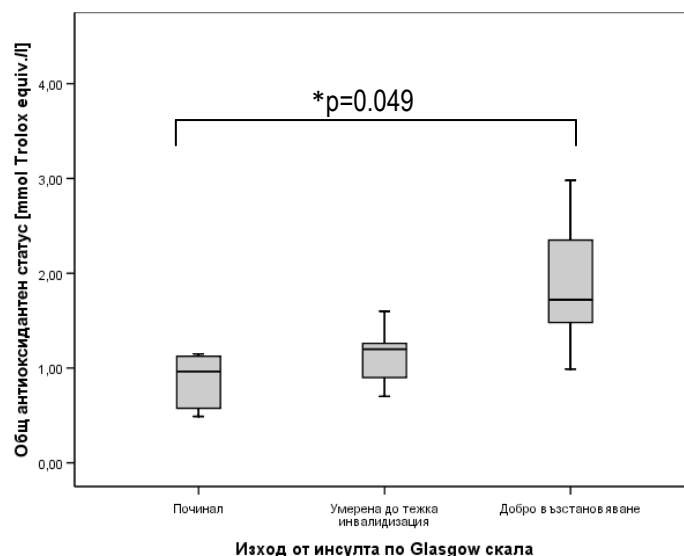


**Фиг. 39** Корелационна зависимост между общия антиоксидантен статус и тежестта на неврологичния дефицит, оценена по скалата на Mathew

С увеличаване на тежестта на дефицита, TAS на серума намалява. Нещо повече, показателят има най-ниско ниво при пациентите, починали скоро след инсулта, а най-високо - при тези, показващи добро възстановяване, съгласно GOS скалата ( $Kruskal-Wallis$ ,  $\chi^2=6.029$ ,  $p=0.049$ ) (Фиг. 41).



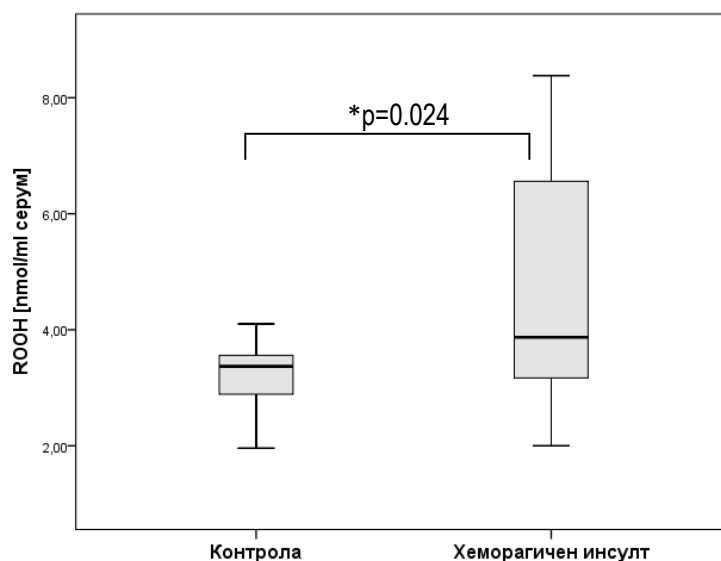
**Фиг. 40** Корелационна зависимост между общия антиоксидантен статус и тежестта на неврологичния дефицит, оценена по NIHSS



**Фиг. 41** Общ антиоксидантен статус на серума в зависимост от клиничния изход, оценен по Glasgow скала за изход

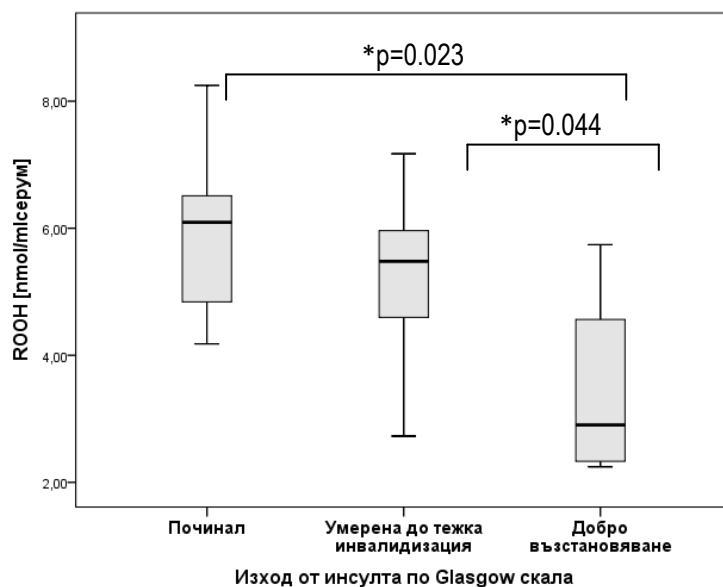
### Степен на Оксидативно Увреждане

Има публикувани данни, сочещи участие на свободните радикали и липидната пероксидация в патофизиологичните промени на sICH. Преки доказателства за образуването на хидроксилен радикал в мозъчната тъкан има при експериментални модели на исхемичен инсулт (*Kil HY et al, 1996*). Доколкото ни е известно, до момента има проведено само едно клинично проучване, потвърждаващо хипотезата за наличието на индуцирано от свободни радикали оксидативно увреждане на мозъчния паренхим след sICH (*Mantle D et al, 2001*).

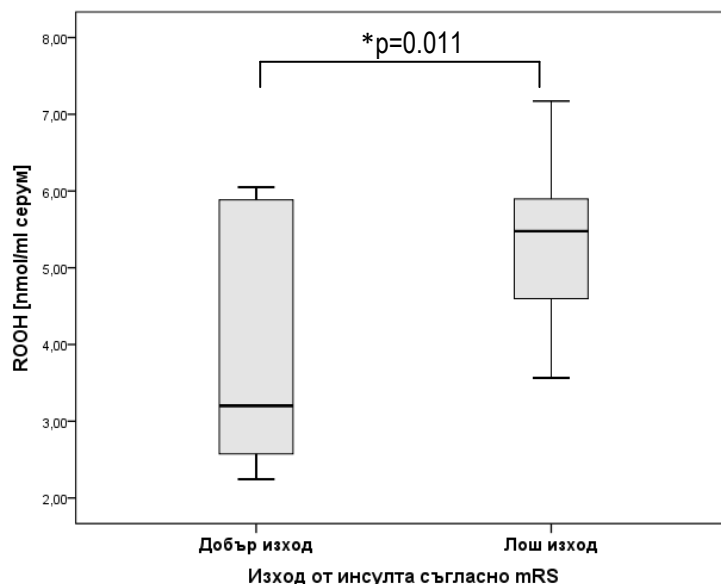


**Фиг. 42** Серумно ниво на липидни хидропероксиди при болни с хеморагичен инсулт и контроли

Малко са данните относно оксидативния статус на кръвта при болни след sICH, някои от които противоречиви (Aygul R et al, 2005; Zarkovic N et al, 2004). Ние си поставихме за цел да проучим евентуалната връзка между нивото на серумните липидни хидропероксиди и степента на неврологичния дефицит и клиничен изход след sICH. Нивото на ROOH в серума на болните, оценено през първите 48 часа от началото на инсулта е по-високо от това на контролната група ( $Z=-2.259$ ,  $p=0.024$ ) (Фиг. 42).



**Фиг. 43** Серумното ниво на липидните хидропероксиди в зависимост от клиничния изход, оценен по Glasgow скала за изход



**Фиг. 44** Серумното ниво на липидните хидропероксиди в зависимост от клиничния изход, оценен по модифицираната скала на Rankin

Нещо повече, нивото корелира с тежестта на неврологичния дефицит, оценен по NIHSS ( $r=0.418$ ,  $p=0.004$ ). Най-ниско е нивото на ROOH при

болните, показващи добро възстановяване, съгласно GOS ( $H=6.726$ ,  $p=0.035$ ) (Фиг. 44). Показателят има по-високо ниво при пациентите с лош изход, оценен по mRS (Фиг. 45), а също и при лицата, починали наскоро след инсулта (Фиг. 44). Няма значими различия в нивото на TBARM на кръвта между болните и контролата.

### ***Независими Прогностични Фактори за Инвалидизация и Леталитет***

Базовите характеристики и потенциалните фактори, свързани със смъртността и изхода от sICH при изписване на пациентите са представени в Таблица 10.

#### *Предиктори за летален изход*

Починали са 13 (28.3%) от общо 46 пациенти. Оценката на неврологичния статус и по четирите използвани скали е значимо свързана с леталния изход. От изследваните биохимични показатели, базовите стойности на серумните нива на CRP (Mann-Whitney test,  $P=0.003$ ) и липидните хидропероксиди (Student's t test,  $p=0.050$ ) са значими фактори за смъртността. Обемът на хематома (Student's t test,  $p=0.000$ ) също е значимо свързан с леталния изход от заболяването на първата седмица след инцидента. Петдесет и девет процента от пациентите имат нива на CRP по-високи от 6 mg/l при постъпване в болницата. Тридесет и три процента от тях имат ниво на CRP в най-ниския 25<sup>-ти</sup> квантил, а 26 % - в най-високия 75<sup>-ти</sup> квантил. Двадесет и шест процента от пациентите имат ниво на липидни пероксиди в най-ниския 25<sup>-ти</sup> квантил и 25 % - в най-високия 75<sup>-ти</sup> квантил. Двадесет и шест процента имат обем на кръвоизлива в най-ниския 25<sup>-ти</sup> квантил, а 28 % - в най-високия 75<sup>-ти</sup> квантил. В таблица 11 са представени данните от бинарния логистичен регресионен модел и odds отношенията за всеки от факторите. Тъй като леталният изход от инсулта е дихотомна зависима променлива, ние си поставихме за цел да оценим предиктивната способност на статистически значимите фактори върху леталния изход посредством бинарна логистична регресия. Тъй като броят на изследваните пациенти е 46, следователно при въвеждането и на трите статистически значими променливи в предиктивния модел се обезпечава отношение брой случаи /брой независими променливи 15, което е по-голямо от минималното допустимо отношение от 10. При обработката на данните бе установено наличието на два аутлайера, които бяха изключени от анализа, тъй като тяхното изключване подобри точността на регресионния модел с 3,8%. Отсъствието на мултиколинеарност между независимите променливи бе потвърдена въз основа на стандартните грешки на В-коефициентите ( $< 2.0$ ).

**Таблица 10** Базови характеристики и потенциални базови фактори, свързани с леталитета и изхода при изписване

Параметър	Леталитет на 1-ва седмица			Изход при изписване		
	Не n= 33	Да n= 13	P	Добър (mRS 0-2), n= 8	Лош (mRS 3-5), n= 25	P
Възраст [години]	63 (10)	62 (15)	0.802	63 (11)	63 (10)	0.873
Мъжки пол, n (%)	18 (55)	5 (39)	0.326	5 (63)	13 (52)	0.604
<b>Съдови рискови фактори</b>						
Артериална хипертония, n (%)	29 (88)	11 (85)	0.767	6 (75)	23 (92)	0.200
Систолично P [mm Hg]	184 (37)	193 (30)	0.420	201 (48)	178 (33)	0.128
Диастолично P [mm Hg]	100 (19)	111 (14)	0.067	106 (14)	98 (20)	0.278
ИБС, n (%)	10 (30)	0	0.042	2 (25)	8 (32)	0.708
Диабет, n (%)	3 (9)	1 (8)	0.880	0	3 (12)	0.304
Злоупотреба с алкохол, n (%)	21 (64)	7 (54)	0.540	5 (63)	16 (64)	0.939
Тютюнопушене, n (%)	14 (42)	3 (23)	0.221	5 (63)	9 (36)	0.187
<b>Неврологична оценка</b>						
MSS при постъпване [точки]	52 (41-63)	17 (5-44)	0.000*	63 (59-69)	47 (40-57)	0.008*
GOS при постъпване [точки]	11 (11-13)	7 (6-10)	0.000*	13 (11-13)	11 (10-12)	0.036*
NIHSS при изписване [точки]	18 (15-23)	27 (19-29)	0.002*	14 (8-16)	20 (18-24)	0.000*
<b>Радиологични променливи</b>						
Локализация, n (%)						0.780
Базални ганглии	24 (73)	10 (77)		5 (63)	19 (76)	
Лобарен	5 (15)	1 (8)		2 (25)	3 (12)	
Инфратенториален	4 (12)	2 (15)		1 (13)	3 (12)	
Обем на хематома [ml]	32.4 (12.7)	51.7 (17.2)	0.000*	25.6 (5.3)	34.6 (13.7)	0.083
<b>Биохимични показатели при постъпване</b>						
WBC [ $\times 10^9/l$ ]	9.9 (3.2)	11.1 (4.1)	0.284	10.3 (3.1)	9.7 (3.3)	0.672
GLU [mmol/l]	6.5 (5.6-8.1)	6.6 (5.2-8.2)	0.903	6.7 (5.4-8.0)	6.1 (5.6-8.1)	0.933
CHL [mmol/l]	5.88 (1.47)	5.95 (0.89)	0.878	5.66 (0.98)	5.95 (1.61)	0.635
Фибриноген [g/l]	3.88 (1.01)	3.77 (1.61)	0.832	4.18 (0.78)	3.80 (1.01)	0.355
TG [mmol/l]	1.41 (0.68)	1.56 (0.65)	0.512	1.66 (0.63)	1.34 (0.69)	0.249
CRP [mg/l]	6 (5-24)	54 (24-69)	0.003*	9 (5-41)	6 (5-24)	0.761
ROOH [nmol/ml]	4.9 (1.3)	5.8 (1.2)	0.050*	4.0 (1.7)	5.3 (1.0)	0.011*

Данните са представени като средна стойност (SD) или медиана (25-75 пърсентил)

Наличието на връзка между леталния изход от инсулта на първата седмица и комбинацията от предикторните независими променливи бе потвърдена от значимостта на  $\chi^2$  блока ( $\chi^2=30,294$ ;  $p=0.000$ ). Wald тестът на В-коэффициентите на предикторите показва, че серумното ниво на CRP ( $p=0.027$ ) и обемът на хематома ( $p=0.005$ ) са независими предиктори на летален изход. Данните сочат, че нарастването с единица на концентрацията на CRP и обема води съответно до 5.2% и 15,6 % увеличение в odds пациентите да имат летален изход от инсулта. Nagelkerke  $R^2$  показва, че 74 % от вариациите в леталния изход от инсулта могат да се обяснят с този логистичен модел. Hosmer-Lemeshow статистиката потвърди доброто фитване на модела към данните ( $p=0.665$ ). Площта под ROC кривата бе използвана за оценка на дискриминационната способност на модела (ROC площ = 0.972; SE=0,023). Оптималната чувствителност е 90% , а специфичността - 90%.

*Предиктори за клиничен изход при преживелите инсулта лица*

От изследваните лица, 8 са с благоприятен изход при изписване, а 25 са тежко инвалидизирани. Статистическият анализ показва, че плазменото



ниво на ROOH (Student's t test, P=0.011) е значимо свързано с изхода от заболяването (Таблица 12). Размерът на хематома (Student's t test, P=0.083) приближава, но не достига статистическа значимост. Наличният брой случаи (33) е достатъчен да се приложи бинарна логистична регресия при йерархично въвеждане на променливите. Отсъствието на мултиколинеарност между независимите променливи бе потвърдено въз основа стойността на стандартните грешки на В-коэффициентите, които имаха стойност < 2.0.

**Таблица 11** Логистичен регресионен модел за леталитет на I<sup>6a</sup> седмица след sICH

Променливи	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	CI for Exp(B)	
							Долна	Горна
CRP [mg/l]	0,051	0,023	4,861	1	0,027	1,052	1,006	1,101
ROOH [nmol/ml]	1,251	0,681	3,374	1	0,066	3,493	0,920	13,271
Обем на хематома [cm <sup>3</sup> ]	0,145	0,052	7,915	1	0,005	1,156	1,045	1,280
Константа	-16,664	6,114	7,430	1	0,006	0,000		

*S.E.* – стандартна грешка, *df* – степен на свобода, *CI* – 95,0% доверителен интервал, *Exp(B)* – odds отношение

Наличието на връзка между изхода от инсулта и комбинацията от независими променливи (ROOH и обем на хематома) бе установено посредством статистическата значимост на  $\chi^2$  блока ( $\chi^2=8.639$ ;  $p=0.013$ ). Wald тестът на В-коэффициентите на предикторите показва, че само липидните хидропероксиди са независим предиктор за клиничен изход ( $p=0.035$ ).

**Таблица 12** Логистичен регресионен модел за лош изход от sICH при изписване

Променливи	B	S.E.	Wald	df	p	Exp(B)	CI for Exp(B)	
							Долна	Горна
ROOH [nmol/ml]	0,755	0,358	4,451	1	0,035	2,127	1,055	4,287
Обем на хематома [cm <sup>3</sup> ]	0,640	0,044	2,066	1	0,151	1,066	0,977	1,162
Константа	-4,258	2,080	4,189	1	0,041	0,014		

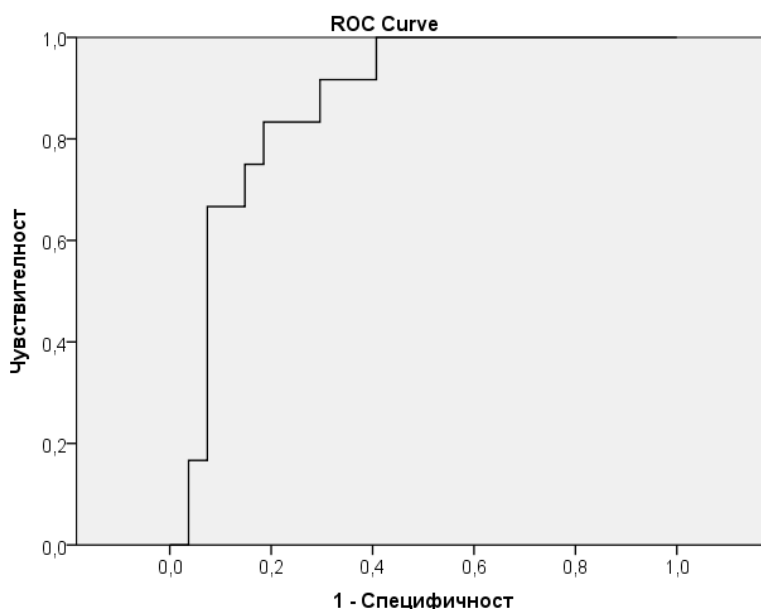
*S.E.* – стандартна грешка, *df* – степен на свобода, *CI* – 95,0% доверителен интервал, *Exp(B)* – odds отношение

Nagelkerke R<sup>2</sup> показва, че 34% от вариациите в клиничния изход могат да се обяснят с този логистичен модел. Статистиката на Hosmer и Lemeshow установи, че моделът добре описва данните ( $p=0.331$ ). Площта под ROC кривата е 0.810 (SE=0.097), което означава, че в почти 81% от всички възможни двойки пациенти, при които единият пациент има лош, а

другият - добър изход от инсульта, моделът ще покаже по-висока вероятност за пациента с лош изход. Оптималната чувствителност на модела е 64%, а специфичността - 62%.

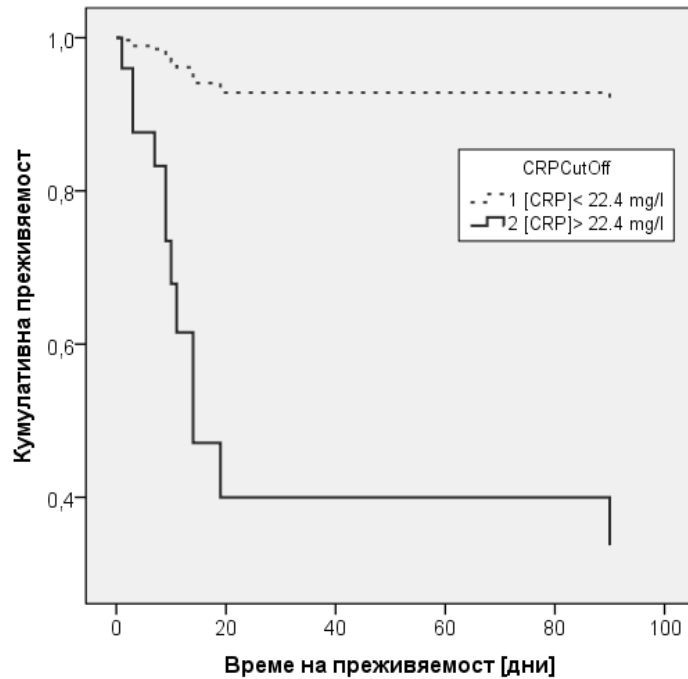
По-нататък в друга група от 42 пациенти след остър хеморагичен инсулт си поставихме за цел да съпоставим преживяемостта на болните след инцидента в зависимост от нивата на маркери за възпаление в циркулацията при постъпване в болницата. Установява се, че значимите променливи по отношение на фактора „леталитет за период от 6 месеца” след инцидента са показателите за неврологичен статус, локализацията на хематома, обемът на хематома, серумните нива на hs-CRP и TAS при постъпване в болницата. Изследваните болни бяха разделени на 2 групи въз основа на cut-off стойностите на двата биохимични показателя, определени с помощта на ROC анализ. На фиг. 45 е представена ROC крива за hs-CRP като предиктор за леталитет. Площта под кривата е 0.870 (95% CI 0.757-0.984),  $p=0.000$ . Cut-off стойността за CRP, при която специфичността и чувствителността са максимални (82% и 83%, съответно) е 22.4 mg/l. Площта под ROC кривата за TAS като предиктор за леталитет, при максимална специфичност и чувствителност е 0.713 (95% CI 0.518-0.908),  $p=0.036$ .

По отношение на серумното ниво на hs-CRP при постъпване в болницата, времената на преживяемост на двете групи пациенти бяха сравнени с помощта на анализа на Kaplan-Maier (Фиг. 46).



**Фиг. 45** ROC крива на CRP като прогностичен фактор за леталитет

Log-rank тестът показва, че има достоверна разлика между групите ( $\chi^2=15.693$ ,  $p=0.000$ ). Болни с ниво на hs-CRP > 22.4 mg/l при постъпване имат значимо по-ниска преживяемост.



**Фиг. 46** Криви на преживяемост на Kaplan-Maier, сочещи наличие на връзка между серумното ниво на hs-CRP и леталитета в продължение на 6 месеца след sICH

За да проверим дали значимостта на разликата между групите се запазва и след корекция по отношение на демографските фактори, бе проведен COX регресионен анализ. Таблица 13 задава p-стойността и hazards отношението (Exp(B)) на промеливите, включени в модела – hs-CRP, възраст и пол. Отсъствието на мултиколинеарност се потвърждава от ниската стойност на стандартните грешки на участващите променливи. Двете групи болни въз основа на cut-off стойността на CRP са значимо различни (HR=0.108, p=0.000), което означава, че лицата със серумни нива на CRP >22.4 mg/l е по-вероятно да имат по-ниска преживяемост след инцидента при отчитането на пола и възрастта.

**Таблица 13** COX регресионен анализ

	B	SE	Wald	df	p	Exp(B)	95.0% CI за Exp(B)	
							Долна	Горна
Hs-CRP [mg/l]	-2,493	,710	12,322	1	,000	,083	,021	,333
Възраст	-,006	,025	,066	1	,798	,994	,947	1,043
Пол	-2,163	1,084	3,977	1	,046	,115	,014	,963
CRP*Пол	1,519	1,581	,923	1	,337	4,567	,206	101,287

Нещо повече, полът също е значима променлива в модела, което сочи по-ниска преживяемост за болните от женски пол. След отчитането на взаимодействието между двата фактора, което в случая не е значимо, (p=0.337) може да се заключи, че лицата със серумни нива на CRP >22.4 mg/l е по-вероятно да са с по-ниска преживяемост независимо от възрастта и пола.

По отношение на нивата на TAS при постъпване, Log-rank тестът показва, че няма статистически значима разлика между преживяемостта на групите ( $\chi^2=0.333$ ,  $p=0.564$ ).

#### 4. Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта в хроничния стадий на мозъчен инсулт

##### *Оксидативна Активност на Периферни Фагоцити*

Изследвани са 26 пациенти, постъпили за рехабилитация два до девет месеца след прекаран тежък инсулт във Втора неврологична клиника към УМБАЛ – Плевен. Базовите характеристики на болните са представени в Таблица 14.

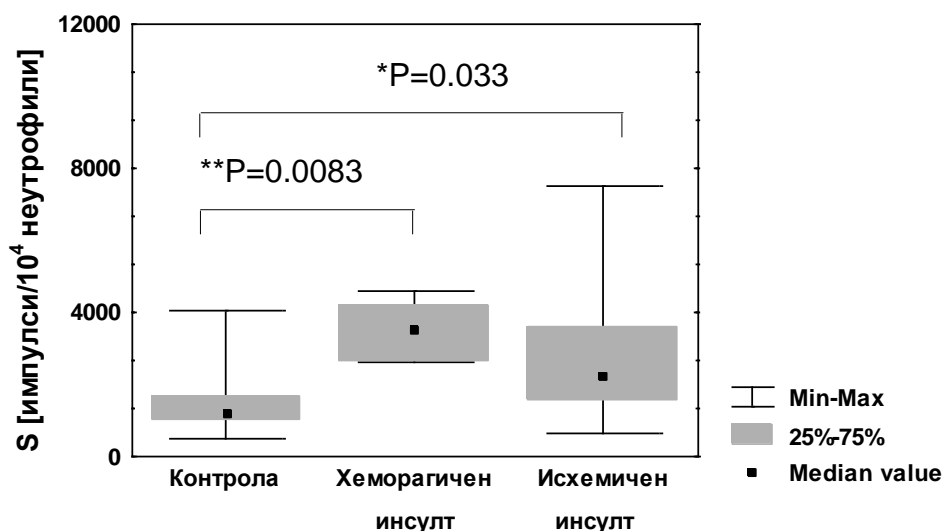
**Таблица 14** Демографски и клинични характеристики на пациентите с инсулт в хроничен стадий

Параметър	Пациенти с инсулт в хроничен стадий (n=26)
Възраст [години], средна стойност (SD)	61 (9)
Мъжки пол, n (%)	15 (58)
<b>Съдови рискови фактори</b>	
Артериална хипертония, n (%)	10 (38)
Диабет, n (%)	4 (40)
Тютюнопушене, n (%)	3 (12)
<b>Неврологична оценка</b>	
mRS, медиана (25 – 75 пърсентил)	4(4-5)
<b>Локализация на инфаркта</b>	
Дясна хемисфера, n (%)	12 (46)
Лява хемисфера, n (%)	14 (54)
<b>Биохимични показатели при постъпване</b>	
WBC [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	6.6 (1.6)
Неутрофили [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	4.4 (1.3)
Лимфоцити [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	1.75 (0.60)
Тромбоцити [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	246 (76)
RBC [ $\times 10^{12}/l$ ], медиана (25 – 75 пърсентил)	4.67 (0.70)

Шестнадесет от пациентите са след исхемичен инсулт (средна възраст  $62.0 \pm 8.7$  години; 9 мъже и 7 жени), а 10 - след хеморагичен инсулт (средна възраст  $59.7 \pm 5.8$  години; от които 6 мъже и 4 жени). Инсултът е разглеждан като тежък при огнищна лезия над 30 mm в диаметър и глобална клинична преценка на състоянието на изхода  $> 4$  по скалата на Ранкин (Van Swieten JC et al, 1988).

Измерена е спонтанната LCL и екстрацелуларна LCL на периферни фагоцити, стимулирани по опсонин-зависим и независим рецепторен механизъм. Статистическият анализ показва, че фагоцитите на пациентите имат по-висока спонтанна LCL спрямо контрола (Фиг. 47). Спонтанната LCL не зависи от типа на инсулта ( $H=2.56$ ;  $p=0.11$ ) и остава висока през

целия изследван период ( $H=1.06$ ;  $p=0.59$ ). Екстра LCL на болните е неразличима от контролата и за двата механизма на стимулация.



