

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI**

REZUMAT

**CONSIDERAȚII REFERITOARE LA
MODIFICĂRILE BIOCHIMICE ÎN BOALA
CARDIOVASCULARĂ**

Doctorand:

Elena Panait (căs. Torac)

Coordonator:

Prof. Dr. Valeriu Atanasiu

Introducere

Lucrarea de față și-a propus evaluarea parametrilor de stres oxidativ la pacienții recent diagnosticați cu boală coronariană univasculară. Se estimează că până în 2030 rata anuală a deceselor la nivel global, având drept cauză boală cardiovasculară, va fi de 23.6 milioane.

Dinamica endoteliului vascular este modificată în permanență, însă efectele dramatice asupra acesteia vor apărea în perioada de ischemie/reperfuzie. De a lungul timpului s-au stabilit teorii legate de evoluția bolii cardiovasculare, care are la bază un proces inflamator ce va declanșa formarea speciilor reactive de oxigen, producându-se un dezechilibru în homeostazia endoteliului vascular. Stresul oxidativ este reprezentat de o producție crescută de agenți oxidanți și de o apărare antioxidantă scăzută, fapt ce va avea drept consecință efecte distructive asupra componentelor celulare.

În această temă de cercetare s-a propus evaluarea calcipresinei umane în plasmă la acești pacienți, determinare care până în prezent nu a fost consemnată în nici o lucrare științifică publică. De asemenea, s-au stabilit corelații între fracția de ejeție și concentrația de nitriți/nitrați (generatori de NO, puternic vasodilatator), corelații inverse și semnificativ statistice, care asociază scăderea forței de pompare a miocardului cu concentrații ridicate de specii reactive atât de oxigen cât și de azot. Evaluarea nivelului de nitriți și nitrați poate face parte din tabloul paraclinic de stabilire și prevenție a riscului cardiovascular.

Cuprins

Introducere	1
Capitolul 1- Boala cardiovasculară	2
1.1. Patogeneza aterosclerozei	2
1.2. Factori de risc cardiovascular (FRCV)	5
1.2.1. FRCV clasici (tradiționali).....	5
1.3. Perturbări ale metabolismului lipidic, glucidic și proteic în boala cardiovasculară	9
1.3.1. Profilul lipidic	9
1.3.2. Profilul glucidic și boala cardiovasculară	13
1.3.3. Rolul calcipresinei și a proteinelor de fază acută în evoluția bolii cardiovasculare.....	15
Capitolul 2 - Stresul oxidativ și boala cardiovasculară	20
2.1. Radicalii liberi	20
2.2. Surse de radicali liberi în sistemele biologice	21
2.3. Protecția antioxidantă a enzimelor implicate în stresul oxidativ.....	25
2.4. Evidențe ale prezenței SRO în BCV	28
2.5. Eficiența administrării compușilor antioxidanți în BCV	33
Premise și obiective.....	37
Metodologia studiului clinic	39
Selectarea pacienților	39
Materiale și metode.....	40
Prelucrarea statistică a datelor.....	41
Capitolul 3- Modificări biochimice plasmatice la pacienții cu boală cardiovasculară (BCV)	42
3.1. Introducere	42
3.2. Profil lipidic și markeri ai peroxidării lipidice	44
3.2.1. Rezultate.....	47
3.2.2. Discuții	50
3.3. Calcipresina și proteine de fază acută	56
3.3.1. Rezultate.....	57
3.3.2. Discuții	61
3.4. Capacitatea antioxidantă totală și antioxidanți enzimatici	64

3.4.1. Rezultate.....	66
3.4.2. Discuții.....	72
3.5. Concluzii.....	75
Capitolul 4- Modificări biochimice eritrocitare la pacienții cu boală cardiovasculară (BCV)	77
4.1. Introducere	77
4.2. Enzime antioxidante eritrocitare	78
4.3. Cuantificarea unor produși rezultați din reacții redox	80
4.4. Rezultate.....	82
4.5. Discuții.....	92
4.6. Concluzii.....	95
4.7. Concluzii finale.....	96
Anexe.....	98
Bibliografie	104

Stadiul cunoașterii

Boala cardiovasculară este principala cauză a deceselor în țările dezvoltate și cele în curs de dezvoltare. Se estimează că până în 2030 rata anuală a deceselor la nivel global, având drept cauză boală cardiovasculară, va fi de 23.6 milioane. Conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) **boala cardiovasculară** este definită ca fiind un grup de afecțiuni ce cuprinde boli coronariere, cerebrovasculare, boli arteriale periferice, tromboză venoasă profundă, boală cardiacă reumatismală și embolism pulmonar. În ceea ce privește afecțiunile cerebrovasculare, acestea generează accidente vasculare cerebrale (AVC). Aproximativ 85% din AVC au drept cauză o circulație sangvină către creier deficitară. Cea mai importantă afecțiune arterială periferică este hipertensiunea, însă cauza cea mai des întâlnită a bolilor cardiovasculare o reprezintă ateroscleroza, în urma căreia se poate declanșa un infarct miocardic [1].