**Фиг. 47** Спонтанна LCL при болни с инсулт в хроничен стадий, площ под кривата S

**Таблица 15** Образуване на ROS от периферни левкоцити при пациенти с инсулт в хроничен стадий и контроли

Параметър	Контрола	Хеморагичен инсулт	Исхемичен инсулт
Спонтанна LCL, площ под кривата S [импулси/ $10^4$ Neu]	1178 (473 – 4058)	3477 (2605 – 4601)	2210 (645 – 7513)
Опсонин-зависима Екстра LCL, S [импулси/ $10^4$ (Neu+Mo)]	2224 (386 – 15825)	4509 (1139 – 10301)	3757 (564 – 20853)
Опсонин-независима Екстра LCL, S [импулси/ $10^4$ (Neu+Mo)]	1686 (828 – 5855)	1977 (748 – 28376)	2578 (954 – 7687)

Данните са представени като медиана (min-max стойност).

### Компоненти от Антиоксидантния Капацитет на Периферната Кръв

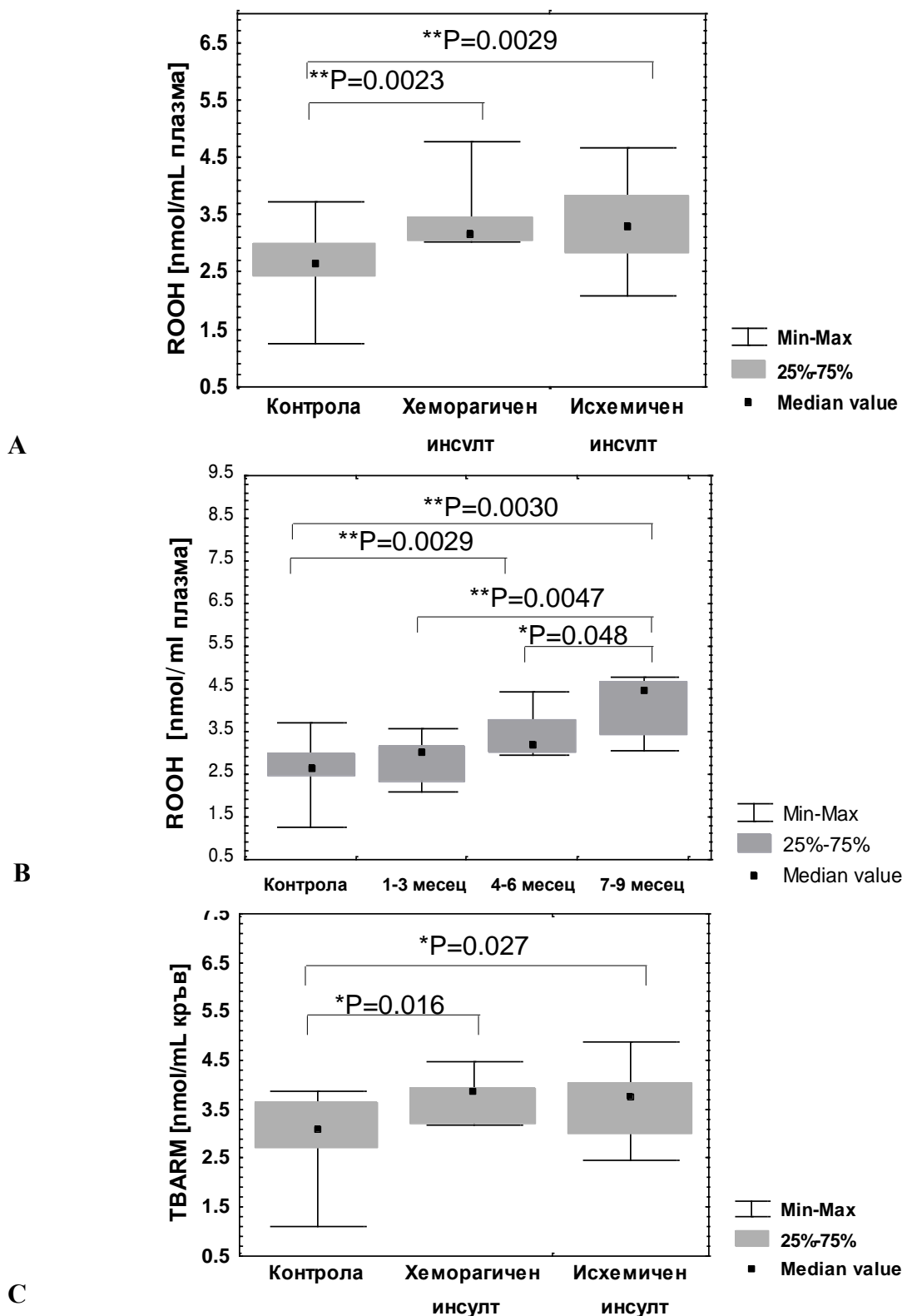
Няма разлика между стойността на показателите от антиоксидантния капацитет на кръвта на пациентите и контрола (Таблица 16).

**Таблица 16** Параметри на кръвния антиоксидантен капацитет при инсулт в хроничен стадий и контрола

Параметър	Контрола	Хеморагичен инсулт	Исхемичен инсулт
SOD [U/ $10^9$ RBC]	27.04 (20.21 – 33.28)	24.74 (14.52 – 34.91)	27.34 (11.18 – 58.33)
CTS [kU/ml]	32.60 (24.07 – 42.25)	29.65 (22.62 – 44.28)	29.76 (17.04 – 39.32)
GSH-Px [ $\mu$ mol GSSG/min/ml]	9.28 (7.36 – 10.40)	9.43 (7.43 – 13.71)	10.86 (8.97 – 13.37)
SH [ $\mu$ mol/ml]	4.31 (3.28 – 5.63)	4.11 (3.53 – 5.45)	4.08 (3.05 – 4.75)

Данните са представени като медиана (min-max стойност).

Следователно след промените настъпили през острата фаза на инсулта (*Gruener N et al, 1994; Spranger M et al, 1997*), този капацитет се възстановява до нормални стойности.



**Фиг. 48** Продукти на липидната пероксидация в циркулацията при инсулт в хроничен стадий. (А) ROOH в зависимост от типа на инсулта; (В) Промяна на ROOH с времето. (С) Зависимост на TBARM от типа на инсулта

### ***Степен на Оксидативно Увреждане***

Ние установяваме завишена концентрация на ROOH в плазмата при пациенти в хроничния стадий на исхемичен и хеморагичен инсулт спрямо контролната група (Фиг. 48 А). Тя не зависи от типа на инсулта ( $H=0.13$ ;  $p=0.71$ ), но значимо се увеличава с времето от неговото начало ( $H=9.72$ ,  $p=0.0078$ ) (Фиг.48 В). Концентрацията на TBARM в кръвта е увеличена при болните спрямо контролната група (Фиг.48 С). Тя не зависи от типа на инсулта ( $H=0.19$ ;  $p=0.66$ ) и времето от началото му ( $H=0.26$ ;  $p=0.88$ ).

### ***Независими Прогностични Фактори за Инвалидизация и Клиничен Изход***

*Базови характеристики и статистически значими фактори за когнитивно увреждане на първата година след инсулта*

Базовите характеристики и потенциалните фактори, свързани с когнитивния статус на болни с лек исхемичен инсулт на първата година са представени в Таблица 17. От 47 пациенти, включени в изследването, 26 (55%) са мъже. Пациентите са на възраст от 56 до 76 години (медиана 63). Четиридесет и три процента от болните са развили лек до умерен когнитивен дефицит в рамките на първата година след инсулта и 34 % са с риск от развитие на когнитивен дефицит. Възрастта, полът, нивото на образование, броят бели кръвни клетки на първата година и нивото на hs-CRP при постъпване в болницата са значими фактори за когнитивно увреждане на първата година след инсулта (Таблица 17).

*Динамика на броя периферни левкоцити, липиден профил и микроалбуминурия през първата година след инсулта*

Динамиката на WBC през първата година след инсулта е представена на фиг. 49. Установява се времева промяна в показателя към редуциране както при лицата с нормален когнитивен статус (Friedman test  $\chi^2(3)=20.309$ ;  $p=0.000$ ), така и при тези, показали когнитивно нарушение (Friedman test  $\chi^2(3)=10.484$ ;  $p=0.015$ ) на първата година. Значима разлика в броя левкоцити между отделните времеви точки се достига само при лицата с нормална когниция, предвид Bonferoni корекцията на  $p$  за множествени сравнения ( $p=0.083$ ) - постъпване с/о 3 месец ( $Z = -2.646$ ,  $P = 0.008$ ), 3<sup>-ти</sup> с/о 6<sup>-ти</sup> месец ( $Z = -2.823$ ,  $P = 0.005$ ); 6<sup>-ти</sup> месец с/о 1<sup>-ва</sup> година ( $Z = -2.796$ ,  $P = 0.005$ ) и между постъпване и 1<sup>-ва</sup> година ( $Z = -3.354$ ,  $P = 0.001$ ). Тестът на Kruskal-Wallis показва, че броят WBC през първата година е значимо по-висок при групата с когнитивно нарушение в сравнение с лицата с нормална когниция на първата година ( $\chi^2(1)=6.167$ ;  $p=0.013$ ).

От белите кръвни клетки, отговорни за наблюдаваната разлика в общия брой левкоцити между двете групи пациенти са гранулоцитите, тъй като само при тях се достига статистическа значимост. Greenhouse-Geisser тестът от General Linear Model Repeated Measures не показва наличие на промяна с времето в броя гранулоцити ( $F=2.919$ ;  $p=0.078$ ) и при двете изследвани групи. Броят GRA през първата година е значимо по висок при групата с когнитивно нарушение ( $F=8.205$ ;  $p=0.006$ ). Разликата остава значима и след корекция за възраст и пол ( $F=7.042$ ;  $p=0.011$ ). Не се установява динамика, както и разлика между двете групи пациенти в липидния профил – общ холестерол, LDL, HDL, TG и CHOL/HDL.

Отношението албумин-креатинин е по-високо при групата с когнитивно нарушение (Between-subject test,  $F=7.134$ ;  $p=0.010$ ), като значимостта на разликата се запазва и след корекция за пол и възраст ( $F=4.408$ ;  $p=0.042$ ). Няма статистически значима динамика в това отношение с времето и при двете изследвани групи (Greenhouse-Geisser  $F=2.525$ ;  $p=0.117$ ).

#### *Динамика на неврологичния и когнитивен статус на пациентите*

Установява се динамика в неврологичната оценка по NIHSS на пациентите с нормален когнитивен статус за период от една година (Friedman test  $\chi^2(3)=23.071$ ;  $p=0.000$ ). Нещо повече, неврологичната оценка на болните постепенно се подобрява, като значимост се достига при сравняването на статуса при изписване с/о 3<sup>-ти</sup> месец ( $Z = -2.900$ ,  $P = 0.004$ ) и при постъпване с/о 1<sup>-ва</sup> година ( $Z = -2.641$ ,  $P = 0.008$ ). Не се установява динамика в неврологичната оценка по NIHSS на пациентите с когнитивно нарушение за период от една година (Friedman test  $\chi^2(3)=0.931$ ;  $p=0.818$ ).

**Таблица 17** Характеристики, свързани с когнитивния статус 1 година след инсульта

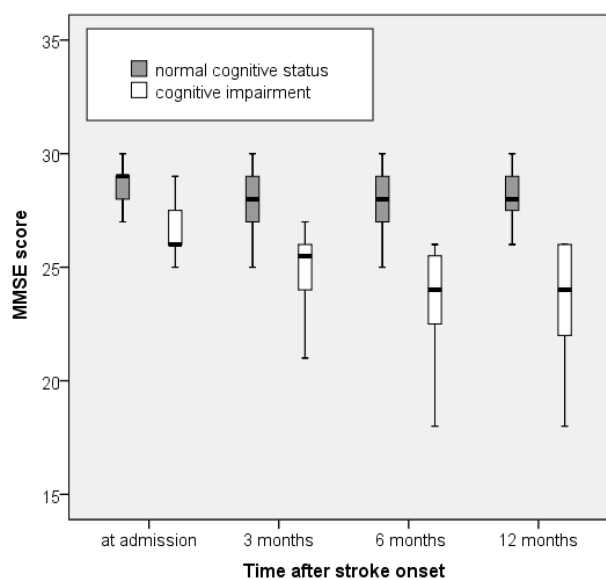
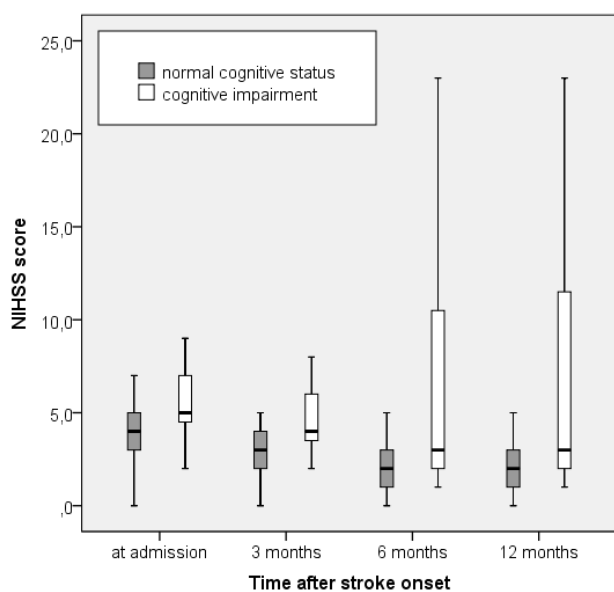
Параметри	Когнитивен статус 1 година след инсульта						
	Нормален (n= 11)		Риск (n= 16)		Лек до умерен дефицит(n= 20)		p
Възраст [у]	58	(57-59)	64	(60-69)	67	(63-71)	0.000*
Мъжки пол, n (%)	9	(81)	10	(63)	7	(35)	0.041*
Образование, n (%)							0.004*
Основно	0	(0)	3	(19)	6	(30)	
Средно	3	(27)	8	(50)	13	(65)	
Средно специално	4	(36)	1	(6)	0	(0)	
Висше	4	(36)	4	(81)	1	(5)	
<b>Съдови рискови фактори</b>							
Артериална хипертония, n (%)	9	(82)	16	(100)	20	(100)	0.051
Систолично P [mm Hg]	143	(28)	161	(23)	164	(33)	0.150
Диастолично P [mm Hg]	90	(13)	95	(19)	97	(15)	0.603
Диабет, n (%)	0	(0)	6	(38)	7	(35)	0.045*

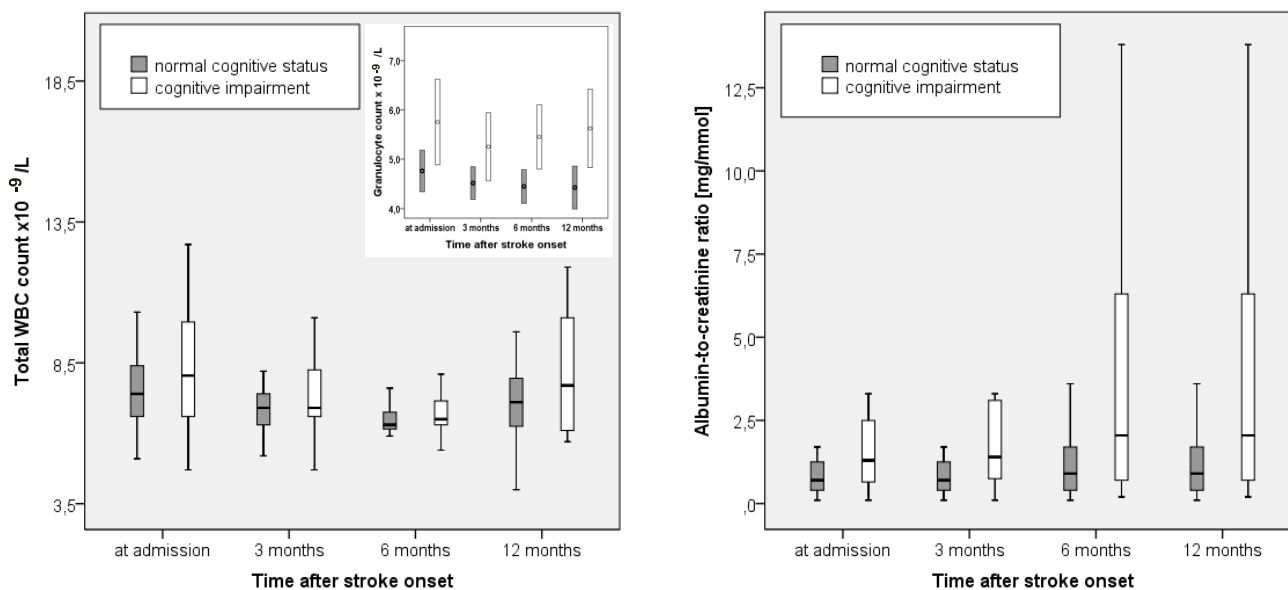


Злоупотреба с алкохол, n (%)	4	(36)	2	(13)	4	(20)	0.308
Тютюнопушене, n (%)	6	(54)	7	(44)	6	(30)	0.379
Предшествващ инсулт, n (%)	3	(27)	3	(19)	4	(20)	0.814
<b>Неврологична оценка</b>							
NIHSS <sup>1*</sup> [точки]	5	(2-7)	4	(3-5)	5	(4-7)	0.130
NIHSS <sup>2</sup> [точки]	2	(0-3)	2	(1-4)	3	(2-12)	0.035*
mRS <sup>1*</sup> [точки]	1	(1-2)	1	(1-2)	2	(1-2)	0.463
mRS <sup>2</sup> [точки]	1	(0-1)	1	(0-1)	1	(1-3)	0.180
Локализация, n (%)							0.126
Хемисфериялен	8	(73)	13	(81)	18	(90)	
Лакунарен	0	(0)	1	(6)	2	(10)	
Стволов	3	(27)	2	(13)	0	(0)	
<b>Биохимични показатели</b>							
WBC <sup>1</sup> [ $\times 10^9/l$ ]	7.0	(1.3)	7.7	(1.3)	8.3	(2.1)	0.154
WBC <sup>2</sup> [ $\times 10^9/l$ ]	6.6	(1.4)	7.3	(1.5)	8.3	(7.7)	0.043*
GLU <sup>1</sup> [mmol/l]	5.2	(4.7-5.5)	6.3	(5.3-7.2)	5.5	(5.2-6.8)	0.093
GLU <sup>2</sup> [mmol/l]	5.8	(5.5-6.3)	5.6	(5.3-7.0)	5.7	(5.4-6.7)	0.857
CHOL <sup>1</sup> [mmol/l]	5.0	(4.4-5.5)	4.7	(4.4-5.2)	4.9	(4.7-5.6)	0.226
CHOL <sup>2</sup> [mmol/l]	5.1	(4.5-5.9)	4.9	(4.7-5.6)	5.2	(4.5-6.1)	0.964
TG <sup>1</sup> [mmol/l]	1.6	(1.2-2.1)	1.5	(1.3-2.1)	1.7	(1.3-2.0)	0.865
TG <sup>2</sup> [mmol/l]	1.7	(1.0-1.7)	1.3	(1.0-1.8)	1.9	(1.2-2.6)	0.087
hs-CRP <sup>1</sup> [mg/l]	1.9	(1.2-2.5)	1.8	(0.7-7.2)	12	(4.3-35)	0.003*
ACR <sup>1</sup> [mg/mmol]	0.7	(0.4-1.3)	0.7	(0.4-1.3)	1.3	(0.6-2.7)	0.143
ACR <sup>2</sup> [mg/mmol]	0.8	(0.4-1.3)	1.0	(0.4-2.6)	2.1	(0.7-6.7)	0.186

<sup>1</sup> при постъпване; <sup>1\*</sup> при изписване; <sup>2</sup> 1 година след инсулта

Данните са представени като средна стойност (SD) или медиана (25-75 пърсентил)





**Фиг. 49** Времени профил на значими биохимични показатели, неврологичен и когнитивен статус през първата година след инсулта. Данните са представявани като средна стойност (SD) или медиана (min-max) в зависимост от типа разпределение на данните

Наблюдава се динамика в когнитивната оценка по MMSE и при двете групи пациенти (Friedman test,  $\chi^2(3)=25.358$ ;  $p=0.000$  – за групата с нормална когниция и  $\chi^2(3)=45.816$ ;  $p=0.000$  – при когнитивен дефицит). При групата с нормална когниция влошаване се наблюдава до 3<sup>-ти</sup> месец след инсулта, след което статусът става стационарен (Wilcoxon Signed Ranks тест,  $Z = -3.598$ ,  $P = 0.000$ , изписване с/о 3<sup>-ти</sup> месец). При групата с когнитивно нарушение влошаването продължава до 6<sup>-ти</sup> месец, след което става стационарно ( $Z = -3.571$ ,  $P = 0.000$ , изписване с/о 3<sup>-ти</sup> месец и  $Z = -2.953$ ,  $P = 0.003$ , 3<sup>-ти</sup> с/о 6<sup>-ти</sup> месец).

#### Независими предиктори за когнитивен дефицит 1 година след инсулта

С цел установяването на независими предиктори за когнитивен дефицит на първата година след инсулта бе конструиран ординален регресионен модел, в който когнитивният статус е представен като тристепенна зависима променлива. Като независими променливи в модела бяха включени два демографски фактора (пол и възраст), един маркер на възпалението (hs-CRP) и един съдов рисков фактор (историята на диабет), като по-този начин е отговорено на изискването отношението брой събития/брой случаи да е по-голямо от 10. От модела бяха изключени нивото на образование, поради наличието на твърде малко случаи в отделните подгрупи и броят левкоцити на първата година, поради това, че в модела вече е включен маркер на възпаление. Въз основа

разпределението на ординалния изход (при нашите данни по-високите категории са по-вероятни, а именно на първата година след инсулта 23,4% от пациентите са с нормален когнитивен статус, 34 % са с риск от развитие на когнитивен дефицит и 42,6 % имат лек до умерен когнитивен дефицит), бе избрана complimentary log-log link функция. Наличието на връзка между независимите променливи и ординалната зависима променлива бе установено с теста „Model Fitting Information”.

**Таблица 18** Ординален регресионен модел на факторите, предсказващи когнитивен упадък на първата година след инсулта

Характеристика	S.E.	Wald	df	p	95% CI			
					Долна	Горна		
Праг	[MMSE =1]	11,505	3,625	10,075	1	0,002	4,401	18,609
	[MMSE =2]	13,777	3,946	12,187	1	0,000	6,042	21,512
Локализация	Възраст [y]	0,212	0,059	12,945	1	0,000	,096	,327
	CRP [mg/l]	0,130	0,047	7,798	1	0,005	,039	,221
	[Пол=1]	-0,736	0,500	2,171	1	0,141	-1,715	,243
	[Пол=2]	0(a)			0			
	[Диабет=1]	-0,484	0,560	0,748	1	0,387	-1,583	,614
	[Диабет=2]	0			0			

Когнитивен статус: нормален [MMSE=1], риск за когнитивен дефицит [MMSE=2]. Пол: мъже=1, жени=2. История на диабет: да=1, не=2; S.E. – Стандартна грешка; CI – доверителен интервал

Данните ( $\chi^2=42.87$ ;  $p=0.000$ ) сочат, че моделът „възраст-пол-възпалителен маркер” адекватно предсказва когнитивния статус на пациентите на първата година след инсулта. The model-fitting статистиката Pseudo  $R^2$  (Nagelkerke) показва, че 68 % от вариациите могат да бъдат обяснени с помощта на този модел. Значими независими прогностични фактори за когнитивно увреждане на първата година след инсулта са възрастта и hs-CRP (Таблица 18). Съществува позитивна връзка между тях и ординалния изход, което означава, че с увеличаването на възрастта и серумното ниво на hs-CRP се увеличава вероятността болният да има когнитивно нарушение. Адекватността на модела, т.е. доколко една и съща група от коефициенти е приемлива за всички категории на ординалната зависима променлива, е потвърдена въз основа на теста на паралелните линии ( $\chi^2=7.155$ ;  $p=0.128$ ). От пациентите с нормален когнитивен статус, ординалният регресионен модел е класифицирал правилно 73 %, от тези с риск от когнитивен упадък – 44 % и от пациентите с лек до умерен когнитивен дефицит – 85 %. Общият дял правилно класифицирани от модела пациенти възлиза на 68 %, което означава, че моделът показва една добра прогностична способност на двата значими фактора - възраст и hs-CRP по отношение на комбинацията от три нива на глобална когниция.

## 5. Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта на лица с артериална хипертония и диабет. Съпоставка с болни с остър хеморагичен инсулт

Механизмите, отговорни за патогенезата на диабет тип 2 и хипертонията все още не са напълно изяснени. Предполага се, че оксидативният стрес е отговорен поне частично за прогресията на заболяванията и техните усложнения. Когато хипертонията съществува наред с диабета, рискът от сърдечно-съдово заболяване е 75 %, което допълнително допринася за цялостната морбидност и морталност на болните.

### **Биохимични Показатели на Кръвта и Маркери на Възпаление**

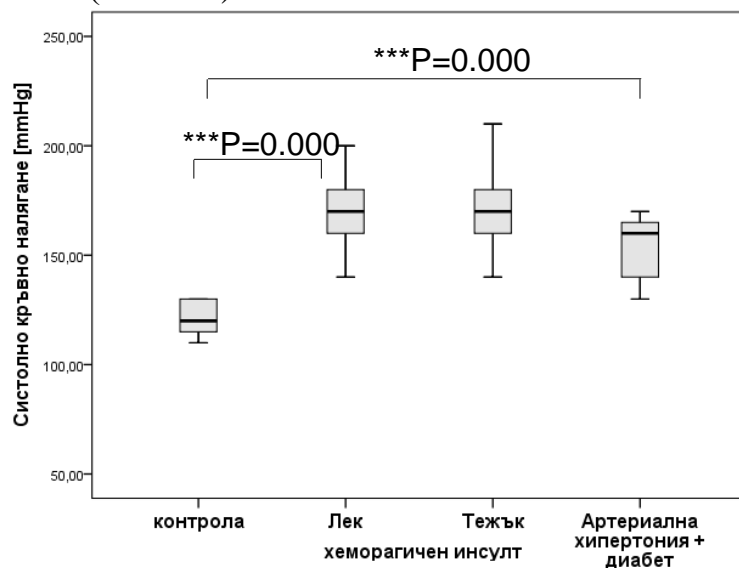
Базовите характеристики на изследваните болни с артериална хипертония и диабет са представени в Таблица 19.

*Таблица 19* Демографски и клинични характеристики на болни с артериална хипертония и диабет

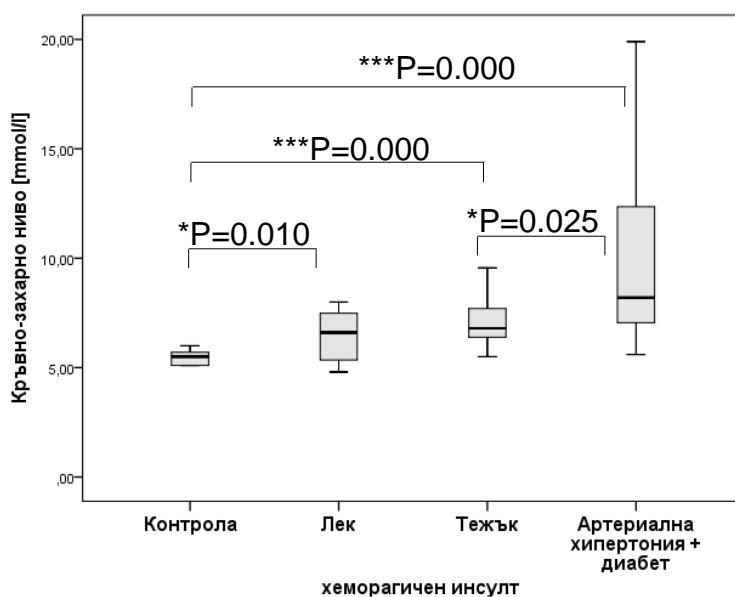
Параметър	Болни с артериална хипертония и диабет (n= 19)	
Възраст [години], медиана (25 –75 пърсентил)	63	(59-67)
Мъжки пол, n (%)	8	(42)
<b>Съдови рискови фактори</b>		
Систолично P [mm Hg], медиана (25–75 пърсентил)	160	(140-170)
Диастолично P [mm Hg], медиана (25–75 пърсентил)	90	(90)
Диабет, n (%)	19	(100)
Злоупотреба с алкохол, n (%)	2	(11)
Тютюнопушене, n (%)	2	(11)
<b>Биохимични показатели при постъпване</b>		
WBC [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	7.4	(2.4)
PLT [ $\times 10^9/l$ ], средна стойност (SD)	288	(66)
RBC [ $\times 10^{12}/l$ ], средна стойност (SD)	4.26	(0.43)
Кръвна захар [mmol/l], медиана (25 –75 пърсентил)	8.2	(6.9-13.1)
CHOL [mmol/l], медиана (25 –75 пърсентил)	5.67	(1.41)
Фибриноген [g/l], медиана (25 –75 пърсентил)	2.93	(2.85-3.15)
TG [mmol/l], медиана (25 –75 пърсентил)	1.74	(1.33-3.38)
hs-CRP [mg/l], медиана (25 –75 пърсентил)	3.21	(1.56-7.49)

Нивата на биохимичните показатели на кръвта на болните бяха съпоставени с тези на 42-ма пациенти с остър sICH. Всички болни с хеморагичен инсулт са с история на артериална хипертония и само трима от тях (7 %) са диабетици. Затова при съпоставката на показателите, трябва да се има предвид фактът, че изследваните групи се различават: 1. по типа развиващ се възпалителен процес - хроничен или остър на фона на хроничен и 2. хроничното възпаление в групата на хипертензивните диабетици се обуславя от продължителното действие на два основни съдови рискови фактора по отношение на про/антиоксидантния статус на

кръвта. Регистрира се завишено систолично кръвно налягане при болните с инсулт и хипертензивните диабетици при постъпване в клиниката (Фиг. 50). Регистрира се също така хипергликемия при постъпване и при двете групи болни (Фиг. 51).

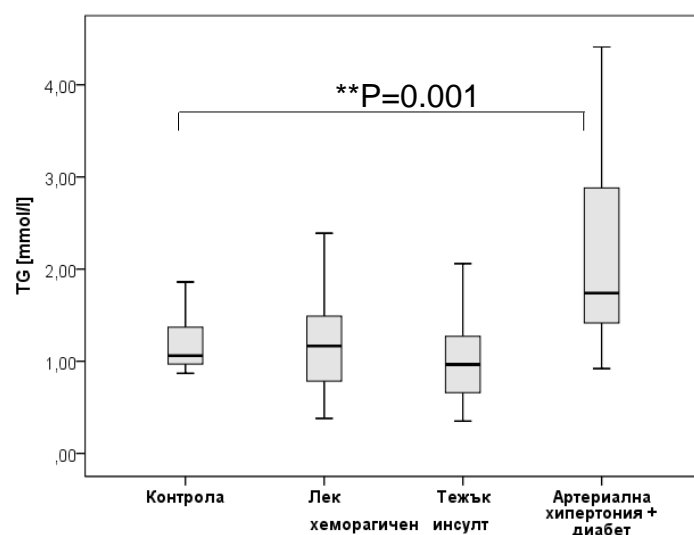


**Фиг. 50** Нива на систоличното кръвно налягане на изследваните болни след sICH, хипертензивни диабетици и съответстващи по пол и възраст здрави доброволци

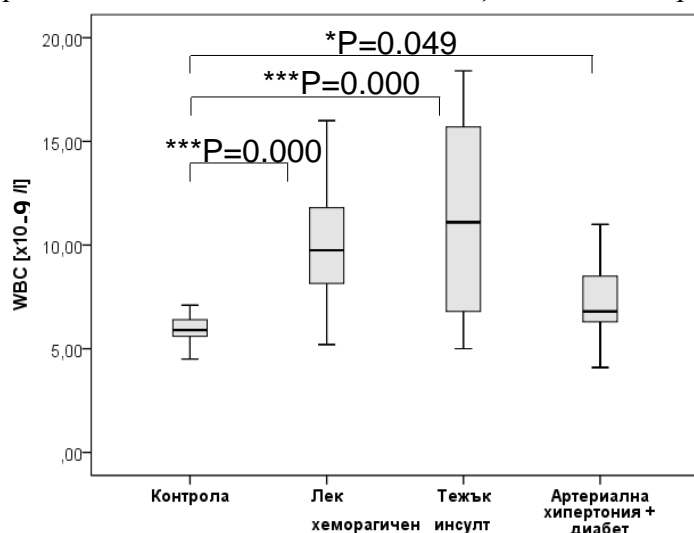


**Фиг. 51** Кръвно-захарно ниво на болни след sICH, хипертензивни диабетици и съответстващи по пол и възраст здрави доброволци

Наблюдава се увеличено ниво на триглицериди в кръвта само на хипертензивните диабетици спрямо контролата (Фиг. 52). Възможна причина за това може да е адитивното действие на двата съдови рискови фактора в посока дисбаланс в липидния метаболизъм, тъй като изследваните болни след хеморагичен инсулт са основно хипертоници.



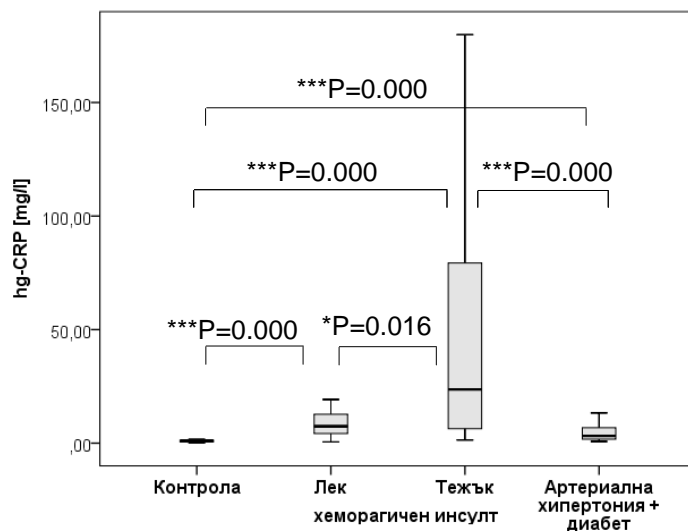
**Фиг. 52** Нива на триглицериди на пациенти след хеморагичен инсулт, на болни с артериална хипертония и диабет и съответстващи по пол и възраст клинично здрави доброволци



**Фиг. 53** Общ брой левкоцити в кръвта на пациенти след хеморагичен инсулт, с артериална хипертония и диабет и клинично здрави доброволци

Някои автори обвързват хипертонията и диабета с дислипидемията и смятат, че тя допринася за увеличената податливост на болните към развитието на коронарна сърдечна болест. Така завишените нива на триглицеридите могат да задълбочат съдовите усложнения на хипертензивните диабетици. В същото време нивата на общия холестерол не се различават между болните и контролата. Такъв резултат е в съгласие с публикувани данни. Това може да се дължи на лечението на тези пациенти с холестерол-снижаващи медикаменти. Хиперлипидемията, която често съпровожда диабета може да доведе до медирано от мастните киселини оксидативно увреждане и метаболитни нарушения в  $\beta$ -клетките и по този начин още повече да влоши клиничния статус на болните.

Нискостепенно възпаление се развива в циркулацията на болните с артериална хипертония и диабет (Фиг.53 и Фиг.54). Ние установяваме завишен общ брой левкоцити ( $Z=-1.963$ ,  $p=0.049$ ) в кръвта (Фиг.51), както и увеличени нива на hs-CRP ( $Z=-3.723$ ,  $p=0.000$ ) (Фиг.53) в серума на пациентите.

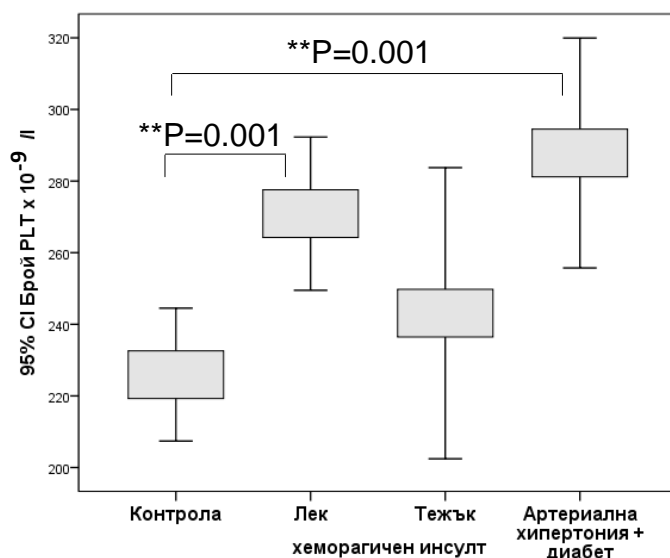


**Фиг. 54** Серумни нива на CRP при хеморагичен инсулт, болни с артериална хипертония и диабет и клинично здрави доброволци

Такава находка е от значение, тъй като експериментални и клинични проучвания предоставят доказателства, че инфламаторни механизми играят централна роля в патогенезата и прогресията на атеросклерозата, церебралния и сърдечен инфаркт. Някои провъзпалителни маркери като CRP са идентифицирани също като предиктори на инсулт и индикатори за прогнозата на болестния процес (*Elkind MS, 2010*).

Ние установяваме също така увеличен брой тромбоцити както при sICH, така при хипертензивните диabetици ( $F=11.979$ ,  $p=0.001$ ) (Фиг. 55). Има публикувани данни, че влошената тромбоцитна функция е свързана с увеличен риск от sICH, а броят PLT на първия ден след инцидента е добър предиктор за клиничен изход (*Fang HY et al, 2005; Mayda-Domac F et al, 2010*). Съдовите ендотелни растежни фактори, отделени от активираните тромбоцити на мястото на кръвоизлива могат да взаимодействат с тромбина и по-този начин да увеличат съдовия пермеабилитет и да доведат до мозъчен оток и неблагоприятен клиничен изход. От друга страна, активиране на тромбоцити е докладвано при хипертензия (*Nityanand S et al, 1993*) и диабет (*Vinik AI et al, 2001*). Има също така данни за нарушена функция на коагулационната система при диабет. Инсулинът е естествен антагонист на тромбоцитната хиперактивност. Той увеличава чувствителността на тромбоцитите към простациклин  $I_2$  и усилва ендотелната генерация на азотен оксид. Следователно дефекти в

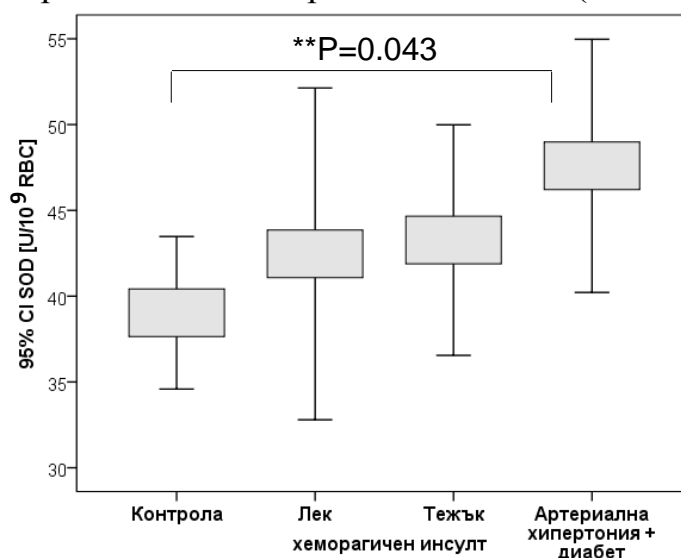
действието на инсулина при диабет създават условия за нарушена тромбоцитна активност, предразполагаща към макро- и микросъдови инциденти.



**Фиг. 55** Брой тромбоцити в кръвта на пациенти с хеморагичен инсулт, на болни с артериална хипертония и диабет и съответстващи по пол и възраст клинично здрави доброволци

#### **Компоненти от Антиоксидантния Капацитет на Периферната Кръв**

Наблюдава се промяна в антиоксидантните възможности на кръвта както при болните с хеморагичен инсулт, така и при хипертензивните диабетици. Нивата на еритроцитната CuZn SOD достигат значимо повишение само при лицата с хипертония и диабет (Фиг. 56).

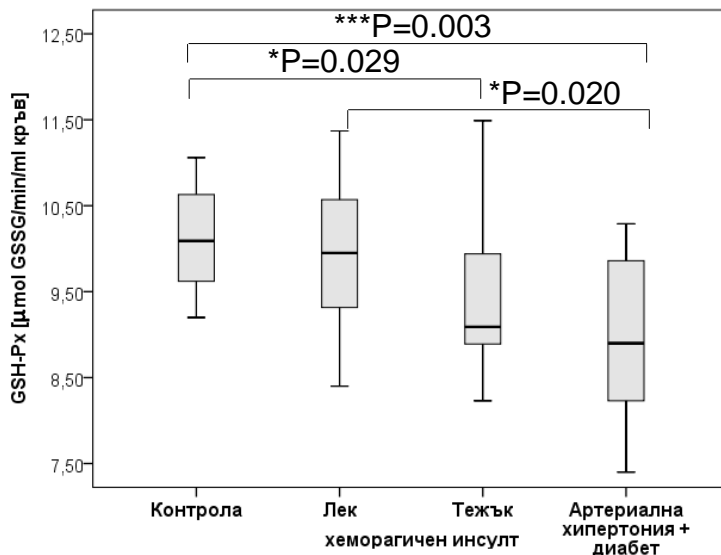


**Фиг. 56** Еритроцитна CuZn SOD при пациенти след хеморагичен инсулт, болни с артериална хипертония и диабет и клинично здрави доброволци

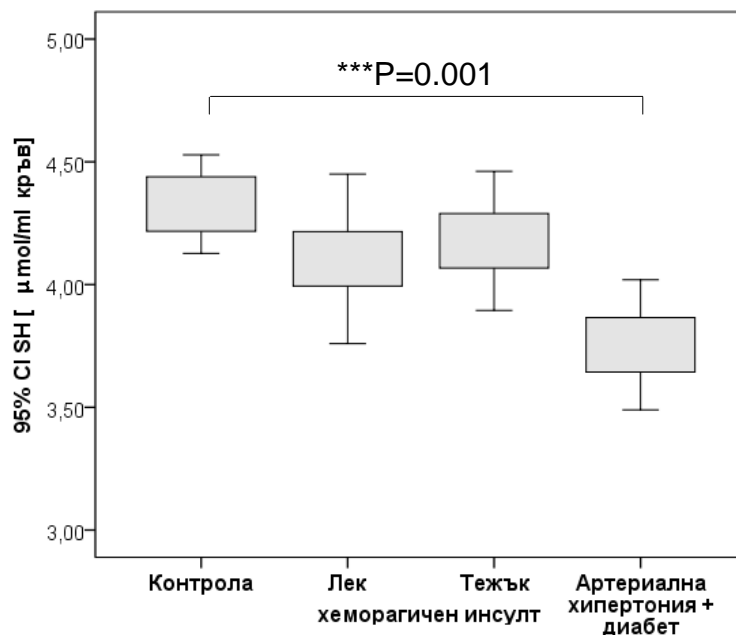
Данните са в съгласие с докладвани резултати (*Likidilid A et al, 2010; Dominguez LJ et al, 2010*) и противоречат на намереното от Psopathy P и



сътр. (2010) и Mahboob M и сътр. (2010). GSH-Px активност на кръвта намалява и при двете групи болни спрямо контролата (Фиг. 57). Общото съдържание на SH групи в кръвта е достоверно снижено само при хипертензивните диабетици (Фиг. 58).



**Фиг. 57** Глутатион-пероксидазна активност при хеморагичен инсулт, хипертензивни диабетици и съответстващи по пол и възраст клинично здрави доброволци

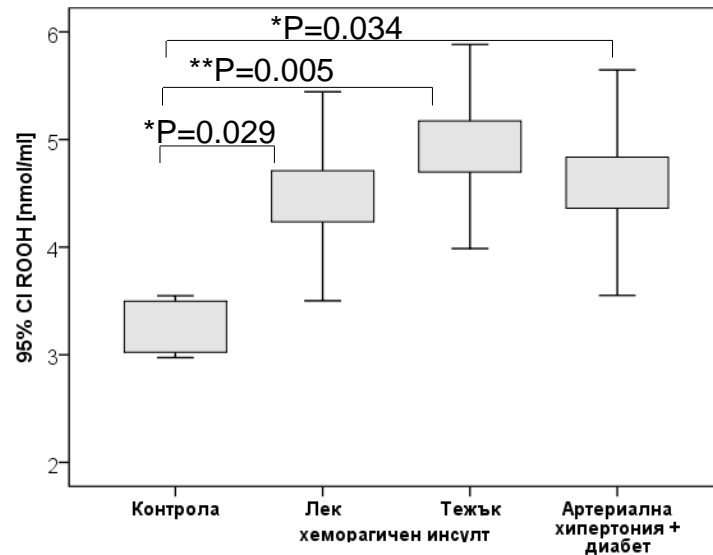


**Фиг. 58** Общо съдържание на SH-групи при хеморагичен инсулт, хипертензивни диабетици и съответстващи по пол и възраст клинично здрави доброволци

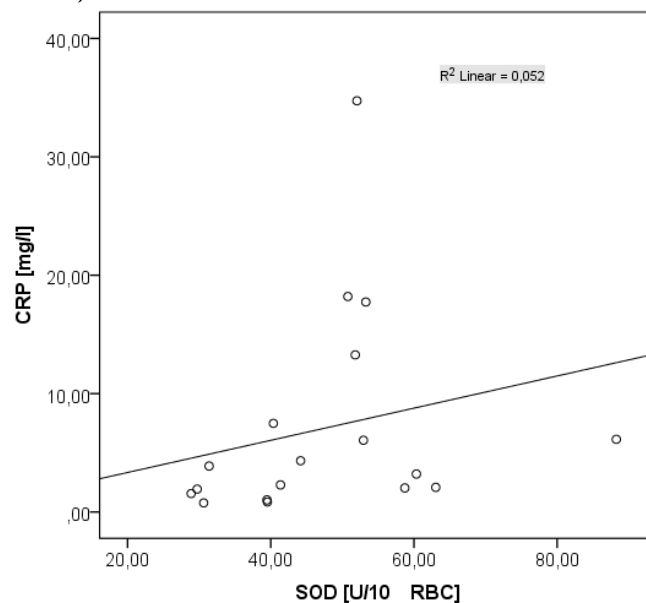
### **Степен на Оксидативно Увреждане**

Ние установяваме увеличено ниво на ROOH при пациентите с диабет и хипертония спрямо контроли, което намира потвърждение в литературата

( $F=9.739$ ,  $p=0.004$ ) (Фиг. 59). Подобни резултати за увеличено ниво на маркери за оксидативно увреждане, като окислени DNA бази, 8-епи-простагландин  $F_{2\alpha}$ , 8-хидрокси-2-деоксигуанозин са също регистрирани при болни с диабет и хипертония.



**Фиг. 59** Нива на липидни ROOH в серума на пациенти след хеморагичен инсулт, на болни с артериална хипертония и диабет и съответстващи по пол и възраст клинично здрави доброволци



**Фиг. 60** Корелационна зависимост между нивото на серумния hs-CRP и еритроцитната CuZn SOD при хипертензивни диабетици

Следователно про/антиоксидантният баланс на кръвта е нарушен както в условията на хроничен оксидативен стрес, така и при остър съдов инцидент, което създава условия за оксидативно увреждане на DNA и протеини и липидна пероксидация. Хиперлипидемията, която

установяваме при хипертензивните диабетици може да е една от причините за наблюдаваното увеличено ниво на липидна пероксидация в циркулацията на болните. Ние установяваме също така значима позитивна корелационна зависимост между серумното ниво на hs-CRP и еритроцитната CuZn SOD (Фиг.60). Увеличената активност на ензима не би следвало да се интерпретира като увеличаване на антиоксидантните възможности на кръвта. При равни други условия, такава увеличена активност означава увеличено ниво на образуване на водороден пероксид, който както е известно е по-токсичен от супероксида.

В таблица 20 са представени обобщено някои от намерените в работата промени в измерените показатели за възпаление и оксидативен стрес при стареене и свързани с възрастта заболявания.

**Таблица 20** Промени в някои от изследваните параметри за възпаление и оксидативен стрес при стареене и възрастово-обусловени заболявания

Параметър	Стареене	Остър ишемичен инсулт	Остър хеморагичен инсулт	Инсулт в хроничен стадий	Хипертония и диабет
Брой NEU в кръвта	↔	↑; ☀	↑; ☀	↔	↑
Брой PLT в кръвта	↔	↑	↔	↔	↑
Спонтанна активност на фагоцити	↑	↔	↔	↑	Δ
Стимулирана активност на фагоцити					
<i>Опсонин-зависима стимулация</i>					
<i>Обща продукция на ROS</i>					
Скорост на активиране T <sub>max</sub>	↔	↑	↔	↔	Δ
Оксидативен капацитет S	↔	↑	↔	↔	Δ
<i>Екстрацелуларна продукция на ROS</i>					
Скорост на активиране T <sub>max</sub>	↔	↔	↔	↔	Δ
Оксидативен капацитет S	↓	↑; ☀	↔	↔	Δ
<i>Опсонин-независима стимулация</i>					
<i>Обща продукция на ROS</i>					
Скорост на активиране T <sub>max</sub>	↓	↓	↔	↔	Δ
Оксидативен капацитет S	↔	↑	↔	↔	Δ
<i>Екстрацелуларна продукция на ROS</i>					
Скорост на активиране T <sub>max</sub>	↔	↔	↓; ☀	↔	Δ
Оксидативен капацитет S	↓	↔	↔	↔	Δ
Оксидативна активност на плазмата	Δ	↑	Δ	↔	Δ
Серумни нива на CRP	Δ	↑; ☀	↑; ☀	Δ	↑

Параметър	Стареене	Остър ишемичен инсулт	Остър хеморагичен инсулт	Инсулт в хроничен стадий	Хипертония и диабет
<b>Параметри на антиоксидантния капацитет</b>					
<i>CuZn SOD</i>	↑*	↔	↔	↔	↑
<i>CTS</i>	↔	↑	↔	↔	↔
<i>GSH-Px</i>	↔	↑	↔	↔	↓
<i>SH-групи</i>	↓	↔	↔	↔	↓
<i>TAS</i>	Δ	Δ	↓; ☼	Δ	↔
<b>Степен на оксидативно увреждане</b>					
<i>ROOH</i>	↔	↑	↑; ☼	↑	↑
<i>TBARS</i>	↑	↑; ☼	↔	↑	↔

Легенда: ↑ - увеличение; ↓ - намаление; ↔ без промяна; ☼ - зависи от тежестта на неврологичния дефицит, Δ – параметърът не е изследван; \*- Промяната важи до определена възраст

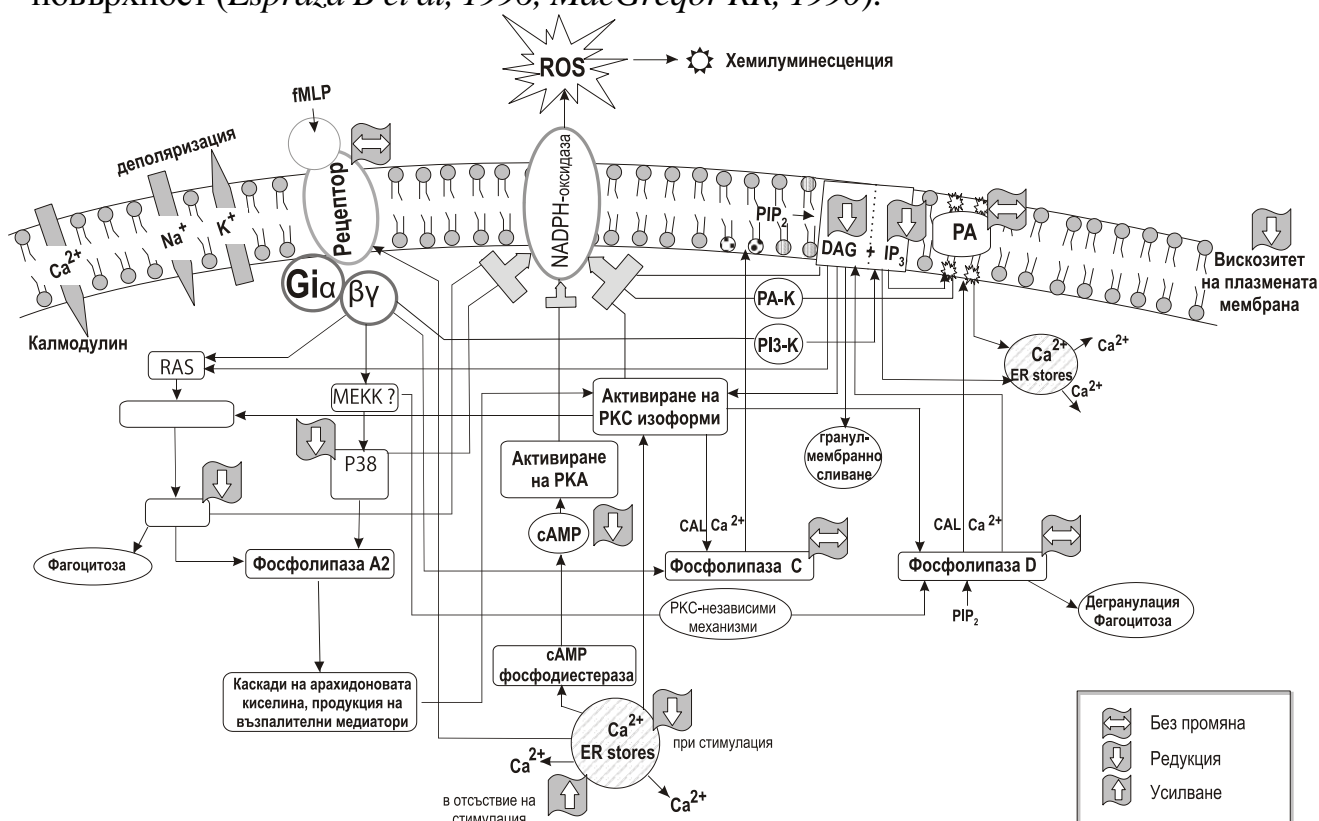
## ОБСЪЖДАНЕ

### **Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта при стареене Възрастово-обусловени Промени в Оксидативната Активност на Периферни Фагоцити**

Известно е, че адхезията на фагоцитите върху различни повърхности предизвиква нискостепенно спонтанно освобождаване на ROS и MPO (*Laurent F et al, 1991*). Определящо за този тип химилуминесценция е клетъчното функционално състояние и преди всичко статусът на рецепторите върху клетъчната повърхност и степента на рецепторна експресия. Малко и противоречиви са публикуваните в литературата данни относно ефекта на възрастта върху спонтанната оксидативна активност на периферни фагоцити. Има данни както за увеличена, така и за непроменена спонтанна оксидативна активност на изолирани неутрофили (*Martins Chaves M et al, 2000; Wenisch C et al, 2000*). Изолационната процедура, обаче, променя функционалното състояние на клетките, респективно рецепторна експресия и затова вероятно не е подходящ способ за оценка на спонтанния оксидативен статус. Публикуваните резултати за различен ефект на стареенето върху оксидативния статус на праймирани и непраймирани фагоцити са в подкрепа на такова предположение (*Fulop T, 1994*).