În ultimele decenii se dorește stabilirea unei relații între stresul oxidativ/inflamația vasculară și riscul evenimentelor cardiovasculare. De a lungul timpului s-au stabilit teorii legate de evoluția bolii cardiovasculare, care are la bază un proces inflamator ce va declanșa formarea speciilor reactive de oxigen (SRO), producându-se un dezechilibru în homeostazia endoteliului vascular. Stresul oxidativ este reprezentat de o producție crescută de agenți oxidanți și de o apărare antioxidantă scăzută, fapt ce va avea drept consecință efecte distructive asupra componentelor celulare [2].

Pe lângă factorii de risc cardiovascular clasici (hipertensiune, dislipidemie, diabet, fumatul) un rol major îl deține producția crescută de radicali liberi la nivelul peretelui vascular, o situație care va culmina în cele din urmă cu declanșarea stresului oxidativ [3].

Tabelul 1.2.1- Riscul total BCV în funcție de factorii principali cardiovasculari

[adaptat după Ghidurile Clinice Europene de Prevenție Cardiovasculară (GCEPC) varianta 2012-[4]]

Sex	Vârstă (ani)	Colesterolemie (mg/dL)	Presiune sistolică (mmHg)	Fumător	Risc BCV
F	60	310	120	Nu	2
F	60	270	140	Da	5
M	60	230	160	Nu	8
M	60	190	180	Da	21

Evidențe ale prezenței speciilor reactive de oxigen în BCV

Efectul agresiv al speciilor reactive de oxigen (SRO) se manifestă asupra lipidelor (peroxidare lipidică), în special asupra acizilor grași polinesaturați, datorită multiplelor duble legături, care sunt mai sensibile la oxidare. Procesul de peroxidare a lipidelor poate afecta fluiditatea membranei, permeabilitatea, potențialul de electroni și transportul metaboliților prin membranele funcționale. În urma peroxidării lipidice rezultă diverși markeri plasmatici inclusiv malondialdehida (MDA), hidroperoxizi lipidici, diene conjugate, oxisteroli [5]. Măsurarea directă a SRO este extrem de dificilă, deoarece sunt prezente în concentrații scăzute și au perioade de înjumătățire scurte. În general, acțiunea SRO este apreciată indirect, prin studierea efectelor substanțelor implicate în producerea sau eliminarea acestor specii [6].

Expunerea la radicalii liberi, în special la acțiunea SRO, dintr-o varietate de surse a stimulat organismele să dezvolte mecanisme de apărare utilizând agenți antioxidanți, precum enzimele catalază (CAT), superoxid dizmutaza (SOD), glutathion peroxidaza (GPx) [7].

Pentru evaluarea stresului oxidativ la pacienții cu infarct miocardic acut (IMA), Lorgis și colab. au propus utilizarea unui test intitulat FORT (free oxygen radicals test), care măsoară concentrația de SRO. Pacienții cu IMA, au prezentat nivele de peroxid de hidrogen (H_2O_2) crescute la perioade diferite de la producerea evenimentului [6].

Activități scăzute ale enzimelor eritrocitare, GPx, SOD și CAT, au fost înregistrate la pacienții cu un infarct miocardic recent (mai puțin de 24 de ore), nivelul plasmatic al GSH-ului fiind de asemenea scăzut. Peroxidarea lipidică a fost evidențiată prin cunatificarea MDA-ului plasmatic, ce a avut valori semnificativ mai mari la acești pacienți față de voluntarii clinic sănătoși [8].

Contribuție personală

Premise și obiective

Premise

- Până în prezent nu există suficiente publicații care să asocieze dinamica unei boli coronariene univasculare cu modificări ale statusului redox la subiecți din România.
- Sunt foarte puține informații cu privire la activitatea lactonazică a paraoxonazei la pacienții cu boală coronariană arterială.
- Nu există dovezi suficiente în legătură cu imobilizarea acizilor grași liberi din țesuturi către o leziune miocardică, aflată în reperfuzie.
- Nu s-au găsit date referitoare la cuantificarea calcipresinei în plasmă la subiecți cu boală cardiovasculară.
- Există puține informații care să coreleze concentrația feritinei, CRP-ului cu fracția de ejeție (FEVS) la pacienți cu boală coronariană univasculară și aproape date inexistente cu privire la corelația dintre activitatea enzimelor antioxidante, nivelul oxidului nitric și FEVS.
- Există puține date cu privire la corelațiile între enzimele antioxidante eritrocitare și FEVS la subiecții recent diagnosticați cu BCV

Obiectiv principal

Lucrarea de față și-a propus evaluarea statusului antioxidant plasmatic și cel eritrocitar, alături de cuantificarea proteinelor de fază acută la pacienții ce au fost diagnosticați recent cu boală ischemică coronariană, ce prezintă ocluzie sau stenoză miocardică (interventriculară anterioară) sau coronariană.