В настоящата работа бе установена завишена скорост на активиране на фагоцити от стъклена повърхност и редуцирана MPO-обусловена продукция на ROS от клетките по време на адхезия. Получените данни не се съгласуват с докладваните резултати от *Kukovetz EM и сътр. (1994)* за липса на промяна с възрастта в параметрите на хемилуминесцентната крива, регистрирана от

нестимулирани фагоцити в цялостна кръв. Наблюдаваната в настоящата работа възрастово-обусловена увеличена скорост на спонтанната фагоцитна оксидативна активност е логична, тъй като има данни за увеличена адхезивна способност на неутрофили при възрастни спрямо млади лица към различни повърхности (*Tortorella C et al, 1993*), породена вероятно от възрастово-обусловена увеличена експресия на адхезионни молекули върху левкоцитната повърхност (*Espraza B et al, 1996, MacGreqor RR, 1990*).



**Фиг. 61** Хипотетична схема на fMLP-иницирани сигнални пътища във фагоцитите, водещи до активиране на NADPH-оксидазата. Забележка: Стрелките сочат наличие или отсъствие на промени с възрастта

fMLP се свързва към специфичен рецептор, принадлежащ към фамилията на G-протеин куплираните рецептори. Сигналните пътища, медириани от fMLP се инициират посредством активирането на pertussis toxin-чувствителен G протеин и включват различни ефектори, образувани от вторични месинджери, в това число фосфолипази C, D и A<sub>2</sub>, липид-кинази и различни протеин кинази като протеин киназа C, тирозин киназа и митоген-активирани протеин кинази. Тези сигнални събития в крайна сметка активират NADPH-оксидазата с поледващо образуване на супероксид.

В същото време, причината за редуцираната MPO-обусловена продукция на ROS от фагоцитите на възрастни лица очевидно трябва да се търси в инициираните от адхезията трансдукционни пътища. Известно е, че прилепването на фагоцитите към дадена повърхност се съпътства с локални промени в концентрацията на свободен цитозолен калций и търновър на плазмени мембранни фосфолипиди (*Laurent F et al, 1991, Stossel TP, 1989*). При възрастните е докладвано намалено ниво на

образуване на вътреклетъчни месинджъри, в частност диацилглицерол (DAG) и инозитолтрифосфат ( $IP_3$ ), което се инициира от фагоцитната адхезия (*Lipschitz DA et al, 1991*) и това естествено води до редуциран секреторен отговор на клетките – в случая намалена извънклетъчна МРО-обусловена продукция на ROS.

В настоящата работа е изследван също така ефектът на стареенето върху оксидативния капацитет на fMLP-стимулирани периферни фагоцити. Известно е, че хемотаксичният агент fMLP се свързва към специфични рецептори от фагоцитната повърхност и активира оксидативната клетъчна активност по механизми, зависещи от нивата на интра- и екстрацелуларния калций и от процеси, включващи активирането на фосфолипази и кинази (Фиг. 61).

В литературата има данни както за нормално (*Espraza B et al, 1996; Fulop T, 1994*), така и за редуцирано (*Perskin MH et al, 1992; Braga PC<sup>1</sup> et al, 1998; Braga PC<sup>2</sup> et al, 1998*) образуване на ROS от неутрофили в отговор на fMLP при възрастни в сравнение с млади лица. Има дори данни за леко увеличена с възрастта генерация на супероксид от fMLP-стимулирани неутрофили (*Butcher S et al, 2000, Butcher S et al, 2001*). Тези противоречиви резултати могат да се обяснят с различната използвана концентрация на стимуланта и различните методи за оценка на радикалообразуването. Наблюдавано е, че при сравнително ниска концентрация на fMLP ( $10^{-7}$ – $10^{-8}$  mol/l), във фагоцитния тотален LCL отговор от  $5 \times 10^6$  изолирани неутрофили се включва екстрацелуларен дял, съизмерим с интрацелуларния (*Bender JG, 1983*). С увеличаване на концентрацията на fMLP, все повече се увеличава дялът на интрацелуларния компонент от общия отговор, респективно тоталната светлинна емисия. Използваната в настоящата работа концентрация на fMLP ( $10^{-5}$  mol/l) следователно формира значимо преобладаваща интрацелуларна над екстрацелуларната хемилуминесценция. Тъй като не се установява разлика с възрастта в нивото на fMLP-стимулираната Total LCL, то може да се заключи, че интрацелуларната МРО-обусловена продукция на ROS от fMLP-стимулирани фагоцити не се повлиява съществено с възрастта. Такъв резултат за непроменена ROS продукция от възрастни лица е установен с флоуцитометричен метод (*Espraza B et al, 1996*).

При използването на моделна система, визуализираща само екстрацелуларната светлинна продукция, показател за образувания екстрацелуларен супероксид, отговорът на възрастните е значимо редуциран в сравнение с този от млади лица. Трябва да се отбележи, че редукция в продукцията на

супероксид в отговор на fMLP може да бъде регистрирана само, ако се оценява екстрацелуларният дял на отговора или се използват по-малки концентрации стимулант, които формират екстрацелуларен дял в Total LCL, съизмерим с интрацелуларния (*Bender JG, 1983*). Логичен е и резултатът за намереното в настоящата работа увеличение на времето за достигане на максимален интензитет в Total LCL с възрастта, тъй като екстрацелуларният дял намалява и при съхранен интрацелуларен дял, резултатът е изместване на пика на кинетиката в посока на по-късния във времето интрацелуларен отговор. Такова заключение за редуцирана екстрацелуларна продукция на супероксид от периферни фагоцити е в съгласие с публикувани в литературата резултати, получени с хемилуминесцентни и спектрофотометрични методи (*Braga PC et al, 1998a; Braga PC et al, 1998b; Lipschitz DA et al, 1991*). Трябва да споменем, че има данни за непроменена с възрастта fMLP-стимулирана луцигенинова хемилуминесценция (*Butcher S et al, 2000, Butcher S et al, 2001*). Такъв резултат не би следвало да се разглежда като противоречив, тъй като LgCL оценява освен NADPH-оксидазо-обусловената, също и митохондриалната продукция на супероксид (*Miesel R et al, 1996*), чиито относителни дялове могат да варират в зависимост от експерименталните условия.

Каква е причината за наблюдаваната редукция с възрастта в екстрацелуларната продукция на ROS от периферни фагоцити в отговор на fMLP? Тъй като няма данни за промени в броя и афинитета на fMLP рецепторите от фагоцитната повърхност с възрастта (*Lipschitz DA et al, 1991*), тогава причината за редуцирания екстрацелуларен LCL отговор може да е намалена концентрация на цитозолен калций (Фиг. 61). Действително има данни, че нивото на цитозолния калций след клетъчна стимулация се редуцира с възрастта и вероятно модулира NADPH-оксидазната активност и дегранулацията (*Wenisch C et al, 2000*). В подкрепа на такова предположение са също така публикувани резултати за нормално ROS образуване от фагоцитите на възрастни лица, чийто интрацелуларен калций е изкуствено увеличен посредством предварително третиране на клетките с калциев йонофор (*Lipschitz DA et al, 1991*).

Друга причина за редуцираната fMLP-стимулирана екстрацелуларна хемилуминесценция при възрастните може да се търси в променения физикохимичен статус на клетъчната мембрана (*Shao D et al, 2003; Vilhardt F et al, 2004; Alvarez E et al, 2001*). Има данни за увеличена флуидност на мембраната на фагоцитите при възрастните, произтичаща от промени в съотношението между мембранните липидни компоненти (*Fulop T et al,*

2004), което е съпроводено с намалена мембранна пермеабилност за екстрацелуларен калций и респективно намалено образуване на супероксид след стимулация с хемотаксичния трипептид (*Lipschitz DA et al, 1987*). Редуцираните ефекторни функции на неутрофилите на възрастните могат да се обяснят и с намалена екстрацелуларна сигнал-регулирана киназа, както и намалена тирозинова фосфорилация на p38, които също участват във фагоцитната адхезия и активност на респираторния взрив (Фиг. 61) (*Dewas C, 2004*).

Как да се обясни непроменената с възрастта интрацелуларна продукция на ROS от fMLP-стимулирани периферни фагоцити? Стимулацията с fMLP активира множество сигнални трансдукционни пътища във фагоцитите, опосредствани от цял спектър от вътреклетъчни месинджъри, промените в нивото на които могат да модулират NADPH-оксидазната активност в по-късни моменти от време. Така например, има данни, че нивото на cAMP намалява с възрастта (*McLaughlin B et al, 1986*), а това може да стимулира ROS продукцията на фагоцитите по механизъм на обратна връзка. Друг пример в подкрепа на съществуването на компенсаторен механизъм, възстановяващ вътреклетъчната ROS продукция до нормални стойности при възрастните е неповлияната от стареенето активност на фосфолипаза D с последващо образуване на фосфатидна киселина, основен медиатор за активирането на NADPH оксидазата след стимулация с fMLP (*Lipschitz DA et al, 1991*). Нейното ниво остава непромено с възрастта независимо от сниженото ниво на вътреклетъчните месинджъри IP<sub>3</sub> и DAG (т. нар. прекурсорен пул). От друга страна, продукцията на арахидонова киселина (AA) не намалява с възрастта (*Alvarez E et al, 2001*). Известно е, че AA е субстрат за образуването на ейкозаноиди, много от които са възпалителни медиатори и могат да предизвикат формирането на положителна обратна връзка в системата. Нещо повече, AA може да увеличи активността на асемблираната NADPH-оксидаза посредством увеличаването на броя на нейните активни форми и субстратен афинитет (*Rubinek T et al, 1993*). Още един пример в подкрепа на идеята за съществуването на компенсаторен механизъм по отношение радикалообразуването при възрастните са неутрофили, бедни на Ca<sup>2+</sup>, при които активирането на NADPH-оксидазата възниква независимо от сигналните пътища, в които участват вторичните месинджъри, образувани при хидролизата на фосфолипиди (*Dusi S et al, 1993*). С други думи, много е възможно фагоцитите при възрастните да са си изработили компенсаторен механизъм за възстановяване на първоначалния спад в ROS продукцията до нормални нива в по-късни моменти от време.



Ние изследвахме също така промените с възрастта в екстра- и интрацелуларното радикалообразуване от клетките при опсонин-зависима стимулация. В наши предишни проучвания, въз основа на моделен компонентен анализ на хемилуминесцентната кинетична крива, сме показали, че концентрацията на опсонизирания зимозан значимо променя съотношението между извън- и вътреклетъчната продукция на светлина в рамките на общия хемилуминесцентен отговор – от почти липсващ екстрацелуларен дял при ниска концентрация на стимуланта до значим такъв при висока концентрация (*Magrissso M et al, 2000*). В настоящата разработка е използвана за стимулация на фагоцитите ниска концентрация зимозан (0.25 mg/ml), при която общият хемилуминесцентен отговор може да се разглежда практически за вътреклетъчен (*Magrissso M et al, 2000*). Освен това с моделна хемилуминесцентна система е регистрирана само извънклетъчно-локализираната светлина (*Lock R et al, 1987*).

При стимулация с опсонизиран зимозан не се установява корелационна връзка между скоростта на активиране на периферните фагоцити за вътреклетъчно радикалообразуване и възрастта. Общият оксидативен капацитет на клетките за вътреклетъчно радикалообразуване, оценен чрез параметъра площ под кинетичната крива S, също остава непроменен с възрастта. Намалява с възрастта максималната и интегрална оксидативна активност на фагоцитите за извънклетъчно образуване на супероксид. Тъй като при извънклетъчната моделна система винаги се добавя едно и също количество пероксидаза от хрян при блокирана МРО, то може да се смята, че в началните етапи от клетъчната активация, фагоцитите от възрастните лица образуват по-малко количество екстрацелуларен супероксид.

Получените в настоящето изследване резултати за първи път показват, че не целият F<sub>c</sub> и FMLP-рецептор медиран оксидативен отговор на периферни фагоцити се редуцира с възрастта, както се смяташе досега. Намалява само екстрацелуларният компонент на отговора, и по-специално, продукцията на супероксид. Непроменена с възрастта остава интрацелуларната МРО-обусловена ROS продукция. Следователно при стареене оксидативната активност на периферните фагоцити се ремоделира в отговор на възрастово-обусловеното ново проокислително състояние на организма.

### ***Възрастово-Обусловени Промени в Митохондриалната Продукция на Супероксид от Периферни Фагоцити в Цялостна Кръв***

Значима част от вътреклетъчната продукция на ROS произхожда от митохондриите (*Wei YH et al, 2001*). Тя възниква на две основни места в

електрон-транспортната верига: комплекс I (NADH дехидрогеназа) и комплекс III (убихинон – цитохром C редуктаза). Комплекс III е основният източник на ROS при нормални метаболитни условия и стареене (*Finkel T et al, 2000*). Освен това, по време на респирацията могат да се образуват и други странични продукти, в частност глиоксал и метилглиоксал, които да доведат до формирането на гликирани крайни продукти, способстващи за формирането на старческия фенотип.

Митохондриалната дисфункция вероятно участва в процесите на стареене (*Trifunovich A et al, 2008*). В литературата, обаче, има тенденция за автоматично свързване на респираторната верига в митохондриите с оксидативния стрес, но експерименталните доказателства за такава връзка са недостатъчни. Има примери с експериментални модели с влошена митохондриална функция, които не показват наличие на оксидативен стрес. От друга страна, имунната система също се променя с възрастта, което намира израз в увеличена заболяемост и смъртност от инфекциозни заболявания сред възрастното население (*De la Fuente M, 2002*). Затова наша цел бе да проучим промените в митохондриалната продукция на супероксид от стимулирани периферни фагоцити с възрастта.

Луцигениновата хемилуминесценция се използва като метод за оценка както на екстрацелуларната генерация на супероксид от NADPH оксидазата на стимулирани фагоцити, така и на митохондриалната супероксидна продукция (*Chen H et al, 2001; Rembisha SJ et al, 1994*). Ние намираме позитивна корелация между времето за достигане на пика в кинетиката на LgCL и възрастта. Установили сме също така възрастово-обусловена редуцирана NADPH оксидазно-медирана екстрацелуларна продукция на супероксид от стимулирани фагоцити. Затова може да се предположи, че наблюдаваното увеличено време до пика с възрастта се дължи на увеличен относителен дял на митохондриалната продукция на супероксид в рамките на общия отговор. Подобен извод се подкрепя от други автори, които докладват, че скоростта на образуване на супероксид и водороден пероксид в митохондриалната верига нараства значимо с възрастта (*Cadenas E et al, 2000; Passos JF et al, 2006*).

Ние установяваме също така, че максималната LgCL оксидативна активност и общият LgCL оксидативен капацитет на клетките първоначално нарастват с възрастта и след 50-годишна възраст стационарират. Следователно организъмът разполага с механизми, които строго контролират редокс-статуса на клетката и над определена възраст

или по-скоро при определено ниво на радикална продукция предизвикват формирането на ново стационарно редокс-състояние.

Съгласно първоначално издигнатата свободно-радикална теория, стареенето и свързаните с него дегенеративни процеси се дължат на увреждащи ефекти, причинени от завишено радикалообразуване в клетките. Тъй като митохондриалната респираторна верига е основен източник на радикали, то митохондриите са вероятната основна мишена за оксидативно увреждане и акумулирането на дефектни митохондрии е допринасящ остаряването на индивида фактор (*Trifunovich A et al, 2008*). В подкрепа на митохондриалната теория на стареенето са публикувани данни за възрастово-обусловено нарастване на нивото на оксидативно променени липиди, протеини и DNA в митохондриите при редица експериментални проучвания (*Balaban RS, 2005*).

Ако свръхпродукцията на ROS е есенциално важна за процеса на стареене, всяка манипулация, водеща до намаляването на тази продукция би следвало да увеличава продължителността на живот на видовете. Обаче интервенции, целящи да снижат нивото на образуваните ROS или да смекчат техните ефекти, не са довели до убедителни резултати в това отношение (*Van Remmen H et al, 2003*). Така например експериментални модели, дефицитни на антиоксидантни ензими показват завишена чувствителност към оксидативен стрес, но нямат намалена продължителност на живот (*Van Remmen H, 2004*). Експериментални модели, с редуцирана митохондриална MnSOD активност, от своя страна, имат увеличено ниво на оксидативно увредени митохондриални протеини и DNA и увеличена вероятност за рак, но нямат намалена продължителност на живот (*Van Remmen H, 2003*). Има дори доказателства, че антиоксидантните хранителни добавки могат да намалят продължителността на живот при хора (*Bjelakovic G et al, 2007*). Очевидно стационарното ниво на оксидативно увредени молекули зависи както от резултатната ROS продукция, така и от клирънса на тези молекули от клетката. Възможно е нивото на оксидативно увредени молекули в клетката да се увеличи при нормална ROS продукция, ако клирънсът е дефектен и обратно. Затова е резонен въпросът доколко при нормални условия оксидативното увреждане е достатъчен фактор за лимитирането на продължителността на живот. Нещо повече, напоследък ROS се разпознават като важни сигнални молекули. Има данни за съществуването на мрежа от сигнални фактори, която координативно управлява нивата на ROS в клетката. Потенциален пример е туморният супресиращ фактор p53, за който напоследък се установява, че регулира експресията на множество

антиоксидантни гени (*Sablina A et al, 2005*). Затова вместо промяна в нивото на отделни антиоксидантни ензими, един по-добър подход може да се окаже модулацията на сигналните пътища, които контролират вътреклетъчната продукция на ROS.

### ***Възрастово-Обусловени Промени в Антиоксидантния Статус на Периферната Кръв***

SOD, CTS и GSH-Px са трите основни антиоксидантни ензими, които контролират биологичните ефекти на образуваните ROS в организма. Публикуваните данни за статуса на тези ензими в циркулацията на възрастните са противоречиви и няма определено становище за това как се променя активността им с възрастта. Докладвано е както увеличение (*Ho SP et al, 2005; Rizvi SI et al, 2007*), така намаление (*Kedziora-Kornatowska K et al, 2007; Bolzan AD et al, 1997*) или липса на промяна в еритроцитната CuZn SOD активност (*Bogdanska JJ et al, 2003; Kasapoglu M et al, 2001*). Подобни данни за увеличение (*Ho SP et al, 2005; Rizvi SI et al, 2007; Oztürk O, 2004*), намаление (*Volkovova K et al, 1996; Kedziora-Kornatowska K et al, 2007*) и липса на промяна (*Bogdanska JJ et al. 2003, Kasapoglu M et al, 2001, Bolzan AD et al, 1997*) са публикувани за еритроцитната CTS и GSH-Px активности. Има данни също така за значимо намалена плазмена концентрация на EC-SOD с възрастта (*Di Massimo C et al, 2006*). Освен това са докладвани значителни вътревидови вариации в активността на ензимите (*Bogdanska JJ et al, 2003; Volkovova K et al, 1996*).

Резултатите от настоящето изследване показват, че еритроцитната CuZn SOD активност се увеличава с възрастта. Факторният анализ на варианса обаче сочи, че активността на ензима не нараства линейно в целия изследван възрастов диапазон, а намалява при лицата от най-възрастната група (> 70 години). Такъв резултат не е неочакван, тъй като има публикувани данни за редуцирана еритроцитна CuZn SOD активност при много възрастни лица (*Mecocci P et al, 2000*). В същото време установяваме непроменено нивото на GSH-Px активност на кръвта. С тенденция към увеличение, но без достигане на статистическа значимост е възрастово-обусловената промяна на CTS активност на кръвта. Увеличената активност на CuZn SOD при непроменени CTS и GSH-Px активности не би следвало да се интерпретира като увеличаване на антиоксидантните възможности на кръвта с възрастта, тъй като тя води до увеличено образуване на водороден пероксид в клетката, който е по-токсичен от супероксида. В подкрепа на такова заключение е установената от нас изключително сигнификантна позитивна корелация между CuZn SOD активност в еритроцитите и нивото

на плазмените липидни хидропероксици. С други думи, увеличената ензимна активност е свързана с увеличено ниво на оксидативно увреждане в циркулацията при съхранена пероксидазна активност.

Тъй като SH-групите определят основно редуциращия капацитет на клетките, в настоящето изследване е измерено тяхното общо съдържание в кръвта като функция на възрастта. Ние установяваме възрастово-обусловено намаление на сулфхидрилни групи в периферната кръв, което потвърждава преди публикуванни данни (*Hack V et al, 1998*). Функционалните последици от такова намаление могат да бъдат каталитично инактивиране на протеини и загуба на специфични клетъчни функции. Намалването на съдържанието на SH групи в кръвта може да бъде предизвикано от активни форми на кислорода (*Sun J et al, 1999*). Ние обаче не установяваме връзка между общото съдържание на SH-групи в кръвта и някой от изследваните оксидативни показатели. Затова твърдението, че свързаните с възрастта промени в тиоловия редокс-статус са пряко следствие от увеличено образуване на ROS трябва да бъде доказано.

Няма значими промени с възрастта в нивото на плазмените липидни хидропероксици, което е било забелязано и преди (*Block G et al, 2002*). Увеличена е концентрацията на TB-RAM в кръвта с възрастта, което е в съгласие с данните на Kasapoglu M и сътр. (2001). Следователно може да се предположи, че с възрастта се наблюдава увеличено ниво на оксидативно увреждане в кръвта.

Освен нивото на оксидативни маркери в периферната кръв като функция на възрастта, ние проучихме и взаимната връзка между тях. Установяваме, че активността на еритроцитната CuZn SOD и GSH-Px активност на кръвта сигнификантно корелират с броя на периферните моноцити. Такава връзка може да се дължи на факта, че периферните моноцити са един от потенциалните източници на ROS в кръвта. CuZn SOD, от своя страна, негативно корелира с fMLP-стимулираната Extra LCL, което е логично предвид факта, че Extra LCL е индикатор за образувания от фагоцитите екстрацелуларен супероксид, който е субстрат на ензима. Нормираната активност на CuZn SOD изключително значимо позитивно корелира с времето до пика и максималния интензитет на LgCL. Последното наблюдение може да е в подкрепа на издигнатата напоследък идея за наличие на сигнализиране на ядрата от страна на митохондриите с цел регулиране на нивото на антиоксидантните ензими при промени в митохондриалната продукция на супероксид (*Storz P, 2006*). Намерените корелации сочат съществуването на деликатен баланс между прооксиданти и антиоксиданти в

кръвта, които са свързани по вътрешно-зависим начин. В потвърждение на казаното, има литературни данни, че оксидантите могат да индуцират увеличение на активността и капацитета на ендогенната антиоксидантна защита, а също така могат и да потискат компоненти от тази защита (*Allen R et al, 1985; Sohal RS et al, 1986b; Blakely SR et al; 1988; Hill KE et al, 1987*). Най-вероятно е неправилно да се интерпретира промяната в радикалообразуването или нивото на антиоксидантните компоненти с възрастта като вредно или благоприятно явление, наблюдаващо се *in vivo*. Необходимо е по-детайлно да се изучи взаимната връзка между про- и антиоксидантните процеси в организма за да се изработи комплексна стратегия в борбата за редуциране на скоростта на стареене.

### ***Фагоцитната Митохондриална Продукция на Супероксид и Активността на CuZn SOD Намаляват при Много Стари Хора***

*In vitro* експериментални данни сочат, че митохондриите преобразуват 1-2% от консумирания кислород в супероксид. Разбира се скоростта на образуване на ROS *in vivo* е по-малка, но каквато и да е тя, несъмнено е необходимо включването на протективни механизми за ограничаване на последствията от тази продукция. Затова клетките са си изработили защитен механизъм, който да обезпечи необходимия баланс между про- и антиоксиданти. Ние си поставихме за цел да изследваме симултантно митохондриалното образуване на супероксид от зимозан-стимулирани фагоцити и активността на еритроцитната CuZn SOD като функция на възрастта, както и да анализираме потенциалната връзка между тях.

Получените резултати сочат първоначално нарастване на митохондриалната оксидативна активност на фагоцитите. Подобен извод се подкрепя от данни, получени от други автори (*Cadenas E et al, 2000, Passos JF et al, 2006*). Нещо повече, има данни за съществуването на негативна корелация между вътреклетъчното ниво на оксидативно увреждане и максималната продължителност на живот на организмите (*Sohal RS, 1995*). Такова нарастване в продукцията на митохондриалния супероксид ние наблюдаваме до 50-годишна възраст, следвано от стационаране и последващ значим спад в тази оксидативна активност при лицата на възраст > 70 години. Такъв резултат намира потвърждение в работата на Месосси Р и сътр. (2000), които също установяват първоначално възрастово-обусловено увеличение в еритроцитната CuZn SOD с последващ спад в активността на ензима при много възрастни лица (>80 години). Andersen HR и сътр. (1998) също докладват наличие на спад в CuZn SOD активност при дълголетници. Авторите смятат, че снижаването на активността на ензима се

дължи на намалената метаболитна скорост и редуцирана кислородна консумация при тези лица поради намаления прием на калории и намалената физическа активност.

В настоящето проучване ние установяваме също така значима корелационна връзка между максималната оксидативна активност на фагоцитите и CuZn SOD активност. Такъв резултат вероятно не е случаен, тъй като изграждането на деликатен баланс между антиоксидантните ензими и радикалната продукция е изключително важно за формирането на клетъчна резистентност към оксидативен стрес. Има данни за наличие на положителна обратна връзка между оксидативната активност на фагоцитите и експресията на SOD. Свърхекспресията на ензима в клетката вероятно спомага тя да се справи с увеличеното ниво на образуване на радикали, предотвратявайки по този начин иницирането на апоптоза и други водещи до клетъчен арест сигнални пътища. Установяването на причините за регистрирания в настоящето проучване спад в митохондриалната продукция на супероксид от фагоцитите и активността на еритроцитната CuZn SOD при много възрастни лица е въпрос на бъдещи изследвания, резултатите от които могат да разкрият механизмите, определящи продължителността на живот, както и потенциалните мишени за терапевтична интервенция.

### ***Полово-специфични Различия в Антиоксидантния Статус на Кръвта на Здрави Лица на Пострепродуктивна Възраст***

Оксидативният стрес се свързва с физиологичните промени, които възникват след менопауза. Тъй като възрастта се смята за определящ про/антиоксидантния статус на организма фактор, за да се елиминира нейния ефект, бе заложен критерий подгрупите на мъжете и жените да имат подобно честотно разпределение и да са статистически неразличими по отношение на фактора възраст.

Известно е, че младите жени по време на техния фертилен период са с по-нисък риск от сърдечно-съдови инциденти в сравнение с мъже на същата възраст. Нещо повече, жени на репродуктивна възраст се отличават с по-ниско ниво на оксидативно увреждане и показват подобрена ендотел-зависима съдова релаксация в сравнение със съответстващи по възраст мъже (*Singh K et al, 2010*). Има също така данни за благоприятна модулация в експресията на антиоксидантни ензими от естрогените (*Strehlow K et al, 2003*). След менопауза, обаче, рискът от съдов инцидент при жените нараства, заедно с паралелното нарастване на маркери за оксидативен стрес. Така например е докладвано наличие на дисбаланс

между прооксиданти и антиоксиданти при жени в постменопауза с остеопороза (*Altindag O et al, 2008*).

Публикуваните данни за статуса на основните антиоксидантни ензими в пострепродуктивна възраст като функция на пола са противоречиви. Докладвано е както увеличение, така намаление или липса на промяна в активността на CuZn SOD, CTS и GSH-Px между възрастни мъже и жени (*Bolzan AD et al, 1997, Mariani E et al, 2006; Habif S et al. 2001*). Ние не установяваме статистически значима разлика в еритроцитната CuZn SOD и общата каталазна активност на кръвта между мъже и жени в пострепродуктивна възраст, което намира потвърждение в работите на други автори. От друга страна, GSH-Px активност на кръвта е по-ниска при жените, отколкото при мъжете, което е в съгласие с работата на Bolzan AD и сътр. (*1997*). Тъй като жени в предменопауза имат по-висока глутатион-пероксидазна активност в сравнение с мъже на същата възраст и жени в постменопауза (*Massafra C et al, 2002*), то наблюдаваното снижение в GSH-Px активност на кръвта в настоящата работа може частично да се припише на намалено съдържание на естрогени. Заключение се основава на факта, че активността на еритроцитната GSH-Px корелира със серумното ниво на естрогените (*Massafra C et al, 2002*).

В настоящето изследване е измерено също общото съдържание на SH групи в кръвта като функция на пола. Има данни, че нивото на глутатион може да бъде прогностичен фактор за заболяемост и смъртност. Ние установяваме, че нивото на SH групите в кръвта е не само функция на възрастта, но е и полово-специфично. Статистически по-ниско е общото съдържание на тези групи при жени, в сравнение с мъже в пострепродуктивна възраст. Намалението кореспондира с установената редукция на GSH-Px активност на кръвта на жените, което е логично, имайки предвид факта, че редуцираният глутатион е субстрат на ензима. Получените данни предполагат изместване на редокс-статуса при жени в сравнение с мъже в пострепродуктивна възраст в полза на оксидативните процеси. Такова заключение се подкрепя от данни, получени при пациенти с невродегенеративни нарушения, които сочат, че жените са с завишено ниво на оксидативен стрес и по-голяма податливост на оксидативно увреждане в сравнение с мъжете. Така например, Miquel J и сътр. (*1998*) показват, че жени на възраст > 60 години имат по-високо ниво на липидни пероксиди в серума от мъже, каквато разлика не се наблюдава в по-млада възраст, което авторите свързат с повишен риск от атеросклероза. Вероятна причина за увеличаване на съдов риск може да бъде намалената



глутатион-пероксидазна активност в съдовата стена при възрастните, което води до намалена детоксикация на липидни пероксиди (*Miquel J et al, 1998*). Отместването на редокс-статуса на кръвта на жени след менопауза може да причини промени в чувствителността на сензорите за кислород и клетъчните функции, които са под контрола на редокс-чувствителните сигнални каскади (*Hack V et al, 1997*). Не случайно има данни за увеличени нива на маркери на възпалението, като хомоцистеин, при жени в сравнение с мъже на пострепродуктивна възраст. При тях нараства също така и нивото на общия холестерол, триглицеридите и LDL. Отместване на редокс статуса в посока на проксидантите се наблюдава по време на морфогенезата и процеса на стареене. Има доказателства за наличие на баланс между оксидативния статус, метаболитната скорост и метаболитния потенциал на видовете, тъй като се наблюдава компенсаторен отговор на клетките към въздействия, променящи нивото на про- и антиоксидантите.

Данните от настоящето изследване показват намалени антиоксидантни възможности на кръвта на възрастни жени спрямо възрастни мъже. В същото време по статистически данни средната продължителност на живот на жените е по-голяма в сравнение с тази при мъжете. Трябва да се отбележи, че продължителността на живот не винаги намалява при наличие на оксидативен стрес, но организмите, изложени на оксидативен стрес, могат да достигнат максималната продължителност на живот, само ако постигнат компенсаторно отместване на баланса между антиоксидантната защита и скоростта на радикалообразуване. Очаква се бъдещите изследвания да покажат дали има причинно-следствена връзка между пола и про/антиоксидантния статус на организма.

### **Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта при остър исхемичен инсулт**

В литературата са публикувани данни от проучвания, изследващи различни аспекти на протичащите свободно-радикални процеси при болни с исхемичен инсулт. Според нас това е първата работа, в която при мозъчен инсулт едновременно са оценявани общото и екстрацелуларно образуване на ROS от стимулирани фагоцити, състоянието на антиоксидантния капацитет и нивото на оксидативно увреждане на кръвта. Освен това е проследявана динамиката на свободно-радикалните процеси през острия и хроничен стадий на болестта и е търсена връзка между тези процеси и клиничното състояние на болните. Получените резултати показват, че при стимулация с опсонизиран зимозан, циркулиращите фагоцити при тежък исхемичен инсулт генерират по-голямо количество

извънклетъчни ROS, отколкото тези с лек инсулт. Нивото на извънклетъчната ROS продукция позитивно корелира с размера на инфаркта и нивото на инвалидност. По-голямо подобрене в неврологичния статус се наблюдава при пациенти с по-малка екстрацелуларна продукция на радикали. Затова този показател може да се разглежда като прогностичен маркер за изхода от заболяването и вероятната инвалидизация. Нещо повече, сравняването на общата (която преимуществено е вътреклетъчна) и екстрацелуларна продукция на ROS от клетките при опсонин-зависимата стимулация и различния начин по който заболяването ги повлиява говори най-вероятно за променена вътреклетъчна продукция на ROS. В този смисъл можем да предположим, че при остър исхемичен инсулт се наблюдава промяна в стимулираната по опсонин-зависим механизъм активност на фагоцитите - от една страна, увеличено вътреклетъчно образуване на ROS, независимо от тежестта на неврологичния дефицит, и от друга, увеличен екстрацелуларен дял на отговора, свързан с тежестта на неврологичното увреждане.

Нещо повече, ние установяваме увеличено образуване на оксиданти от фагоцитите на болните в отговор и на опсонин-независимия стимулант fMLP. Увеличението не зависи от тежестта на неврологичния дефицит и инвалидизирането на пациентите. Предполагаме, че то се дължи на увеличена секреция на MPO от клетките в екстрацелуларната среда. По литературни данни е наблюдавана увеличена активност на периферни левкоцити при пациенти с бъбречна исхемия (*Lauriat S et al, 1998; Okusa MD, 2002; Lien YH et al, 2003*) и исхемия на миокарда (*Baxter GF, 2002*). Това ни кара да мислим, че увеличеният оксидативен метаболизъм на клетките, който няма отношение към тежестта на неврологичния дефицит и инвалидизиране на болните е неспецифичен и стрес-индуциран.

Установяваме промяна в антиоксидантния капацитет на кръвта при болни с остър исхемичен инсулт. Завишена каталазна и глутатион-пероксидазна активност на кръвта се регистрира през целия остър стадий на инсулта. При пациентите с инсулт се наблюдава оксидативно увреждане, индикатор за което е установеното повишение в концентрацията на ROOH в плазмата и TBARM в кръвта на болните. Намереното увеличение в концентрацията на ROOH е в потвърждение на цитирани данни (*Imre SG et al, 1994; El Kossi MMH, 2000; Chen HH et al, 2001*). То се наблюдава при всички болни с инсулт. Освен това, нивото на плазмените ROOH се увеличава след първата седмица от началото на инсулта и остава високо до края на острия стадий. Смята се, че акумулирането на липидни ROOH намалява деформируемостта

на еритроцитите (*Imre SG et al, 1994*). Самите ROOH могат да инициират процеси на атерогенеза (*Yagi K, 1987*). Увеличените ROOH съвместно с наблюдавания увеличен брой PLT биха могли да се разглеждат като сериозен рисков фактор за бъдещи съдови изменения и повторен инсулт.

Може да се предположи, че праймираните левкоцити допринасят за увеличеното серумно ниво на ROOH, тъй като са публикувани изследвания при които се докладва увеличение на ROOH в плазмата след изкуствено добавяне на левкоцити и тяхното последващо стимулиране (*Frei B et al, 1988*). От друга страна, продуктите на липидната пероксидация могат да активират NADPH-оксидазния комплекс в плазмената мембрана на левкоцитите и да са причина за тяхното праймиране. Ние намираме, че GSH-Px активност на кръвта позитивно корелира с концентрацията на ROOH ( $r=0.65$ ;  $p=0.00019$ ), което позволява да се предположи, че увеличението на антиоксидантния капацитет е адаптивен отговор на натрупаните продукти на липидна пероксидация в циркулацията.

В литературата се докладва увеличено ниво на TBARM при пациенти с инсулт, зависещо от тежестта на заболяването (*Weigand MA et al, 1999; Re G et al, 1997; Skochii PH et al, 1992*). Няма достатъчно данни обаче за това как се променя количеството на TBARM в кръвта с времето, паралелно на развиващите се в мозъка патобиохимични изменения. Трябва да отбележим, че образуването на TBARM не е специфичен индикатор на липидна пероксидация (*Weigand MA et al, 1999*). Показано е, че в някои тъкани TBARM могат да се образуват чрез други неензимни и ензимни процеси, например от човешка тромбоцитна простагландин синтетаза. Нашите резултати потвърждават факта, че концентрацията на TBARM в кръвта е маркер за тежестта на неврологичния дефицит. В същото време тя корелира с нивото на инвалидност, но не корелира с никой от другите измерени показатели. За обяснение на последното може да се предположи, че TBARM най-вероятно са резултат не само на липидна пероксидация, но и на други дегенеративни процеси в мозъка. Ние заключаваме, че промените във фагоцитната функция за извънклетъчна продукция на ROS и концентрацията на TBARM в кръвта биха могли да се използват като индикатори за изхода от остър исхемичен инсулт.

### ***Комплексните Взаимоотношения между Възпалението и Съдовите Рискови Фактори Определят Когнитивните Нарушения в Острия Стадий на Исхемичен Инсулт***

Има данни, че исхемичният инсулт увеличава двукратно риска от развитие на когнитивни нарушения, независимо от други демографски и

клинични фактори (*Ivan CS et al, 2004; Desmond DW et al, 2002*). Честотата на когнитивните нарушения в острата фаза на инсулта понякога надхвърля 70% (*Nys GM et al, 2007*). Ранно настъпилото когнитивно влошаване след мозъчен инсулт е мощен прогностичен фактор за дългосрочна функционална зависимост и деменция (*Nys GM et al, 2007; Saxena SK, 2006*). Проведените до момента проучвания върху клиничните характеристики и детерминанти на когнитивните нарушения в острата фаза на исхемичния инсулт са твърде оскъдни, а потенциалните механизми за постинсултно когнитивно влошаване остават неизяснени (*Gorelick P et al, 2008; Lesniak M et al, 2008; Snaphaan L et al, 2007*).

Ние си поставихме за цел да определим когнитивния статус на пациенти в острата фаза на исхемичен инсулт и да установим значими клинични детерминанти, свързани с повишен риск от когнитивни дисфункции. Наша цел бе също така да потърсим надеждни предиктори за когнитивно влошаване с оглед предприемане на терапевтични подходи за предотвратяване и забавяне прогресията на постинсултния когнитивен упадък в дългосрочен план.

Установяваме, че когнитивен дефицит при изписване настъпва предимно при пациенти в напреднала възраст, от женски пол, с по-ниско ниво на образование, при които се регистрират високи базови стойности на систолично кръвно налягане, повишени концентрации на глюкоза при постъпване и високо серумно ниво на hs-CRP през първите 48 часа от началото на инсулта. Има данни, че увеличеното ниво на hs-CRP е свързано с тежестта на неврологичния дефицит и клиничния изход след инсулт (*Di Napoli M, 2003; Noble J et al, 2010; Ravaglia G et al, 2005*). Ние също установяваме по-високи серумни нива на CRP при пациентите с по-тежък неврологичен дефицит. Нещо повече, повишеното ниво на hs-CRP при постъпване е независим предиктор за когнитивен дефицит при изписване, което дава основание да приемем водещата роля на инсулта за възникване на когнитивни нарушения в острата му фаза. Такава находка е в съгласие с публикувани данни, а именно, че увеличеното ниво на CRP в острата фаза на исхемичния инсулт предсказва по-ниска постинсултна когниция (*Rothenburg LS et al, 2010; Xu G et al, 2009*).

Наред с възпалението, възрастта също е независим предиктор за когнитивни нарушения при изписване, което намира потвърждение в данните на други автори (*Tang W et al, 2006; Saxena SK, 2006*). Медираните от хронично субклинично възпаление възрастово-обусловени дегенеративни процеси потенцират остро невровъзпаление,

инициирано от цереброваскуларния инцидент и допринасят за постинсултно когнитивно влошаване (*Leys D et al, 2005*).

Ние установяваме също така, че нивото на образование е статистически значима променлива за когнитивни нарушения в острата фаза на исхемичния инсулт, което е в съгласие с работите на други автори (*Tang W et al, 2006; Saxena SK, 2006; Leys D et al, 2005*). По-високият риск от когнитивно влошаване при лицата с по-ниско образование вероятно се дължи на по-малък функционален когнитивен резерв. Освен това, образователното ниво има определяща роля за начина на живот и рисковия профил на пациентите.

Според нашите резултати 6 пъти е по-висока честотата на когнитивни нарушения при жените в сравнение с мъжете с остър исхемичен инсулт. След като артериалното налягане бе добавено към комплекса от независими променливи в конструирания от нас предиктивен модел, полът загуби своята статистическа значимост. Такъв резултат може да обясни публикуваните в литературата противоречиви данни за ефекта на пола върху постинсултния когнитивен статус (*Brian, Gottesman RF et al, 2010; Sachdev S et al, 2006; Leys D et al, 2005*) Обичайно исхемичните инсулти при жени настъпват в по-напреднала възраст, когато ролята на генетичните фактори, обуславящи полово-специфичните вариации на артериалното налягане отпада (*Franceschini N et al, 2006*). Нещо повече, различните етиопатогенетични механизми за възникване на исхемичен инсулт при пациенти от женски и мъжки пол също могат да бъдат отговорни за преобладаващите когнитивни нарушения при жени. Така например кардиоемболичните инсулти, изявяващи се с остри когнитивни дисфункции, възникват по-често при жени (*Кuo НК et al, 2005*).

В условията на остра церебрална исхемия се изявяват многообразни когнитивни нарушения, чиято клинична феноменология се определя основно от локализацията и обема на инфаркта (*Desmond DW et al, 2002; Sachdev S et al, 2006*). В нашето проучване локализацията на лезията не бе идентифицирана като значима променлива вероятно поради факта, че преобладаващата част от пациентите (83%) са с хемисфериални инсулти и лек до умерен неврологичен дефицит.

Въпросът за ролята на съдовите рискови фактори за развитието на когнитивни дисфункции в острата фаза на инсулта е дискутабилен (*Sundar U et al, 2010; Erkinjuntii T, 2007*). Ние установяваме, че артериалната хипертония, водещ рисков фактор за инсулт, и по-точно систолната артериална хипертония при постъпване, е сигнификантен независим

предиктор на постинсултния когнитивен дефицит при изписване. Данните, касаещи връзката на артериалната хипертония с постинсултното когнитивно влошаване, са противоречиви (*Leys D et al, 2005*). Според някои автори колкото по-високо е артериалното налягане, толкова по-голям е рискът от развитие на деменция след инсулт (*Tzourio C et al, 2003*). Други автори отчитат позитивен ефект на повишеното артериално налягане върху когницията като проява на компенсаторен механизъм за подобряване на мозъчната перфузия, особено в случаите с каротидна патология (*Leys D et al, 2005*). Ние обаче установяваме, че систолната артериална хипертония при постъпване има негативен ефект върху когнитивния статус на болните, вероятно медиран от оксидативни процеси и възпаление.

В условията на остър инсулт, хипергликемията е често регистрирано лабораторно отклонение, дори и при отсъствие на захарен диабет (*Baird TA et al, 2003*). Тя предизвиква лактатна ацидоза и свободнорадикална продукция, участва в механизми, които причиняват нарастване на мозъчния оток и упражнява пряко невротоксично въздействие, влошавайки функционалния изход и когнитивния статус в острата фаза на исхемичния инсулт (*Baird TA et al, 2003*). Ние намираме, че острата хипергликемия е значим детерминант за когнитивно влошаване при изписване, но поради наличието на корелационна връзка с базовата систолна артериална хипертония ( $R_s=0.358$ ;  $p=0.016$ ), тя не бе включена в предиктивния модел като независима променлива.

Когнитивните нарушения след остър исхемичен инсулт са резултат от сложни взаимоотношения между острия цереброваскуларен инцидент, причиняващ мозъчно увреждане, наличните съдови рискови фактори и индивидуалните особености на пациента. Тъй като ранното когнитивно влошаване предсказва дългосрочна функционална зависимост и деменция, своевременното идентифициране на пациенти с повишен риск от когнитивно влошаване е особено важно в клиничната практика.

### **Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта при остър хеморагичен инсулт**

През последните години са натрупани доказателства за участието на възпалителните процеси в патогенезата и прогресията на мозъчно-съдовите заболявания. Известно е, че при мозъчни травми и исхемичен инсулт възниква остро локално възпаление и промени в нивата на възпалителни цитокини (*Christensen H et al, 2004*). Изключително малко проучвания са насочени към установяване ролята и взаимовръзката между

възпалението и патофизиологичните последици на хеморагичния инсулт (*Godoy-Torres DA et al, 2005*).

Смята се, че след настъпването на мозъчен кръвоизлив, възпалителни медиатори от кръвта проникват в мозъчния паренхим и предизвикват възпалителна реакция (*Wang J et al, 2006*). От своя страна, самите мозъчни клетки образуват различни молекулни маркери на възпалението, които допринасят за развитието на системен възпалителен отговор. Високи серумни нива на CRP се откриват при пациенти с висок риск от церебрални и сърдечно-съдови инциденти (*Wakugawa Y et al, 2006*). Има данни също така за ролята на възпалението при възникването и прогресията на атеросклеротичния процес.

Ние установяваме, че нивото на CRP позитивно корелира с тежестта на неврологичния дефицит и клиничен изход на болни с остър sICH. Получените данни позволяват да се предположи наличие на връзка между възпалението и динамиката на болестния процес.

Непрекъснато се натрупват доказателства, че в настъпващото мозъчно увреждане след sICH участват множество механизми, в частност активиране на коагулационната каскада с продукция на тромбин, лизиране на еритроцити с индуцирана от хемоглобина и желязото токсичност, възпаление и активиране на комплементната каскада в мозъчния паренхим. Има данни, че липопероксидационните продукти в плазмата и еритроцитите на лица след прекаран sICH са значимо увеличени (*Aygun R et al, 2005*). Нещо повече, увеличената липидна пероксидация на еритроцитните мембрани, водеща до значима еритроцитна хемолиза, се свързва с намалени антиоксидантни възможности на еритроцитите (*Sudha K et al, 2004*). Високото ниво на липидни хидропероксиди в еритроцитите е потенциален рисков фактор за церебрален кръвоизлив (*Chen H et al, 2001*). Ние установяваме, че серумното ниво на липидните ROOH може да се разглежда като потенциален периферен маркер за степента на неврологичния дефицит и изхода след sICH. В отделни проучвания е докладвано, че антиоксидантните възможности на кръвта се променят след хеморагичен инсулт (*Sudha K et al, 2004a*). Намалено е нивото на витамини С и А в плазмата на болните и това намаление инверсно корелира с размера на хематома и индексите за клинично влошаване (*Sudha K et al, 2004b*). Редуцирана е общата супероксид-скавинджираща активност на плазмата при остър хеморагичен инсулт (*Aygun R et al, 2005*). Наблюдавани са високи нива на пикочна киселина (UA), един продукт на метаболизма със значима антиоксидантна активност, корелиращи с тежестта на

неврологичния дефицит и лош изход (*Karagiannis, A et al, 2007*). Има публикувани резултати за ролята на TAS при различни болестни състояния (*Chuang, C.C. et al, 2006; Cumurcu, B.E et al, 2009*), но доколкото ни е известно няма данни за неговата роля върху клиничната тежест и изхода от sICH.

Ние установяваме, че нивото на TAS в серума отразява както тежестта на неврологичния дефицит, така и изхода от болестта. Нещо повече, данните показват, че ниският антиоксидантен статус е индикатор за лоша прогноза и смъртност и потвърждават ролята на ROS в патофизиологичните механизми на инсульта. Може да се предположи, че наблюдаваната редуцирана антиоксидантна защита води до имунна дисфункция, а тя, от своя страна, до неблагоприятния изход от болестта (*Di Napoli M et al, 2006; Wang J et al, 2006*). Смята се, че TAS на серума се дължи главно на ниско-молекулни антиоксиданти, в частност SH-групи на протеини (главно албумин), пикочна киселина (UA), аскорбат,  $\alpha$ -токоферол и билирубин. Продукцията и консумацията на всеки отделен антиоксидант повлиява цялостния антиоксидантен капацитет. При това е необходима внимателна интерпретация на резултатите, тъй като нивата на UA в серума са високи и те в значителна степен допринасят за нивото на TAS. Нивото на UA нараства при редица болестни състояния, съпроводени с оксидативен стрес. В условията на локална исхемия, например, се наблюдава увеличена продукция на UA паралелно на увеличеното радикалообразуване. В такива случаи прооксидантните и провъзпалителни ефекти на UA преобладават над антиоксидантните й свойства и значителното нарастване на TAS е показател за наличен оксидативен стрес. Докладвано е, че серумните нива на пикочна киселина са независимо свързани с увеличен риск от смърт след sICH (*Karagiannis A et al, 2007*). Данните от настоящето проучване показват, че нивата на UA в серума на болните не са определящи за регистрирания TAS, тъй като той намалява с тежестта на неврологичното увреждане. Следователно други компоненти на статуса, в частност витамини E и C могат да са причина за наблюдаваната редукция. Има данни, че редуцираната плазмена концентрация на аскорбинова киселина,  $\alpha$ -токоферол и тиоли е свързана със степента на неврологичния дефицит след sICH (*Aygun R et al, 2005*). Едно ограничение относно евентуалното клинично приложение на TAS като маркер на оксидативен стрес, е че ние мерим антиоксидантен статус на серума, а това може да не отразява адекватно нивото на вътреклетъчните антиоксиданти в таргетната област - мозъчната тъкан след sICH.



Въз основа на получените от нас данни можем да заключим, че: 1. TAS намалява бързо в отговор на иницираната от кръвоизлива свръхпродукция на ROS; 2. Антиоксидантният капацитет на серума е важен фактор, обезпечаващ протекция срещу породения от инсулта оксидативен стрес. Бъдещите експериментални и клинични проучвания ще покажат доколко TAS може да се разглежда като предиктор за смъртност и клиничен изход.

### ***Независими Прогностични Фактори за Инвалидизация и Леталитет в Острия Стадий на Хеморагичен Инсулт***

Данни от клинични и експериментални проучвания сочат, че на мястото на интрацеребралния хематом се иницира мощен възпалителен отговор, който причинява увреждане на мозъка, прогресиращо в продължение на дни (*Leira R et al, 2004; Gong C et al, 2000, Di Napoli M et al, 2006*). Кръвоизливът създава условия и за свръхпродукция на ROS, иницираща оксидативен стрес, което се смята като допълнителен фактор за увреждане (*Aronowski J et al, 2005*). Понастоящем остава неизяснен въпроса за това, кой е най-увреждащият аспект от отговора и коя е най-подходящата мишена за терапевтична интервенция. Ние установяваме, че серумните нива на CRP и липидните ROOH отразяват тежестта на неврологичния дефицит и инвалидизиране на болни след sICH. Затова ние си поставихме за цел да се разработим предиктивни модели за смъртност и клиничен изход, базирани върху оценката на нивото на тези показатели в серума.

Ролята на акутно-фазовия протеин в патофизиологичните механизми на sICH е изследвана сравнително слабо. Yan J и сътр. (2009) установяват, че увеличеното серумно ниво на CRP е свързано с лоша прогноза след инсулт. Серумното ниво на CRP при пациенти, развиващи инфекция след мозъчен кръвоизлив е независим предиктор за лош изход от болестта (*Diedler J et al, 2009*). В настоящата работа ние установяваме, че серумното ниво на CRP и обемът на хематома са независими прогностични фактори за летален изход след sICH в краткосрочен аспект.

Серумното ниво на липидните хидропероксиди бе намерено да корелира със смъртността, но не е независим предиктор за ранния летален изход. Как да се обясни полученият резултат? CRP е не само маркер на възпалението, той изпълнява комплексни модулаторни функции. CRP може пряко да участва в поддържането и усилването на възпалението в церебралните съдове и мозъчното увреждане като предизвиква активиране на комплемента, левкоцитен хемотаксис и експресия на адхезионни молекули по механизъм на положителна обратна връзка (*Godoy-Torres DA*

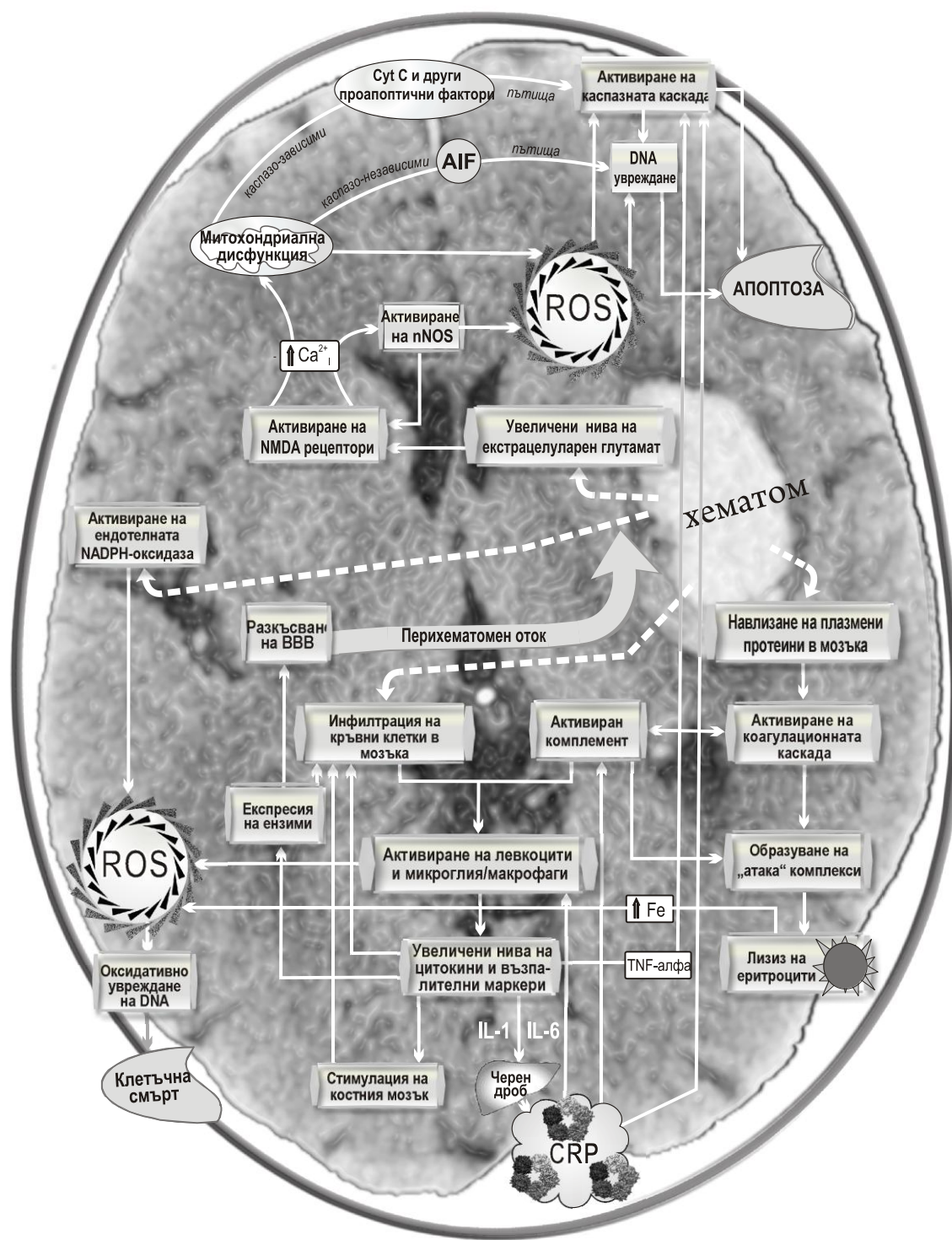
*et al, 2005, Kleining TJ et al, 2009, Delgado P et al, 2008*). CRP може също да се свързва директно към неутрофили, макрофаги и други фагоцитиращи клетки, стимулирайки по-този начин отделянето на цитокини – един пример за сложна многопластова регулаторна система. Той дори е в състояние пряко да индуцира апоптоза по каспазо-зависими механизми (*Blaschke F et al, 2004*). Намерената в настоящето изследване сигнификантна независима връзка между леталния изход и комбинацията от възпалителен маркер и обем на хематома сочи водеща роля на възпалителната система в индуцираното от кръвоизлива мозъчно увреждане. Според една изказана напоследък хипотеза, регулаторните пътища, активирани при кръвоизлива са протективни при малките и силно увреждащи при големите кръвоизливи (*Castillo J et al, 2002; Keep RF et al, 2005*). В подкрепа на това предположение са експерименти с човешка перихематомна мозъчна тъкан, които показват налична експресия на мрежа както от про-, така и от антивъзпалителни гени. Балансът между про- и антивъзпалителните процеси вероятно се нарушава при тежките кръвоизливи, водейки до развитието на масивна самоунищожавеща възпалителна реакция. Иницирираните при тях свободно-радикални процеси са само един от увреждащите компоненти на комплексния възпалителен отговор, което може да обясни защо серумното ниво на CRP, а не ROOH, е предиктор за летален изход (Фиг.62).

Публикуваните в литературата данни за ролята на оксидативния стрес в патофизиологичните механизми на увреждане след sICH са оскъдни. Високи нива на оксидативен стрес, оценени посредством нивото на протеинови карбонили са установени на първия час след инжектирането на автоложна кръв в експериментални модели (*Wagner KR et al, 2002*). Интрацеребрална инфузия на лизирани еритроцити в мозъка предизвиква редуцирана активност на антиоксидантни ензими, оксидативно увреждане на DNA, забележим мозъчен оток и неврологичен дефицит (*Nakamura T et al, 2005; Wu J et al, 2002*). Увеличено ниво на MDA е регистрирано в серума и еритроцитите на пациенти със sICH (*Beg M et al, 2005*).

За първи път в настоящата работа се установява, че нивото на изследвания оксидативен маркер, серумните ROOH, е независим прогностичен фактор за неблагоприятен клиничен изход от заболяването при преживелите инсульта лица. Вероятно при тях иницирираният възпалителен отговор не е неконтролируемо ескалиращ и приносът на ROS в патофизиологичните механизми на увреждане и възстановяване е решаващ. Увеличената концентрация на ROOH в серума на болните след

инсулт се дължи вероятно на редица паралелно протичащи вериги, включващи оксидативни процеси, свързани с патофизиологията на растежа и резорбцията на интрацеребралния хематом.

След възникването на кръвоизлива, ROS се отделят от неутрофили, съдов ендотел и активирани микроглия/макрофаги (*Loftspring MC et al, 2009*). От друга страна, екстрацелуларната среда е изложена на въздействието на хемоглобина и неговите разпадни продукти, а е добре известна ролята на желязото в катализираното образуване на  $\cdot\text{OH}$  и липидна пероксидация (*Hua Y et al, 2007*). Документирано е, че нивото на освободеното от хемоглобина желязо остава високо в мозъка в продължение на месец (*Wu J et al, 2003*), а използването на хелатори на желязото подобряват неврологичния статус на болните (*Hua Y et al, 2007*). Медираната от еритроцитния лизис невротоксичност възниква в значителна степен след третия ден от началото на инцидента (*Montaner J et al, 2005; Kleinig TJ et al, 2009*). Тъй като пробите в настоящето изследване са вземани от болните в рамките на първите 48 часа след началото на инсулта, то може да се предположи, че продуктите от еритроцитния лизис нямат значим принос към регистрирания оксидативен отговор. Вероятно други паралелни процеси, водещи до оксидативен стрес са причина за регистрираното завишено серумно ниво на липидните пероксиди (*Wang J et al, 2007*). Така например, има данни, че в кратки срокове след инжектирането на автоложна кръв в експериментални модели, в екстрацелуларното пространство на перихематомната област се натрупват глутамат и други аминокиселини (*Qureshi AI, 2003*). Нещо повече, плазмената концентрация на глутамат при постъпване в болницата корелира с лошия неврологичен изход от болестта, а е добре известно ексцитотоксичното действие на глутамата, водещо до активирането на каспазните каскади и апоптозата (Фиг.62) (*Castillo J et al, 2002*). Високи нива на радикалообразуване могат възникнат и поради съпътстващата тези процеси митохондриална дисфункция и да бъдат увреждащи. ROS-медираното активиране на Fas-системата вероятно също е свързано с апоптична клетъчна смърт в тъканта, обграждаща хематома (*Delgado P et al, 2008*). Кой от оксидативните пътища е доминантен е неясно, но серумните липидни хидропероксиди се явяват независим предиктор за лош клиничен изход от заболяването. След потвърждаване на получените резултати с по-голяма група пациенти, маркер за оксидативен стрес, в добавка на утвърдените неврологични и радиологични показатели, може да бъде използван като допълнителен критерий за стратифициране на болните, при които се очаква тежко инвалидизиране и е наложително предприемането на допълнителни терапевтични подходи.



**Фиг. 62** Хипотетична схема за ролята на възпалението и медираните от ROS пътища в комплексния патологичен отговор, иницииран от спонтанния интрацеребрален кръвоизлив

Съкращения: ROS – активни форми на кислорода, TNF – туморен некротичен фактор, DNA – деоксирибонуклеинова киселина, AIF – индуциращ апоптозата фактор, IL – интерлевкин, CRP – C-реактивен протеин

## Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта в хроничния стадий на инсулта

### Фагоцитна активност и оксидативно увреждане

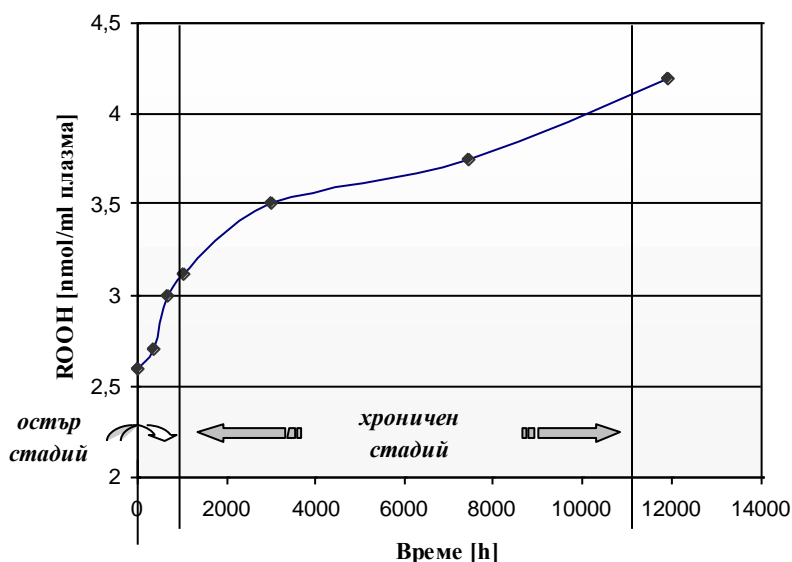
Ние установяваме увеличена спонтанна фагоцитна активност, респективно променени адхезивни свойства, при инсулт в хроничен стадий спрямо контрола. Тази активност не зависи от типа на инсулта и остава висока месеци след неговото начало. Вероятно наличието на съдови увреждания след прекаран инсулт е причина за генериране на свободни радикали от ендотелните клетки (*Zweier JL et al, 1988*). Радикалите иницират липидна пероксидация на клетъчните мембранни компоненти и отделяне на възпалителни медиатори, които привличат левкоцити. Прилепвайки към съдовия ендотел, левкоцитите отделят разнообразни токсични продукти, които водят до задълбочаване на съдовите увреждания и увеличаване на вероятността за повторен инсулт (Фиг. 63).



**Фиг. 63** Хипотетична схема за възможното влияние на оксидативното увреждане върху процесите, водещи до повторен инсулт

Van Kooten F и сътр. (1999) са показали, че при пациенти в хроничната фаза на инсулта се наблюдава активиране и на тромбоцити. Съществуват множество взаимодействия между левкоцити и тромбоцити, тъй като двата

типа клетки имат общи продукти и активатори (*Kochanek PM et al, 1990*). Тези взаимодействия могат да доведат до образуване на левкоцит-тромбоцитни агрегати и по-този начин да инициират тромбози и повторен инсулт (Фиг. 63). Нашите резултати сочат, че периферните фагоцити на пациентите не показват променена стимулирана активност за извънклетъчно образуване на ROS и при двата механизма на стимулация. От друга страна, концентрацията на серумните хидропероксиди при болните с инсулт в хроничен стадий е по-висока от тази на здрави лица, което намира потвърждение в литературата (*Yagi K, 1987*). Повишена е също така и концентрацията на ROOH в плазмата и TBARM в кръвта на пациентите. Нашите резултати показват, че нивото на ROOH след острия стадий на инсулта продължава да се покачва в продължение на месеци след началото на съдовия инцидент (Фиг. 64).



**Фиг. 64** Ниво на ROOH през острия и хроничен стадий на мозъчен инсулт

Затова може да се предположи, че установеното увеличение на плазмените ROOH в случая е маркер на хронично съдово увреждане (Фиг. 63). Известно е, че ROOH в кръвта атакуват кръвоносните съдове и при достатъчно висока концентрация могат да доведат до увреждане на съдовата стена (*Yagi K, 1987*). Освен това, акумулирането на липидни ROOH намалява деформируемостта на еритроцитите и левкоцитите и по този начин може да предизвика хемореологични разстройства (*Imre SG et al, 1994; Велчева И, 1995*). Самите ROOH участват в процеса на атерогенеза като инициират серия от събития, водещи до завишено поглъщане на липопротеини с ниска плътност от макрофагите и

образуване на липид-обременени пенести клетки, една от най-ранните атеросклеротични лезии в артериалната интима (Yagi K, 1987; Frei B et al, 1988). От своя страна, атеросклеротичните промени в интимата и ендотелните лезии могат да активират фагоцитите. Обратно, активираните левкоцити могат да предизвикат атеросклероза, като окисляват липопротеини с ниска плътност в кръвния ток (Key N et al, 1992; Wieland E et al, 1993). Затова редуцирането на нивото на ROOH може да се разглежда като начин за превантивно третиране на атеросклерозата (Frei B et al, 1988). Също така елиминирането на липидните пероксиди от плазмата преди да се погълнат от периферните тъкани значително би редуцирало хроничните нарушения, породени от оксидативния стрес.

#### *Възможни оксидативни механизми за възникване на повторен инсулт*

Въз основа на получените резултати и литературни данни сме предложили хипотеза за ролята на фагоцитната активация и оксидативното увреждане в патогенезата на повторния инсулт. Условно предполагаемите събития водещи до реинсулт биха могли да се разделят на три типа процеси: 1). Процеси, свързани с промени в реологичното поведение на кръвните клетки, водещи до хемореологични разстройства и влошаване на микроциркулацията; 2). Процеси, свързани с възникването на атероматозни компликации в стените на кръвоносните съдове; 3). Процеси, свързани с образуването на левкоцит-тромбоцитни агрегати. Трябва да не се забравя, че наблюдаваните събития не са независими и между тях съществуват сложни обратни връзки (Фиг. 63).

Според нас най-малко вероятни са процесите, които са свързани с променена клетъчна реология и влошена микроциркулация под действие на продукти на липидна пероксидация в циркулацията. Такива събития са наблюдавани при по-високи концентрации на липидни хидропероксиди от намерените в настоящата работа (Yagi K, 1987). Разбира се вероятността може и да не е толкова малка при отделни лица със значима концентрация на продукти на липидна пероксидация. Освен това, колкото и малък да е рискът от инсулт произтичащ по този механизъм, той трябва да се има предвид, тъй като може да се окаже важен в контекста на целия рисков профил на пациентите. По-вероятни са другите два типа процеси, като може би водещи са атероматозните компликации в стените на кръвоносните съдове. Атеросклерозата е основен патологичен процес при инсулт и сега се разглежда като заболяване с хронично-възпалителен характер (AHA Scientific Statement, 2001). Възпалението в атеросклеротичните лезии още повече задълбочава съдовото увреждане (Ross R, 1999). Ние установяваме увеличена окислителна

активност на циркулиращите фагоцити при болни с инсулт в хроничен стадий. Много е вероятно хроничното възпаление на ендотела пряко да кореспондира с тази завишена активност (*Lehr HA et al, 2002*) и в резултат на това да се увеличават продуктите на липидната пероксидация в циркулацията (*Goldstein LB, 2001; Langlois M et al, 2001*). Третият тип процеси са свързани с образуването на левкоцит-тромбоцитни агрегати и иницирането на тромбози (Фиг. 6.3). Важността на този механизъм произтича от факта, че антиромбоцитната терапия редуцира рецидива с 20-25 % (*Grotta J et al, 2001*).

Нашите данни показват, че трите основни типа процеси, водещи до повторен инсулт могат да се опосредстват от хиперактивността на периферните левкоцити и променения баланс между образуваните ROS и антиоксидантния потенциал на кръвта, имащ за резултат оксидативно увреждане. В световен мащаб са разработени различни терапевтични стратегии с цел да се редуцира вероятността от настъпване на реинсулт. Факт е обаче, че много инсулти не могат да се предотвратят на базата на съществуващите терапии. Нещо повече, епидемиологични данни сочат една тенденция на нарастване на случаите с инсулт (*George MG et al, 2011*). Засега не е известно дали оксидативните процеси са причина или следствие на наблюдаваните събития, водещи до инсулт, но въздействието върху тях, паралелно с другите терапии, е изключително важно. Комбинирана терапия, включваща невропротективно лечение и антирадикални агенти може да бъде бъдеща стратегия, като стремежът следва да е в посока постигането на кооперативен ефект на отделните прилагани медикаменти. Също така трябва да бъдат проследявани и подлагани на профилактика не само лица, преживели инсулт, но и такива с висок риск за инсулт.

#### *Независими прогностични фактори за постинсултен когнитивен дефицит*

Механизмите на постинсултния когнитивен упадък в хронична фаза са все още недостатъчно изучени. Има данни, че инсултът увеличава риска от когнитивно увреждане независимо от демографските и индивидуални рискови фактори на болните (*Ivan CS et al, 2004*). Демонстрирана е тясна асоциация на когнитивното увреждане с локализацията на лезията през острата фаза на инсулта (*Nys GM et al, 2007*). Фактори, в това число характеристики на инсулта (дисфазия и доминантни синдроми) и история на инсулт независимо допринасят за увеличен риск от когнитивно увреждане (*Knopman DS et al, 2009*). Някои съдови рискови фактори като история на диабет, хипертония и преходна исхемична атака са също тясно обвързани с когнитивното увреждане в ранните и по-късни фази на инсулта (*Kuo HK et al, 2005*). Тези съдови рискови фактори са



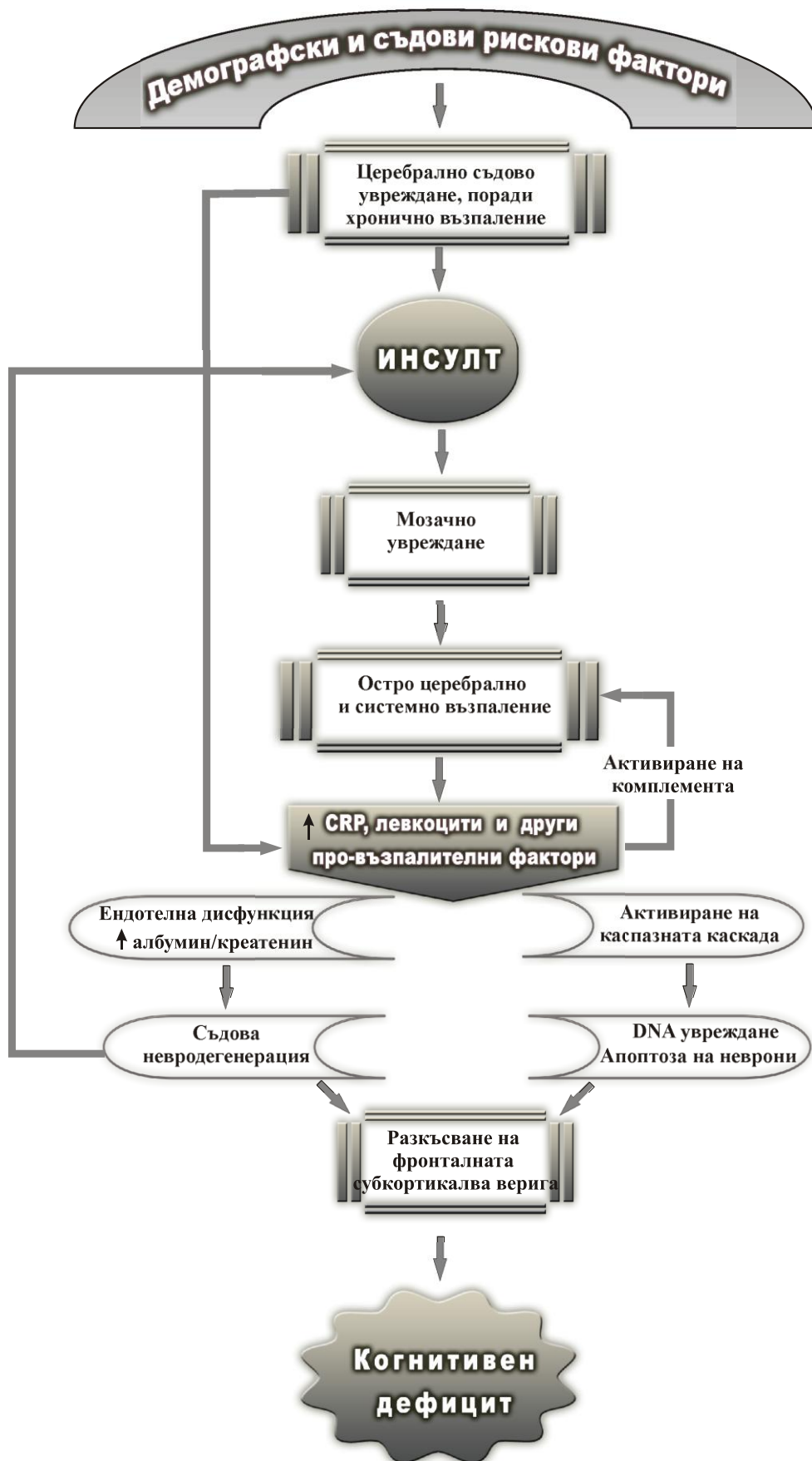
предпоставка за възникването на когнитивен упадък при възрастни лица и без история на инсулт.

Почти половината от включените в настоящето изследване лица, за които е известно, че нямат прединсултна деменция и постинсултна депресия, показват лек до умерен когнитивен дефицит на първата година след исхемичен инсулт, което намира потвърждение в работата на Serrano S и сътр. (2007). Такъв резултат се подкрепя и от други проучвания, в които е установено, че възникването на съдов инцидент има съществено увреждащо влияние върху когницията дори при лица с нисък базов риск за деменция (Ivan CS et al, 2004).

Нашите резултати показват, че болни с лек до умерен постинсултен когнитивен дефицит са по-възрастни, по-често жени, имат по-ниско ниво на образование, история на диабет и по-високо серумно ниво на hs-CRP при постъпване. Нещо повече, лицата с когнитивно влошаване имат по-висок общ брой левкоцити и гранулоцити през цялата година след инсулта. От друга страна, при групата с нормална когниция се наблюдава постепенна редукция в общия брой левкоцити и трайно поддържане на нисък брой гранулоцити в продължение на една година.

От значимите детерминанти, независими предиктори за всички нива на когнитивния статус на първата година след инцидента са серумното ниво на hs-CRP и възрастта. Доколкото ни е известно, това е първото проучване, при което ефектът на факторите е оценяван по отношение на когнитивен статус, разглеждан като ординална три-степенна зависима променлива.

Теорията, свързваща възпалението с когнитивния упадък е сравнително нова. Отличителна черта на възпалителната реакция в мозъка е активирането на резидентна микроглия и инфилтрация на периферни възпалителни клетки. Активирането на възпалителните клетки, от своя страна, води до образуване на провъзпалителни и цитотоксични фактори (Wang Q et al, 2007), които стимулират продукцията на CRP от черния дроб (Фиг. 74). В потвърждение на тези представи са намерените в настоящата работа корелационни връзки между нивото на CRP, от една страна, и общия брой периферни левкоцити ( $R_s=0.301$ ,  $p=0.040$ ) и гранулоцити ( $R_s=0.389$ ,  $p=0.007$ ) през първите 48 часа след инцидента, от друга. Микроалбуминурията се разглежда като маркер за ендотелна дисфункция, характерна не само за бъбреците, но и за мозъка и се смята произхождаща от оксидативни процеси и възпаление. Има изследвания, показващи асоциация на албуминурията с маркери на възпалението, хемостазата и когнитивния упадък.



**Фиг. 64** Хипотетична схема за съществуването на положителна обратна връзка между иницираното от инсулта остро възпаление и обусловеното от съдовите рискови фактори нискостепенно хронично възпаление, водеща до поддържането на висок имунен статус, водещ до когнитивен упадък

Ние също установяваме връзка между серумното ниво на hsCRP и отношението албумин/креатинин през първите часове след инцидента ( $R_s=0.465$ ,  $p=0.001$ ). Нещо повече, това отношение се запазва високо през цялата година за лицата с когнитивен упадък, което сочи наличието при тях на самоподдържаща се ендотелна дисфункция, вероятно инициирана от остро възпаление. Резултатите от настоящето проучване показват, че инсултът преди всичко е доминантната причина за дългосрочния когнитивен упадък, тъй като връзката между hs-CRP и когницията е независима от наличния съдов рисков профил на болните.

Постисхемичното възпаление е динамичен процес, включващ комплексна мрежа от различни взаимодействия, развиващи се на фона на съпътстващите рискови фактори (Фиг. 64) (*Iadecola C et al, 2001; Wang Q et al, 2007*). Рисковите фактори сами по себе си допринасят за възникването на когнитивни нарушения в дългосрочен аспект, като ефектът може да се разглежда медиран от нискостепенно хронично възпаление (Фиг. 64).

Нашите резултати показват, че възрастта е независим рисков фактор за когнитивен упадък на първата година след инцидента, което намира потвърждение в работите на Jaillard A и сътр. (2009) и Saxena SK (2006). Редица възрастово-обусловени функционални промени в мозъка могат да намалят мозъчния капацитет за компенсация на инициираното от инсулта съдово увреждане (*Whalley LJ et al, 2004*). От друга страна, стареенето само по себе си се съпровожда с влошаване на паметовите функции (*Winocur G et al, 1996*). Причина за това могат да бъдат съпътстващи стареенето дегенеративни процеси в мозъка, развиващи се на фона на хронично нискостепенно възпаление (*Straub RH et al, 2001*). Не случайно увеличената серумна концентрация на hs-CRP се свързва с влошена когниция и увеличен риск от съдова деменция при лица в напреднала възраст и без съдов инцидент (*Kotulainen P et al, 2007; Xu G et al, 2009*). Данните от настоящето изследване сочат, че съвместният ефект на фактори като стареене и невровъзпаление може значимо да отслаби мозъчните вериги и да направи мозъка по-податлив към по-нататъшно мозъчно увреждане след инфаркта (Фиг. 64). Стареенето (съпътствано от хронично възпаление) и инфарктът (иницииращ остро възпаление) имат подобна съдова патофизиология и вероятно упражняват адитивен ефект в посока влошаване на когнитивния статус на болните.

В тази работа ниското ниво на образование е значима детерминанта за възникването на когнитивен упадък на първата година след инсулта,

както е докладвано и преди (*Saxena SK, 2006; Jaillard A et al, 2009*). Бъдещи изследвания следва да покажат дали образователният статус е независим предиктор на ординалния когнитивен изход. От друга страна, ние установяваме, че жените е по-вероятно да покажат когнитивни нарушения на първата година след инсулта, което е в съгласие с предишни находки (*Gottesman RF et al, 2010*). Възможно обяснение на такава находка е фактът, че имунната система на възрастните жени е в едно по-активирано състояние в сравнение с мъже на същата възраст, както може да се заключи от нивата на цитокини в циркулацията (*Straub RH et al, 2001*). Данните сочат също така, че историята на диабет корелира както с функционалния ( $\chi^2=9.265, p=0.05$ ), така и с когнитивния изход на болните. Предишни изследвания дори са установили, че диабетът е независим предиктор за развитието на пост-инсултна деменция, което не се потвърди в настоящето проучване. Очевидно някои рискови фактори са силно вътрешно-зависими, като например невровъзпалението и диабета.

#### **Възпаление и про/антиоксидантен статус на кръвта на лица с артериална хипертония и диабет**

Смята се, че сред съдовите рискови фактори, диабетът и хипертонията са водеща причина за сърдечно-съдови и мозъчно-съдови заболявания. За съжаление тези два рискови фактора често съществуват съвместно, като има данни, че 60% от пациентите с диабет са хипертоници и до 20% от хипертониците са диабетици (*Cohen RA et al, 2010*). Смъртността от диабет в световен мащаб нараства изключително бързо, като тя е двукратно по-висока при наличие и на хипертония.

Връзката между оксидативния стрес, антиоксидантната защита и патофизиологията на диабета и хипертонията е твърде комплексна и не напълно изяснена. По-принцип хипертонията и диабетът се съпровождат и с други рискови съдови фактори като микроалбуминурия, затлъстяване, инсулинова резистентност, дислипидемия, хиперкоагулабилитет и увеличен възпалителен статус. Всичко това в крайна сметка води до развитието на съдово заболяване, което е основна причина за преждевременната смърт на пациентите.

Ендотелът е основната мишена на съдовите рискови фактори, в това число на диабета и хипертонията. Ендотелните клетки са главен участник в развитието на съдово възпаление и атеросклероза. Макар ROS, произведени в ниски нива да играят физиологична роля за поддържането на съдовия интегритет, увеличените нива на ROS при хипертония и

диабет са свързани със съдова дисфункция, влошена съдова релаксация, увеличен растеж на гладкомускулни клетки и хипертрофия, както и отлагане на екстрацелуларни матриксни протеини.

Епидемиологични данни сочат, че диабетът и хипертонията могат да ускорят атеросклеротичния процес в съдовата стена и да увеличат вероятността от възникване на съдов инцидент, в частност инсулт (*Castoldi G et al, 2007*). И острата, и хронична хипергликемия предизвикват ендотелна дисфункция. Холестеролът се разглежда като причина за атеросклерозата. Другите липиди като триглицеридите и фосфолипидите също корелират с развитието на съдовия атеросклеротичен процес. Изследването на плазмения липиден профил в настоящата работа показва увеличено ниво на триглицериди при болните спрямо контрола. Такъв резултат е в съгласие с публикувани данни (*Likidlilid A et al, 2010*). Няма значима разлика в нивата на общия холестерол, което е в съгласие с данните на Nyarko A и сътр. (1997) и противоречи на резултатите на (*Likidlilid A et al, 2010*). Увеличени са нивата на LDL-C при неконтролирания диабет. Сnižено е нивото на HDL-C както при контролирания, така и при неконтролирания диабет (*Likidlilid A et al, 2010*). Смята се, че при диабет, увеличената секреция на аполипопротеин В, един протеин идентифициран като ключов компонент в процеса на асемблирането на много ниско плътните липопротеини, води до увеличени нива на триглицериди и редуцирани нива на HDL. Освен това, увеличаването на свободни мастни киселини и глюкоза при диабет може да снижи активността на липопротеин липазата, важен ензим за остраняването на тези липопротеини от циркулацията. Затова дислипидемията е логично следствие от хипергликемията при диабетиците. Хиперлипидемията е отличителна черта и на хипертонията и може да има неблагоприятни последствия за болните, тъй като има данни, че окислените липопротеини инактивират азотния оксид и по-този начин още повече задълбочават съдовите им нарушения.

Епидемиологичните изследвания обезпечават доказателства и за други общи патофизиологични звена на диабета и хипертонията. Инсулиновата резистентност, възпалението и продукцията на ROS, резултираща в ендотелна дисфункция, увеличената тъканна ренин-ангиотензин-алдостеронова система и увеличена симпатикова нервна система, всички те участват в комплексната патофизиология на диабета и хипертензията.

Предполага се, че възпалението играе важна роля при атеросклерозата и в патогенетичните механизми на някои съдови нарушения. Много

провъзпалителни молекули се разглеждат като потенциални маркери за възникването и развитието на сърдечно-съдов инцидент. Сред тях, акутно-фазовият CRP се разглежда като чувствителен маркер за предсказването на бъдещ съдов инцидент при пациенти с ангина пекторис и в първичната сърдечно-съдова превенция. CRP се разглежда също като съдов рисков маркер при диабет и предиктор на риска за развитието му, което обвързва съдовите нарушения при диабета с възпалението. Ние установяваме, че хипертензивните диабетици имат увеличен общ брой левкоцити, тромбоцити и hs-CRP спрямо контрола. В проучването на Yasunari K и сътр. (2002) се демонстрира, че неутрофилите и моноцитите от хипертензивни диабетици предизвикват оксидативен стрес посредством увеличена продукция на ROS. Нещо повече, серумните нива на CRP корелират с оксидативната активност на моноцитите. Има данни, че при здрави лица увеличените серумни нива на hs-CRP са свързани с увеличено съдържание на провъзпалителни молекули в кръвта. Пациенти с диабет тип 2 и високи нива на hs-CRP показват завишена реактивност в отговор на стимули, продуциращи различни интерлевкини, което сочи възможно наличие на възпалителен атеросклеротичен процес (*Castoldi G et al, 2007*). Трябва да се отбележи, че ролята на hs-CRP като пряк етиологичен агент в атеросклерозата и възпалителните процеси остава неясна и е в процес на активно изследване. Данните от настоящето проучване са в подкрепа на представата, че хипертонията и диабетът индуцират нискостепенно възпалително състояние. Има публикувани данни, че пациентите с диабет имат завишено ниво и на хомоцистеин (*Pasupathi P et al, 2010*). Други изследвания показват, че стареенето се съпровожда с увеличени нива на хомоцистеин и оксидативен стрес по начин, подобен на този наблюдаван при по-млади лица с хипертония и диабет, независимо от възрастта (*Dominguez LJ et al, 2010*). Хиперхомоцистеинемията допълнително може да индуцира дисфункция на съдовия ендотел и да увеличи пролиферацията на съдовите гладкомускулни клетки посредством увеличен оксидативен стрес.

Нормално ROS се образуват в съдовата стена по един стриктно контролиран и регулиран начин. При физиологични условия източник на ниски концентрации на супероксид и водороден пероксид в клетките са митохондриите и NADPH-оксидазите. Заедно с азотния оксид, ROS функционират и като сигнални молекули посредством тяхната способност да предизвикват обратими посттранслационни модификации на протеини, като образуване на S-нитрозо- и S-глутатион-адукти върху тиолите на

цистеина. Така например въвеждането на такива адукти в протеини, в това число р21ras и калциевата АТФ-фаза на саркоплазматичния ретикулум, може да регулира контракцията и релаксацията на съдовите гладко-мускулни клетки и техния растеж. При патологични условия увеличената продукция на ROS води до ендотелна дисфункция. Ренин-ангиотензин-алдостероновата система е основен активатор на NADPH оксидазата и ROS продукцията при хипертония (*Schiffrin EL et al, 2004*). Ангиотензин II (Ang II) стимулира NADPH оксидазата посредством увеличаване на експресията на нейните субединици или увеличаване на ROS продукцията в съдовите гладко-мускулни клетки, ендотелни клетки и фибробласти.

Ендотелната синтаза на NO<sup>•</sup> (eNOS) съдържа както оксидазен, така и редуктазен домейн. Когато двете ензимни активности са декуплирани поради отсъствието на аргининов субстрат или на кофактора тетрахидробиоптерин, eNOS произвежда освен азотен оксид, също и супероксид, правейки по този начин ензима източник на пероксинитрит. Произведеният от декуплираната eNOS пероксинитрит се смята за основен увреждащ фактор при Ang II-индуцираната хипертензия и диабет.

Противоречиви данни са докладвани за активността на основните ключови антиоксидантни ензими при хипертония и диабет. CuZn SOD е показано да нараства (*Likidilid A et al, 2010*), намалява (*Pasupathi P et al, 2010*) или остава непроменена (*Mahboob M et al, 2010*) в еритроцитите на болните. В настоящето проучване ние установяваме, че активността на еритроцитната CuZn SOD се увеличава при хипертензивните диабетици в сравнение с контролната група. Нещо повече, Seghrouchni I и сътр. (2002) показват, че активността на CuZn SOD намалява при нормализиране на кръвно-захарното ниво и инсулинова терапия, но не достига нормални нива. Dominguez LJ и сътр. (2010) също показват, че активността на ензима е по-висока при пациенти с диабет тип 1, като след лечение намалява, но остава завишена в сравнение с контролната група. Такива данни за увеличена CuZn SOD активност предполагат, че индуцираният от диабета и хипертонията оксидативен стрес се дължи на увеличена продукция на супероксид в циркулацията и увеличението на активността на ензима може да е компенсаторен резултат от такава увеличена продукция. Смята се, че в условията на хипергликемия и хипертензия, активирането на NADPH оксидазата води до свръхпродукция на супероксид. Увеличена CuZn SOD активност наблюдаваме и при

стареене, което е в съгласие с други автори (*Kusano C et al, 2008*) и е в подкрепа на предположението за общите звена между стареенето, диабета и хипертонията.

Противоречиви са публикуваните в литературата данни за състоянието на глутатион-пероксидазната и каталазна активности на кръвта (*Likidlilid A et al, 2010*). Ние не установяваме промени в CTS активност на кръвта. Намалява обаче GSH-Px активност, както и общото ниво на SH-групи в кръвта. Данните се подкрепят от други автори (*Kusano C et al 2008; Mahboob M et al, 2005, Pasupathi P et al, 2010*), които докладват намаление на глутатиона и глутатион-пероксидазната активност при диабетиците. Свърхпродукцията на активни форми на кислорода и азота може да изчерпи антиоксидантните възможности на кръвта, водейки до акумулиране на клетъчно увреждане. Самите активни форми на кислорода могат селективно да взаимодействат с протеините и техните аминокиселинни остатъци. Особено чувствителни са местата с каталитична активност. Пероксинитритът, например, реагира с тиолите на тирозина и цистеина и с аминокиселините метионин и триптофан. Тъй като някои от тези остатъци са съществени за ензимната функция, оксидантите могат да инактивират протеини, което изисква тяхната ресинтеза. Така оксидантите могат да предизвикат целенасочено нарушение на съдовата функция. Oookawara T и сътр. (1992) предполагат, че намалената активност на ензимите може да се дължи на гликиране или предизвикана от ROS фрагментация посредством автоокисление. При хипертензивни пациенти отношението окислен/редуциран глутатион е високо и активността на основните ензими е значимо по-ниска в цялостна кръв и периферни мононуклеарни клетки в сравнение с нормални лица. В същото време ние не установяваме разлика между общия антиоксидантен капацитет на серума на болните и контролата. Има данни, че диабетици с и без протеинурия имат много-по-ниски серумни нива на TAS от контролите (*Opара EC et al, 1999*). Този факт е потвърден от Shin MJ et al (2006), които докладват наличие на инверсна корелация между инсулиновата резистентност и плазмените нива на TAS,  $\beta$ -каротен и  $\alpha$ -токоферол при недиабетични хипер-холестеролемични пациенти. Има данни за инверсна корелация между TAS и гликирания хемоглобин. Липсата на промяна в серумните нива на TAS в настоящата работа може да се дължи на завишено ниво на пикочна киселина в кръвта на хипертензивните диабетици. Това се потвърждава от Kusano C и сътр. (2008), които сочат липса на промяна в статуса при лица със завишено



съдържание на пикочна киселина. Такава увеличена продукция на урея при диабетиците може да се дължи на увеличен катаболизъм на чернодробни и плазмени протеини (*Pasupathi P et al, 2010*). Известно е, че при диабет се наблюдава нарушаване на протеиновия метаболизъм, негативен азотен баланс със загуба на азот от органите. Намаляването на общото съдържание на протеини в кръвта може да се дължи на микропротеинемия и албуминурия, важни клинични маркери на диабетната нефропатия.

Увеличеният оксидативен стрес предизвиква увеличени нива на продукти на липидната пероксидация в циркулацията. Ние установяваме увеличени нива на липидните хидропероксиди в серума на хипертензивните диабетици. Увеличение на нивата на МДА е докладвано при пациенти с неефективно контролиран диабет (*Likidlilid A et al, 2010; Kusano C et al, 2008*), като нивата са още по-високи при диабет с усложнения (*Likidlilid A et al, 2010*). Увеличени нива на МДА са регистрирани в кръвта на болни с диабет, независимо от пола. Нещо повече, плазмените нива на МДА корелират с продължителността на диабета. Увеличени нива на МДА са регистрирани в кръвта на болни с хипертония без съпътстващ диабет (*Biswas U et al, 2010*). В експериментални модели на хипертония (SHR) са увеличени нивата на 8-хидрокси-2-деоксигуанозин, маркер за оксидативно увреждане на DNA в аортата, сърцето и бъбреците спрямо контрола. Серумните реактивни съединения на TBA са също увеличени при диабет и хипертония. При неконтролирания диабет окислението на глюкоза посредством пентозо-фосфатния път вероятно води до свръхобразуване на NADPH, който от своя страна, може да предизвика липидна пероксидация в присъствието на цитохром P<sub>450</sub>. Хиперлипидемията също е докладвана като една от причините за увеличената липидна пероксидация при диабет.

От получените резултати може да се заключи, че оксидативният стрес е важен фактор в патогенезата и прогресията на диабета и хипертонията. Нарушаването на про/антиоксидантния баланс на кръвта уврежда макромолекули, води до модификация на DNA и протеини и липидна пероксидация. Това се потвърждава от намереното увеличено ниво на оксидативно увреждане на липиди и влошен антиоксидантен статус на периферната кръв при тези пациенти.

## ИЗВОДИ

### *Стареене*

1. Оксидативната активност на периферни фагоцити се ремоделира с възрастта:
  - Увеличава се скоростта на спонтанната оксидативна активност на клетките;
  - Намалява медираната от МРО продукция на оксиданти от клетките при адхезия върху повърхност;
  - Редуцирана е екстрацелуларната продукция на супероксид от периферни фагоцити, стимулирани по опсонин-зависим и независим механизъм. Непроменена е стимулираната интрацелуларна МРО-обусловена оксидативна активност, което може да е адаптивен отговор на организма към възрастово-обусловеното ново проокислително състояние.
  - Митохондриалната продукция на супероксид в стимулирани фагоцити първоначално нараства с възрастта и след 50-годишна възраст стационира.
2. Наблюдава се диференцирана промяна на компоненти от антиоксидантната система на защита с възрастта:
  - Увеличава се еритроцитната CuZn SOD активност;
  - Непроменени са нивата на GSH-Px и CTS активности на кръвта;
  - Намалява общото съдържание на SH-групите в периферната кръв. Не се установява връзка между SH-групите и изследваните оксидативни показатели. Затова тезата, че свързаните с възрастта промени в тиоловия редокс-статус са пряко следствие от увеличено радикалообразуване следва да бъде доказана;
  - Нивото на SH-групите и GSH-Px активност на кръвта са по-ниски при жени в сравнение с мъже на пострепродуктивна възраст, което предполага изместване на редокс-статуса на периферната кръв при възрастни жени в полза на прооксидантите.
3. Нараства нивото на оксидативно увреждане на кръвта, намиращо израз в увеличена концентрацията на TBAM.
4. При стари хора (>70 години), еритроцитната CuZn SOD и митохондриалната продукция на супероксид от стимулирани фагоцити достоверно намаляват. Съществува значима корелационна връзка между двата показателя.

### *Исхемичен инсулт в остър стадий*

5. Инициира се неспецифичен имунен отговор през острия стадий на исхемичен инсулт:
  - Увеличен е броят периферни фагоцити, който позитивно корелира с тежестта на неврологичния дефицит, размера на огнищната лезия и нивото на постинсултна инвалидност;
  - Увеличен е броят тромбоцити през целия остър стадий на инсулта, независимо от неговата тежест и наблюдаваното инвалидизиране на болните;
  - Завишените нива на hs-CRP в серума корелират с тежестта на неврологичния дефицит и маркери за степента на ендотелна дисфункция.
6. Реакцията на периферни фагоцити при остър исхемичен инсулт е хиперергична:
  - Екстрацелуларното образуване на радикали при опсонин-зависимата стимулация корелира с тежестта на неврологичния дефицит и нивото на инвалидност;
  - Фагоцитите по-мощно образуват вътреклетъчно-локализирани радикали при опсонин-зависим механизъм на стимулация. Тази хиперергична фагоцитна активност е неспецифична и стрес-индуцирана.
7. Глутатион пероксидазната и каталазната активност на кръвта са повишени при болните с исхемичен инсулт през целия остър стадий на болестта, независимо от клиничната тежест и изхода от инсулта.
8. Регистрира се пероксидемия в циркулацията на болните с исхемичен инсулт:
  - Концентрацията на плазмените ROOH и TBARM в кръвта се повишава достоверно след втората седмица от началото на инцидента;
  - Концентрацията на TBARM в кръвта на болните може да се разглежда като маркер за тежестта на неврологичния дефицит.
9. Възрастта, систолната артериална хипертония и повишеното серумно ниво на hs-CRP са независими прогностични показатели за когнитивен дефицит при изписване.

### *Хеморагичен инсулт в остър стадий*

10. През острия стадий на sICH скоростта на активиране на периферни

фагоцити за екстрацелуларно образуване на радикали при опсонин-независима стимулация е завишена при лицата с тежък неврологичен дефицит.

11. Нивото на TAS в серума е индикатор за лоша прогноза и смъртност след sICH и потвърждава ролята на ROS в патофизиологичните механизми на инсульта.
12. Серумното ниво на CRP и обемът на хематома са независими прогностични фактори за летален изход след sICH в краткосрочен аспект. Серумното ниво на ROOH е независим предиктор за неблагоприятен клиничен изход при преживелите инсульта лица.

#### *Инсулт в хроничен стадий*

13. Не се наблюдава стимулирана хиперергична реактивоспособност на периферните фагоцити.
14. Спонтанната хиперреактивност на фагоцитите, съчетана със завишена концентрация на продукти на липидната пероксидация в циркулацията могат да се разглеждат като маркери за хронично съдово увреждане, повишаващо риска от възникване на последващ съдов инцидент.
15. Нивото на hs-CRP в острата фаза на инсульта и възрастта са независими прогностични показатели за когнитивен упадък на първата година след инцидента. Жените е по-вероятно да покажат постинсултни когнитивни нарушения в сравнение с мъжете.
16. Болните, развиващи когнитивен упадък след инсулт, се характеризират с хронично нискостепенно възпалително състояние и самоподдържаща се ендотелна дисфункция.

#### *Артериална хипертония и диабет*

17. Установява се увеличено ниво на триглицериди при хипертензивни диабетици без съдов инцидент.
18. Болните имат завишен общ брой периферни левкоцити, тромбоцити и серумни нива на hs-CRP.
19. Увеличена е активността на еритроцитната CuZn SOD. Намалява глутатион-пероксидазната активност и общото ниво на SH-групи в кръвта.
20. Регистрира се оксидативно увреждане в серума на хипертензивните диабетици. Установената хиперлипидемия може да е една от причините за наблюдаваната пероксидемия при диабет и хипертония.

## П Р И Н О С И

- За първи път е показано, че стареенето не модулира целия fMLP и F<sub>c</sub>-рецептор медиран оксидативен отговор на периферни фагоцити, както се смяташе досега. Редуциран е само екстрацелуларният компонент на отговора, и по-специално, екстрацелуларната продукция на супероксид.
- Изградена е хипотеза на възрастово-обусловените промени в иницираните от fMLP сигнални пътища във фагоцитите, водещи до активиране на NADPH-оксидазата и продукцията на хемилуминесценция.
- Едновременно са изследвани възрастово-обусловените промени в статуса на компоненти от антиоксидантната система на защита с фагоцитната оксидативна активност и нивото на продукти на оксидативно увреждане в циркулацията. Намерените значими корелации сочат съществуването на деликатен баланс между прооксиданти и антиоксиданти, които са свързани по вътрешно-зависим начин.
- За първи път при болни с инсулт в остър и хроничен стадий е проведено комплексно динамично изследване на множество показатели от про/антиоксидантния статус на кръвта, което позволява да се предложат възпалителни и оксидативни маркери с клинична и прогностична значимост.
- Предложен е нов оригинален протокол за отчитане на реактивността на фагоцитите, позволяващ диференцирано изследване на оксидативния отговор на клетките в зависимост от типа стимулация и локализацията на радикалообразуването.
- Получени са данни, които могат да бъдат полезни при отчитане на рисковете за заболяемост и рецидивирание на мозъчно-съдовата болест, в частност:
  - ◆ наличието на значими връзки между опсонин-зависимата оксидативна активност на фагоцитите, нивото на продукти на липидна пероксидация в кръвта и тежестта и изхода от острия инсулт;
  - ◆ задълбочаването на нивото на оксидативно увреждане в кръвта през хроничния стадий на болестта.

- Принос към патофизиологичните промени при исхемичния инсулт е отчетената корелация между повишеното ниво на липидните хидропероксиди и завишения антиоксидантен потенциал на кръвта. Това е указание, че първично патогенетично звено при исхемичния инсулт е усилената радикалогенеза. Нарастването на антиоксидантния капацитет е вторичен адаптивен отговор, който не е в състояние пълноценно да компенсира радикалната свръхпродукция.
- За първи път се установява, че серумното ниво на ROOH е независим прогностичен фактор за неблагоприятен клиничен изход при преживелите sICH лица, което позволява оксидативен маркер да служи като допълнителен критерий за стратифициране на болните, при които се очаква тежко инвалидизиране и е належащо предприемането на допълнителни терапевтични подходи.
- Изградена е хипотеза за ролята на възпалителни и оксидативни механизми в комплексния патологичен отговор, иницииран от спонтанния интрацеребрален кръвоизлив.
- За първи път се установява, че hs-CRP и възрастта са независими прогностични показатели за когнитивен упадък на първата година след инцидента при отчитането на три различни нива на когнитивния статус.
- Предимство на настоящето изследване е, че нивата на биомаркерите за леталитет и клиничен изход се оценяват в циркулацията - те са достъпни за бързо определяне и могат да са полезни в клиниката за навременното вземане на най-правилното терапевтично решение.
- Изградена е хипотеза за приноса на оксидативния стрес към развитието на процеси, водещи до задълбочаване на съдовите увреждания на болните и възникване на повторен инсулт.
- Предложена е хипотеза за ролята на съдовите рискови фактори и остро невровъзпаление за влошаване на когнитивния статус на болни в хроничния стадий на мозъчен инсулт в контекста на протичащите свободно-радикални процеси.
- Принос към патофизиологичните промени при хипертония и диабет е едновременното изследване на редица възпалителни и оксидативни маркери в циркулацията. Нарушаването на про/антиоксидантния баланс на кръвта на хипертензивните диабетици модулира и уврежда макромолекули и инициира липидна пероксидация в кръвта.

## СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И СЪОБЩЕНИЯТА ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Alexandrova M**, Bochev P, Markova V, Bechev B, Popova M, Danovska M, Simeonova V. Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome, *JOURNAL OF CLINICAL NEUROSCIENCE*, 11(5): 501-506, 2004. (IF 0.834, индивидуален IF 0,119)
2. **Alexandrova M**, Bochev P. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*, 39(3): 297-316, 2005. (IF 4.971; индивидуален IF 2,486)
3. **Александрова М**, Дановска М, Бочев П. Редокс-баланс на кръвта на болни с остър хеморагичен инсулт. Сборник от научна конференция с международно участие. СУБ-Стара Загора, 4:397-403, 2005.
4. **Александрова М**, Бочев П, Маркова В, Дановска М, Стаменов Б. Антиоксидантен статус на кръвта на пациенти с остър хеморагичен инсулт. *TRAKIA JOURNAL OF SCIENCES*, 3(1): 49-52, 2005.
5. **Александрова М**. Двухазно екстрацелуларно образуване на активни кислородни форми от стимулирани периферни фагоцити. *ИЗВЕСТИЯ НА СЪЮЗА НА УЧЕНИТЕ* - Варна, Серия Медицина и екология, 2'2006-1'2007, 8-11.
6. **Alexandrova M**, Bochev P. Evaluation of the intracellular radical generation by stimulated leukocytes by total luminol chemiluminescence. *SCRIPTA SCIENTIFICA MEDICA*, 39(2): 111-114, 2007.
7. **Александрова М**. Роля на оксидативния стрес в процеса на стареене. В: Патолофизиологични и клинични промени при стареене, под редакцията на доц. д-р Денко Страшимиров, 2008: 43-74, ИЦ-МУ-Плевен.
8. **Александрова М**, Бочев П. Възрастово-обусловени промени в активността на периферни левкоцити за образуване на активни форми на кислорода. *TRAKIA JOURNAL OF SCIENCES, Series Biomedical Sciences*, 6(2): 126-129, 2008.
9. **Александрова М**, Дановска М, Бочев П, Стаменов Б. Серумните липидни хидропероксиди – потенциален маркер за степента на неврологичния дефицит при пациенти с остър спонтанен интрацеребрален кръвоизлив. Сборник от научна конференция с международно участие. СУБ-Стара Загора, CD носител, 2008.
10. **Alexandrova M**. What happens with ageing: decline or remodeling of opsonin-independent phagocyte oxidative activity? *LUMINESCENCE*, 24(5): 340 – 347, 2009. (IF 1.209; индивидуален IF 1,209)

11. **Alexandrova M**, Bochev P. Reduced extracellular phagocyte oxidative activity, antioxidant level changes and increased oxidative damage in healthy human blood as a function of age. *AGE*, 31(2): 99-107, 2009.  
(IF 5.839; индивидуален IF 2,920)
12. **Alexandrova M**, Bochev P. Age-related changes in the mitochondrial superoxide production by peripheral phagocytes in whole blood. *TRAKIA JOURNAL OF SCIENCES*, 8(2): 126-131, 2010.
13. **Alexandrova M**, Bochev P. The phagocyte mitochondrial superoxide production and erythrocyte CuZn superoxide dismutase activity decline in very old age. *JOURNAL OF BIOMEDICAL AND CLINICAL RESEARCH*, 3(1): 27-32, 2010.
14. **Alexandrova M**, Danovska M, Gencheva I, Garjarian S. Low serum total antioxidant status may reflect the severity of neurological impairment in patients after spontaneous intracerebral hemorrhage. *SCIENCE & TECHNOLOGIES*, 1(1):39-44, 2011.
15. Danovska M, **Alexandrova M**. Effect of hyperglycemia on clinical outcome of spontaneous intracerebral hemorrhage. *SCIENCE & TECHNOLOGIES*, 1(1):145-149, 2011.
16. **Александрова М**, Бочев П, Маркова В, Дановска М, Симеонова В. Периферни левкоцити и редокс-баланс на кръвта при болни с остър хеморагичен инсулт – предварителни резултати. Юбилейна научна конференция 30 години ВМИ – Плевен, 15-17.10.2004, Сборник резюмета, стр. 208.
17. Danovska M, **Alexandrova M**, Stamenov B. Plasma C-reactive protein and cognitive impairment in ischemic stroke patients. VI International Congress on Vascular Dementia. 19-22.11.2009, Barcelona, Spain.
18. **Alexandrova M**, Danovska M, Garjarian S. Significant determinants of cognitive decline in patients one year after ischemic stroke. International medical scientific conference for students and young doctors. 20-23 October 2010, Pleven, Bulgaria.
19. Danovska M, **Alexandrova M**, Gencheva I. Disturbed equilibrium between pro-oxidants and antioxidants in metabolic syndrome patients. *SCRIPTA SCIENTIFICA MEDICA*, 43 (6): 77, 2011.
20. Zein RH, **Alexandrova ML**, Alexandrova AS. Paradoxical actions of antioxidants. IX International medical scientific conference for students and young doctors. 12-15 October 2011, Pleven, Bulgaria.
21. Baydemir IH, Ercan IE, **Alexandrova ML**, Alexandrova AS. Are oxidants responsible for ageing? IX International medical scientific conference for students and young doctors. 12-15 October 2011, Pleven, Bulgaria.



**ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТИРАНИЯ НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С  
ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

**Alexandrova M, Bochev P. Reduced extracellular phagocyte oxidative activity, antioxidant level changes and increased oxidative damage in healthy human blood as a function of age AGE 2009; 31(2): 99-107.**

*In:*

1. Гусева ОЕ, Лебедько ОА, Козлов ВК. Возрастные особенности хемилюминесценции цельной крови у детей с хроническими воспалительными заболеваниями легких на фоне дефектов органогенеза респираторной системы. ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ 2009; 4: 74-77.
2. Mladinic M, Kopjar N, Milic M, Dasovic AB, Huzak M, Zeljezic D. Genomic instability in a healthy elderly population: a pilot study of possible cytogenetic markers related to ageing. MUTAGENESIS 2010; 25(5): 455-462 (IF 3,983).

**Alexandrova M. What happens with ageing: decline or remodeling of opsonin-independent phagocyte oxidative activity? LUMINESCENCE 2009; 24(5): 340-347.**

*In:*

3. Rajecky M, Lojek A, Ciz M. Differentiating between intra- and extracellular chemiluminescence in diluted whole-blood samples. INTERNATIONAL JOURNAL OF LABORATORY HEMATOLOGY 2011, in press (IF 1,368).

**Alexandrova M, Bochev P. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 2005; 39 (3): 297-316.**

*In:*

4. Berries and their role in human health. A survey of research into the health benefits of berries. De Boer Consulting. Victoria, BC CANADA 2005.
5. Bir LS, Demir S, Rota S, Koseoglu M. Increased serum malondialdehyde levels in chronic stage of ischemic stroke. TOHOKU JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 2006; 208: 33-39 (IF 1,012).
6. Leichert LI, Jakob U. Global methods to monitor the thiol – disulfide state of proteins in vivo. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING 2006; 8(5-6) (IF 4,491).
7. Tang T, Luo T, Zhang H. Oxidative stress in rat brains of collagenase-induced intracerebral hemorrhage. CHINESE JOURNAL OF REHABILITATION MEDICINE 2006; 21(1): 15-17.
8. Corrêa MC. Avaliação de indicadores do estresse oxidativo e da atividade da enzima acetilcolinesterase sanguínea em pacientes com diagnóstico de acidente vascular cerebral isquêmico. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de ciências naturais e exatas. Programa de pós-graduação em bioquímica toxicológica. Santa Maria, RS, BRASIL 2006.
9. Zhang Y, Feustel PJ, Kimelberg HK. Neuroprotection by pyrroloquinoline quinone (PQQ) in reversible middle cerebral artery occlusion in the adult rat. BRAIN RESEARCH 2006; 1094(1): 200-206 (IF 2,341).
10. Bibliography. Current world literature. Therapy and clinical trials. CURRUNT OPINION IN LIPIDOLOGY 2006; 17(6): 667-90 (IF 5,689).
11. Kovacic P, Somanathan R. Beneficial effects of antioxidants in relation to carcinogens, toxins, and various illnesses. In: Frontiers in Antioxidants Research CHAPTER 1, ISBN 1-60021-273-5 Editor: Harold V. Panglossi, pp. 1-38© 2006 Nova Science Publishers, Inc.

12. Cheng CJ. Novel rate-controlled nanoparticles of 17 $\beta$ -estradiol for cerebral ischemia therapy. Deserstation, Master degree, Kaohsiung Medical University, College of Pharmacy, CHINESE ELECTRONIC THESES& DISSERTATIONS SERVICE 2006.
13. Ambreena S, Aminova LR, Ratan RR. Hypoxia inducible factor prolyl 4-hydroxylase enzymes: center stage in the battle against hypoxia, metabolic compromise and oxidative stress. *NEUROCHEMICAL RESEARCH* 2007; 32: 931-946 (**IF 1,811**).
14. Vibo R, Kõrv J, Roose M, Kampus P, Muda P, Zilmer K, Zilme M. Acute phase proteins and oxidized low-density lipoprotein in association with ischemic stroke subtype, severity and outcome. *FREE RADICAL RESEARCH* 2007; 41: 282-287 (**IF 2,925**).
15. Colpo Elisângela. Evaluation of oxidative stress markers in vollunters supplemented with iron and ascorbic acid. DISSERTATION of Master's Degree, Post-Graduate Course in Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, RS, BRAZIL 2007.
16. Yildirim A, Kotan D, Yildirim S, Aygul R, Akcay F. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant response in serum and cerebrospinal fluid in acute ischemic stroke. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES* 2007; 37 (2): 75-81.
17. Vibo R. The third stroke registry in Tartu, Estonia from 2001 to 2003: incidence, case fatality, risk factors and long term outcome. DISSERTATIONES MEDICINAE UNIVERSITATIS TARTUENSIS 2007.
18. Gonzalez-Correa JA, Munoz-Marin J, Arrebola MM, Guerrero A, Narbona F, Lopez-Villodres JA, De La Cruz JP. Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *LIPIDS* 2007; 42 (10): 921-929 (**IF 1,419**).
19. Saeed AS, Shad KF, Saleem T, Javed F and Khan MU. Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke. *EXPERIMENTAL BRAIN RESEARCH* 2007; 182 (1): 1-10 (**IF 2,027**).
20. Wang CX, Shuaib A. Neuroprotective effects of free radical scavengers in stroke. *DRUGS & AGING* 2007; 24(7): 537-546 (**IF 2,140**).
21. De Souza MCG. Preparação De Complexos De Rutênio E Avaliação Das Propriedades Pró E Anti-Oxidantes Em Modelo Animal. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Orientador: Prof. Dr. Marcos Marques da Silva Paula, CRICIÚMA (SC) 2007.
22. Reiter RJ, Tan DX, Gultekin F. Melatonin reduces molecular damage and physiological dysfunction in experimental models of neurodegeneration. In: *Melatonin: Present and Future*. Eds. Montilla P, Tunes I. CHAPTER, pp. 261-297© Nova Science Publishers, Inc 2007.
23. Kim S, Vilela GVMA, Bouajila J, Dias A G, Cyrino FZGA, Bouskela E, Costa PRR, Nepveu F.  $\alpha$ -phenyl-n-tert-butyl nitron (pbn) derivatives: synthesis and protective action against microvascular damages induced by ischemia/reperfusion. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY* 2007; 15(10): 3572-3578 (**IF 2,662**).
24. Teilum M, Krogh M, Wieloch T, Mattiasson G. Hypothermia affects translocation of numerous cytoplasmic proteins following global cerebral ischemia. *JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH* 2007; 6(7): 2822-2832 (**IF 5,675**).
25. Gehrke F. Diplomarbeit in bioinformatik computational analysis of mass spectrometry based redox proteomics. Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik Aufgabensteller: Prof. Dr. Dmitriy Frishman, 2007.
26. Adibhatla RM, Dempsey R, Hatcher JF. Integration of cytokine biology and lipid metabolism in stroke. *FRONTIERS IN BIOSCIENCE*, Special Issue on Frontiers in Neurosurgery Research, 2008; 13: 1250-1270 (**IF 3,308**).
27. Correa MC, Maldonado P, da Rosa CS, Lunkes G, Lunkes DS, Mushta A, Kaizer RK, Morsch VM, Pereira ME, Schetinger MR. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in

- hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY* 2008;62(5):317-324 (**IF 2,198**).
28. Liao SR, Le XY, Feng XL. Syntheses, characterizations and SOD-like activities of ternary copper(II) complexes with 1,10-phenanthroline and L- $\alpha$ -amino acids. *JOURNAL OF COORDINATION CHEMISTRY* 2008; 61(6): 847-856 (**IF 0,732**).
  29. Biller J. Aspirin nonresponse in patients with arterial causes of ischemic stroke: Considerations in detection and management. *JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES* 2008; 272(1-2): 1-7 (**IF 2,359**).
  30. Olsson M, Wilson M, Isaksson C, Uller T, Mott B. Carotenoid intake does not mediate a relationship between reactive oxygen species and bright colouration: experimental test in a lizard. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY* 2008; 211:1257-1261 (**IF 2,981**).
  31. Dulce MB. Measurement of ectonucleotidase activity and oxidative stress indicators in acute myocardial infarction patients. MASTER DISSERTATION. Post-Graduate Program in Biological Sciences – Toxicological Biochemistry. Federal University of Santa Maria, RS, BRAZIL 2008.
  32. WORKSHOP - Oxidative stress and diseases. Okezie I Aruoma, MSc PhD DSc CSci CChem FRSC MBA. Professor and Chair, Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Touro College of Pharmacy, NEW YORK, USA, 7<sup>th</sup> International Conference of the Society for Free Radical Research-Africa, 14 – 17 July 2008, Mauritius.
  33. Barato G, Fernandes T, Pacheco M, Bastos V H, Machado S, Pimentel de Mello M, Silva J, Orsini M. Plasticidade cortical e técnicas de fisioterapia neurológica na ótica da neuroimagem. *REVIEW OF NEUROSCIENCE* 2008; 1: 2-3 (**IF 3,188**).
  34. Waleed M Adel Barakat. Regulation of Prostaglandin E2 release in cerebral ischemia. Dissertation submitted to the Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto Carola University of Heidelberg, GERMANY for the DEGREE OF DOCTOR OF NATURAL SCIENCES.
  35. García R, González ME, Fernández I, Castaño Y, Díaz ML, Alberti E. Behavioral and oxidative metabolism disorders in a model of transient induced cerebral hypoperfusion in rats. *BIOTECNOLOGÍA APLICADA* 2008; 25: 339-344.
  36. Pereira DV. Efeitos do antagonista do receptor de peptídeo liberador de gastrina (GRPR) RC-3095 em animal modelo de uveíte. Dissertação apresentada ao curso de Pósgraduação em Ciências da Saúde, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde. Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2008.
  37. Fagerlund A, Sunnerheim K, Dimberg L. Radical-scavenging and antioxidant activity of avenanthramides. *FOOD CHEMISTRY* 2009; 113(2): 550-556 (**IF 3,606**).
  38. Waqar M A Mahmood Y, Shaukat S, Sarwar F, Saleem A. The role of cholesterol in atherosclerosis: possibilities of herbal treatment options. *JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY OF PAKISTAN* 2009; 31(1): 186-191 (**IF 0,190**).
  39. Gong J, Huang K, Wang F, Yang L, Feng Y, Li H, Li X, Zeng S, Wu X, Stöckigt J, Zhao Y, Qu J. Preparation of two sets of 5,6,7-trioxygenated dihydroflavonol derivatives as free radical scavengers and neuronal cell protectors to oxidative damage. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY* 2009; 17(9): 3414-3425 (**IF 2,882**).
  40. Dias AG, Santos CEV, Cyrino FZGA, Bouskela E, Costa PRR. N-tert-Butyl and N-methyl nitrones derived from aromatic aldehydes inhibit macromolecular permeability increase induced by ischemia/reperfusion in hamsters. *BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY* 2009; 17(11): 3995-39981 (**IF 2,882**).
  41. Allahtavakoli M, Moloudi R, Arababadi MK, Shamsizadeh A, Javanmardi K. Delayed post ischemic treatment with Rosiglitazone attenuates infarct volume, neurological deficits and neutrophilia after embolic stroke in rat. *BRAIN RESEARCH* 2009; 1271: 121-127 (**IF 2,494**).
  42. Bouraoui Z, Banni M, Ghedira J, Clerandeanu C, Narbonne JF, Boussetta H. Evaluation of enzymatic biomarkers and lipoperoxidation level in Hediste diversicolor exposed to copper and

- benzo[a]pyrene. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY* 2009; 72 (7): 1893-1898 (**IF 2,590**).
43. Rogers CB. Heat stress and ischemia/reperfusion cause oxidative stress via NADPH oxidase in hypothalamic neurons. A DISSERTATION Submitted to the Graduate Faculty of Auburn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Doctor of Philosophy. Auburn, ALABAMA 2009.
  44. Huang KX, Feng YB, Yao W, Yang L, Wang F, Li HB, Zeng S, Gong JX, Hu MH, Zhao Y, Wu XM, Li XK, Qu J. Evaluation of lipid peroxidation inhibition and free radical scavenging abilities of 5,6,7-trimethoxy dihydroflavonols. *CHINESE CHEMICAL LETTERS* 2009; 20: 1187-1190 (**IF 0,643**).
  45. Zhang JJ, Zhang RF, Meng XK. Protective effect of pyrroloquinoline quinone against A $\beta$ -induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *NEUROSCIENCE LETTERS* 2009; 464(3): 165-169 (**IF 1,925**).
  46. Jian GX, Cheng RT, Qing PH, Ji YL, Xiang DW, Xiang DT. Dynamic changes in phenolic compounds and antioxidant activity in oats (*Avena nuda* L.) during steeping and germination. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* 2009; 57(21): 10392-10398 (**IF 2,469**).
  47. Banni M, Bouraoui Z, Clerandau C, Narbonne J F, Boussetta H. Mixture toxicity assessment of cadmium and benzo[a]pyrene in the sea worm *Hediste diversicolor*. *CHEMOSPHERE* 2009; 77(7): 902-906 (**IF 3,253**).
  48. Vician M. Radikály generované živými systémam. Bakalárska práca. Katedra fyziológie rastlín. SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE. FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH. ZDROJOV. Nitra 2009.
  49. Zheng R, Zheng H. Relationship between serum level of L- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  and homocysteine in the patients with acute cerebral infarct. *LABORATORY MEDICINE AND CLINIC* 2009; 6(17): 1443-1445.
  50. Leichert LI. Methods in Redox Signaling, Edited by Dipak Das CHAPTER 9: Quantitative Detection of the Cysteine Redox State in Vivo-the OxICAT Method. pp 63-70, Mary Ann Liebert, Inc. 2010.
  51. Vasiljevic B, Maglajlic-Djukic S, Stankovic S, Ignjatovic S, Lutovac D, Gojnic M. Neonatal hypoxic-ischemic brain injury. Rapid Responses to: Edwards A D, Brocklehurst P, Gunn A J, Halliday H, Juszczak E, Levene M, Strohm B, Thoresen M, Whitelaw A, Azzopardi D. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BRITISH MEDICAL JOURNAL* 2010; 340: c363.
  52. Kim JS, Hyun T K, Kim M J. Anti-oxidative activities of sorghum, foxtail millet and proso millet extracts. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 2010; 9(18): 2683-2690 (**IF 0,573**).
  53. Duarte Marta Maria Medeiros F. Polimorfismo da ALA16VAL MnSOD na hipercolesterolemia e sua associação com biomarcadores de inflamação e estresse oxidativo. Tese DE Doutorado. Santa Maria, RS, BRAZIL 2010.
  54. Alferova VV, Uzbekov MG, Misionzhnik EY, Luk'ianiuk EV, Gekht AB, Shklovskii V M. Endogenous intoxication and compensatory reactions in the restoration period of ischemic stroke. *ZHURNAL NEVROLOGII I PSIKHIATRII IMENI S S KORSAKOVA* 2010; 110(4) Sp. Iss. 2: 36-41 (**IF 0,120**).
  55. Алферова ВВ, Узбеков МГ, Миссионжник ЭЮ, Лукьянюк ЕВ, Гехт АБ, Шкловский ВМ. Патогенетическое значение активности MAO у больных с очаговой неврологической симптоматикой. *СОЦИАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ПСИХИАТРИЯ* 2010; 20(4): 46-49.
  56. Attig H, Dagnino A, Negri A, Jebali J, Boussetta H, Viarengo A, Dondero F, Banni M. Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethal nickel concentrations. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY* 2010; 73(7): 1712-1719 (**IF 2,340**).
  57. Leach JB, Powell EM. Understanding hypoxic environments: biomaterials approaches to neural stabilization and regeneration after ischemia. In *Biomaterials as Stem Cell Niche*. *TISSUE ENGINEERING AND BIOMATERIALS*, 2010; 2: 247-274.

58. Жерновков В Е. Тема диссертации: Действие тиреотропин-рилизинг гормона в широком диапазоне концентраций на структуру биологических мембран. Ученая степень: кандидат биологических наук. Москва, Код специальности ВАК: 03.00.02, Специальность: Биофизика Количество страниц: 176, 2007.
59. Chronic stroke neurological dysfunction. A new Stroke breakthrough. Institute for Neurological Research. Meeting, the Challenges of Scientific Discovery, <http://www.strokebreakthrough.com/what-we-treat/stroke/>.
60. Recovery after stroke. Innovative solutions for unmet medical need. Institute for Neurological Research Meeting, <http://www.nrmed.com/what-we-treat/stroke/>.
61. Li Y, Yang Z, Li T, Liu Z, Wang B. Synthesis, characterization, DNA binding properties and antioxidant activity of Ln (III) complexes with schiff base ligand derived from 3-Carbaldehyde chromone and aminophenazone. *JOURNAL OF FLUORESCENCE* 2010; 20(4): 891-905 (**IF 1,966**).
62. Kim SU, Liu Y, Nash KM, Zweier JL, Rockenbauer A, Villamena FA. Fast reactivity of a cyclic nitron-calix[4]pyrrole conjugate with superoxide radical anion: Theoretical and experimental studies. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY Article ASAP* 2010; 132(48): pp 17157-17173 (**IF 9,019**).
63. Bagatini MD. Evaluation of the enzyme activity that degrades adenine nucleotides and esters of choline and study of oxidative profile in patients with ischemic heart. Doctoral thesis. Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry. Federal University of Santa Maria, RS, BRAZIL 2010.
64. Yu SS, Zhao J, Lei SP, Lin XM, Wang LL, Zhao Y. 4-Hydroxybenzyl alcohol ameliorates cerebral injury in rats by antioxidant action. *NEUROCHEMICAL RESEARCH* 2011; 36(2): 339-346 (**IF 2.608-2010**).
65. Jung HW, Mahesh R, Bae HS, Kim YH, Kang JS, Park YK. The antioxidant effects of Joongpoongtang 05 on brain injury after transient focal cerebral ischemia in rats. *JOURNAL OF NATURAL MEDICINES* 2011; 65(2): 322-329 (**IF 1.469-2010**).
66. Liu XJ, Luo Z, Zheng JL, Xiong BX. Effects of waterborne acephate exposure on antioxidant responses and acetylcholinesterase activities in *Synechogobius hasta*. *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY*. Published online: 1 APR 2011 (**IF 1.83-2010**).
67. Facecchia K, Fochesato LA, Ray SD, Stohs SJ, Pandey S. Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies. *JOURNAL OF TOXICOLOGY* 2011 (**IF 1.637-2010**).
68. Cook N L. Characterisation of substance P and transient receptor potential melastatin channel messenger RNA and protein expression in acute and chronic neurological disorders. *THESIS (Ph.D.) - University of Adelaide, School of Medical Sciences, 2010*.
69. Furukawa A, Kawamoto Y, Chiba Y, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Kawamura N, Yoshikawa K, Hosokawa M, Oikawa S, Kato M, Shimada, A. Proteomic identification of hippocampal proteins vulnerable to oxidative stress in excitotoxin-induced acute neuronal injury. *NEUROBIOLOGY OF DISEASE* 2011; 43: 706-711 (**IF 5.121-2010**).
70. Firuzi O, Miri R, Tavakkoli M, Saso L. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY* 2011; 18(25):3871-3888 (**IF 4.630-2010**).
71. Yan M. The neuroprotective effect of Pyrroloquinoline quinone (PQQ) on Traumatic brain injury. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA*. 2011 Ahead of print (**IF 3.426-2010**).
72. Ma F, Gao Y, Qiao H, Hu X, Chang J. Antiplatelet activity of 3-butyl-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranone on rat platelet aggregation. *JOURNAL OF THROMBOSIS AND THROMBOLYSIS*. DOI: 10.1007/s11239-011-0647-9 (**IF 1.539-2010**).
73. Guo Q, Guo-Feng L. Protective Effect of Pyrroloquinoline Quinine on Oxygen and Glucose Deprivation Injury in Nuro2A Cells. *CHINESE JOURNAL OF REHABILITATION THEORY AND PRACTICE* 2011, 17(3).
74. Jonhera T. Fluorescence probes for cellular thiol and disulfide detection: sythesis and biophysical characterization. A DISSERTATION submitted to the Faculty of the Graduate School, Marquette University, in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. Milwaukee, Wisconsin, December 2011.
75. АЛФЕРОВА, ВЕРА ВАДИМОВНА. Динамика и прогностическое значение клинических,

нейроиммунохимических и биохимических показателей у больных ишемическим инсультом. 14.01.11 – «Нервные болезни». ДИССЕРТАЦИИ на соискание ученой степени доктора медицинских наук, Москва, 2012

**Alexandrova M, Bochev P, Markova V et al. Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome. JOURNAL OF CLINICAL NEUROSCIENCE 2004; 11(5): 501-506.**

*In:*

76. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES 2005; 827(1): 65-75 (IF 2,391).
77. Wang YM. Free radicals and glutathione peroxidase. PEOPLE'S LIBERATION ARMY OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY 2005; 21(No. 05).
78. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE 2005; 39(7): 841-852 (IF 4,971).
79. Margaill I, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE 2005; 39(4): 429-443 (IF 4,971).
80. Mileva M, Zlateva G. Comparing effect of low-intensity laser irradiation and vitamin E on the oxidative damages in experimental model of diquat-induced cataract in rabbits – a comparative study. TRAKIA JOURNAL OF SCIENCES 2005; 3(3): 6-9.
81. Liuhe J. Radicals and glutathione peroxidase. PHARMACEUTICAL JOURNAL OF CHINESE PEOPLE'S LIBERATION ARMY 2005; 21(5): 369-371.
82. Koh SH, Kim SH. Role of oxidative stress in neurodegenerative diseases and ischemic stroke, and prospects of antioxidant therapies as a new therapeutic strategy. HANYANG MEDICAL REVIEWS 2006; 26(1): 33-43.
83. Margeil I, Lerouet D, Plotkine M. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. INTERNATIONAL JOURNAL OF CEREBROVASCULAR DISEASES 2006; 14(6): 401-412.
84. McMahon AC, Duong TTH, Brieger D, Witting PK. Is there potential for antioxidants to enhance thrombolysis therapy in patients with ischemic stroke? FUTURE CARDIOLOGY 2006; 2(6): 659-665.
85. Trougakos IP, Gonos ES. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. FREE RADICAL RESEARCH 2006; 40(12): 1324-1334 (IF 2,536).
86. Corrêa MC. Dissertação de mestrado. Avaliação de indicadores do estresse oxidativo e da atividade da enzima acetilcolinesterase sanguínea em pacientes com diagnóstico de acidente vascular cerebral isquêmico. Universidade federal de santa maria. Centro de ciências naturais e exatas. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA. Santa Maria, BRASIL, 2006.
87. Ji L. Effect of protein-energy malnutrition on nuclear factor kappa B activation following global ischemia. A thesis submitted to the College of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in the College of Pharmacy and Nutrition, University of Saskatchewan, SASKATOON, 2006.
88. Beckhouse AG. The transcriptional and physiological alterations in brewer's yeast when shifted from anaerobic to aerobic growth conditions. A thesis for the degree of Doctor of Philosophy. SCHOOL OF BIOTECHNOLOGY AND BIMOLECULAR SCIENCES, UNIVERSITY OF NEW SOUTH WALES, AUSTRALIA, 2006.
89. Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress detection: what for? Part I. EUROPEAN REVIEW FOR MEDICAL AND PHARMACOLOGICAL SCIENCES 2006; 10: 291-317 (IF 0,922)

90. El-Khawas H, El-Hadidi E. Glutathione, as a marker of antioxidant status in acute onset stroke. *THE EGYPTIAN JOURNAL OF NEUROLOGY, PSYCHIATRY AND NEUROSURGERY* 2006; 43(1): 235-242.
91. Abboud H, Labreuche J, Meseguer E, Lavallee PC, Simon O, Olivot JM, Mazighi M, Dehoux M, Benessiano J, Steg P G, Amarenco P. Ischemia-modified albumin in acute stroke. *CEREBROVASCULAR DISEASES* 2007; 23: 216-220 (**IF 2,003**).
92. Yildirim A, Kotan D, Yildirim S, Aygul R, Akcay F. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant response in serum and cerebrospinal fluid in acute ischemic stroke. *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES* 2007; 37(2): 75-81.
93. Pire L, Deby-Dupont G, Lemineur T, Preiser JC. How to keep oxidative stress under control? *CURRENT NUTRITION & FOOD SCIENCE* 2007; 3: 222-235.
94. Hattori F, Oikawa S. Peroxiredoxins in the central nervous system. In *peroxiredoxin systems*. Book Series: *SUBCELLULAR BIOCHEMISTRY. STRUCTURES AND FUNCTIONS*. Flohé L, Harris J R, eds. Springer NETHERLANDS 2007; 44: 357-374.
95. Aleyasin H, Rousseaux M W C, Phillips M, Kim R H, Bland RJ, Callaghan S, Slack RS, During MJ, Mak TW, Park DS. The Parkinson's disease gene DJ-1 is also a key regulator of stroke-induced damage. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 2007; 20: 104(47): 18748-18753 (**IF 9,598**).
96. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *CLINICAL INTERVENTIONS IN AGING* 2007; 2(2): 219-236.
97. Türkanoglu A. Human serum arylesterase and Glutathione s-transferase activities in patients with ischemic stroke compared to healthy controls. A THESIS Submitted To The Graduate School Of Natural And Applied Sciences Of The Middle East Technical University. In partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in the Department of Biochemistry. November 2007.
98. Zheng W, Huang LZ, Zhao L, Wang B, Xu HB, Wang GY, Wang ZL, Zhou H. Superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in plasma and morphological evaluation of acute severe hemorrhagic shock in rats. *AMERICAN JOURNAL OF EMERGENCY MEDICINE* 2008; 26: 54-58 (**IF 1,188**).
99. Corrêa MC, Maldonado P, Saydelles da Rosa C, Lunkes G, Lunkes DS, Kaizer RR, Ahmed M, Morsch VM, Pereira ME, Schetinger MS. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY* 2008; 62(5): 317-324, (**IF 2.198**).
100. Yangmin X; Cao MM, Fang L, Hanguang T. Young age and old age SD big mouse liver, kidney organization mesophytization target change research. The Study of Variations of Biochemical Index in The Livers and Kidneys Tissues of Young and Aged SD Rats. *EXERIMENTAL ANIMAL SCIENCE* 2008; 4 issue.
101. Xiao-Dong L. Ischemic cerebrovascular disease research progress of anti-oxidants. *CHINESE MEDICINE CLINICAL PRACTICE* 2008; 2(4).
102. Chan C, Guo Z, Lian Q, Wang E. Hyperbaric oxygen and cerebral ischemia-reperfusion injury in the oxidative stress. *JOURNAL OF INTERNATIONAL NEUROLOGY AND NEUROSURGERY* 2008; 35(4).
103. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'Aquila G, Zuliani G, Iorio AD, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY* 2008; 15(12): 1236-1248 (**IF 4,823**).
104. Kravcukova P, Danielisova V, Nemethova M, Burda J, Gottlieb M. Transient forebrain ischemia impact on lymphocyte DNA damage, glutamic acid level, and SOD activity in blood. *CELLULAR & MOLECULAR NEUROBIOLOGY* 2009; 29(6-7): 887-894 (**IF 2,107**).

105. Palmieri B, Iannitti T, Sblendorio V. Oxidative stress: how to detect it, cope with and treat basing on evidence? *THE INTERNET JOURNAL OF AESTHETIC AND ANTIAGING MEDICINE* 2009; 2(1).
106. Maas MB, Furie KL. Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis. *BIOMARKERS IN MEDICINE* 2009; 3(4): 363-383 (**IF 0,861**).
107. Ning X, Miao W, Lin S, Bo GH, Miao Y. (Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040). The kidney rat model of aging antioxidant capacity. *ACTA CHINESE MEDICINE AND PHARMACOLOGY* 2009; 37(3): 34-37.
108. Trougakos IP, Gono ES. Chapter 9: Oxidative stress in malignant progression: The role of Clusterin, a sensitive cellular biosensor of free radicals. *ADVANCES IN CANCER RESEARCH* 2009; 104: 171-210 (**IF 4,456**).
109. Nuri TM. Oxidative stress before and after upper gastrointestinal system endoscopy process. *THESIS TC Harran Universitesi, Sanliurfa* 2009.
110. Türkanoglu A, Can Demirdöğen B, Demirkaya Ş, Bek S, Adali O. Association analysis of GSTT1, GSTM1 genotype polymorphisms and serum total GST activity with ischemic stroke risk. *NEUROLOGICAL SCIENCES* 2010; 31(6): 727-734 (**IF 1,220**).
111. Kravcukova P, Danielisova V, Nemethova M, Burda J, Gottlieb M. Effects of one-day reperfusion after transient forebrain ischemia on circulatory system in the rat. *GENERAL PHYSIOLOGY AND BIOPHYSICS* 2010; 29(2): 113-121 (**IF 1,146**).
112. Runge MS, Molnar K, Madamanchi NR. "Old" hearts and arteries: The role of oxidative stress. *TRANSACTIONS OF THE AMERICAN CLINICAL AND CLIMATOLOGICAL ASSOCIATION* 2010; 121: 52-60.
113. Zhiming R, Qing L, Liangyu H, Chaoxia YY, Ling W, Lu H. Shuxuetong ozagrel and the cost of the treatment of acute cerebral infarction – Comparison. *CHINESE JOURNAL OF MODERN DRUG APPLICATION* 2010; 4(2): 29-30.
114. Kahles T, Heumüller S, Brandes R P. NADPH oxidases and blood-brain barrier dysfunction in stroke. *CHAPTER In: Sauer H. et al. (eds.). Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Studies on Cardiovascular Disorders. Humana Press, Springer Science and Business Media* 2010: 211-230.
115. Hu J, Zhao T Z, Chu WH, Luo C X, Tang WH, Yi L, Feng H. Protective effects of 20-hydroxyecdysone on CoCl<sub>2</sub>-induced cell injury in PC12 cells. *JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY* 2010; 111(6): 1512-1521 (**IF 3.122**).
116. Chen Min. Oral Medicine, Second Team. Free radicals and glutathione peroxidase. *Posted range: public* 2009-06-16.
117. Niemiec P, Żak I, Emich-Widera E, Balcerzyk A, Kopyta I, Nowak T, Wendorff J, Pałatyńska K, Kaciński M, Pienczk-Ręclawowicz K, Pilarska E. Artykuł oryginalny Polimorfizm C242T genu kodującego cytochrom b-245 alfa nie jest związany z udarem niedokrwinnym mózgu u dzieci: analiza wewnątrzrodzinna i badanie kliniczno-kontrolne. *NEUROLOGIA I NEUROCHIRURGIA POLSKA* 2010; 44(5): 453-458 (**IF 0.451**).
118. Vignini A. *CHAPTER 9: Stroke and Oxidative Stress. pp 137-152. In: Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology. Series: Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Gadoth N, Göbel H H, eds, 1<sup>st</sup> Edition, 2011, 400 pages.*
119. Parzadeh M R. Prooxidant-antioxidant balance in stroke patients and 6-month prognosis. *CLINICAL LABORATORY* 2011; 57(3-4): 183 (**IF 0.821-2010**).
120. Torne M. Depósitos corporales de hierro y pronóstico de los pacientes con ictus isquémico agudo tratados con activador recombinante tisular del plasminógeno (r-tPA). *THESIS. Universitat Autònoma de Barcelona* 2010.
121. Vasiljevic B, Maglajlic-Djukic S, Gojnic M, Stankovic S, Ignjatovic S, Lutovac D. New insights in the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *PEDIATRICS INTERNATIONAL* 2011; 53(4): 454-462 (**IF 0.755-2010**).
122. Wang M, Ling L, ZANG F, Xie N. The Effect of Bushen Bolus on the Expression of Bcl-2, Bax Gene and the Ultrastructure in Hippocampi Slice of the Aging Rats. *CHINESE ARCHIVES OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE* 2011, 7:1664-1666.
123. Varga I, Ionescu I. Variation of total antioxidant status after ischemic stroke. *ROMANIAN JOURNAL OF NEUROLOGY* 2011; 10(4): 184-187.