Obiective secundare

- Obiectivul principal s-a realizat în paralel cu determinarea nivelului plasmatic și cel eritrocitar al markerului MDA, pentru a analiza intensitatea peroxidării lipidice sub acțiunea speciilor reactive de oxigen (SRO)

- S-au evaluat activitățile enzimelor antioxidante plasmatice și cele eritrocitare, după care au fost corelate cu fracția de ejeție (FEVS)
- Au fost cunatificate proteine de fază acută (CRP, feritină), care au fost corelate cu FEVS

Noutate, utilitate

Studiul de față a observat modificările ce apar în echilibrul antioxidant și pro-oxidant la pacienții diagnosticați recent cu boală coronariană univasculară ischemică. S-a propus evaluarea calcipresinei umane în plasmă la acești pacienți, determinare care până în prezent nu a fost consemnată în nici o lucrare științifică publică. S-au stabilit corelații între fracția de ejeție și concentrația de nitriți/nitrați (generatori de NO, puternic vasodilatator), corelații inverse și semnificativ statistice. Evaluarea nivelului de nitriți și nitrați poate face parte din tabloul paraclinic de stabilire și prevenție a riscului cardiovascular.

Metodologia studiului clinic

Selectarea pacienților

Subiecții selectați pentru acest studiu observațional transversal au fost pacienți internați în Secția de Cardiologie II a Spitalului de Urgență Universitar București, România. Selectarea subiecților din cele două loturi (pacienți cu boală cardiovasculară și lotul de control) s-a efectuat în perioada mai 2014-februarie 2015.

Criteriile de includere ale pacienților au fost:

- modificare de segment ST în electrocardiogramă asociată cu creșterea enzimelor de leziune miocardică (CK-MB, CKI, LDH, GOT) sau cu troponină pozitivă (sau de cutt off); fracția de ejeție (FEVS) $\leq 60\%$; vârsta ≥ 40 ani.

Criteriile de excludere pentru pacienți au fost:

- un istoric de boală cardiovasculară mai veche de 6 luni, boli acute sau cronice cunoscute a afecta sistemul imunitar, endocrin și cel metabolic, tratament medicamentos pentru afecțiuni cardiovasculare, prezența agenților virali de tip HVC, HVB, HIV.

Subiecții înrolați în grupul control au fost selectați respectând următoarele criterii de includere:

- vârstă ≥ 40 ani, nefumători, cu indice masic corporal (IMC) normal, clinic sănătoși fără antecedente heredo-colaterale de boli cronice precum diabet zaharat sau afecțiuni cardiovasculare.

Criteriile de excludere ale subiecților din lotul control au fost:

- prezența agenților virali de tip HVC, HVB, HIV, hipertensiune arterială (HTA).

Studiul a inclus 33 de subiecți divizați în două loturi: lotul cu boală cardiovasculară format din 19 pacienți cu vârste cuprinse între 40-72 de ani și lotul control format din 14 subiecți sănătoși. Din cei 19 pacienți cu boală cardiovasculară (BCV) 10 s-au prezentat la internare cu infarct miocardic acut (IMA), 4 au fost diagnosticați cu angină pectorală, iar 5 au suferit angioplastie cu implantare de stent în artera interventriculară anterioară (IVA) a segmentului proximal. Toți pacienții au fost diagnosticați cu boală coronariană aterosclerotică coronariană univasculară.

La formarea lotului control au fost acceptați voluntari cu vârste cuprinse între 40-52 de ani, reprezentanții acestui grup fiind membri ai colectivului Disciplinei de Biochimie din cadrul Departamentului de Științe Funcționale I al Facultății de Medicină a Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila", București, România.

Studiul a fost aprobat de către Comisia locală de Etică a Spitalului Universitar de Urgență, București, România și coordonat conform obligațiilor etice ale Declarației de la Helsinki.

Tabelul 2.4.2- Parametrii demografici pentru cele două loturi

	Lot pacienți cu BCV n=19	Lot control n=14	Semnificație statistică*
Vârstă (ani)	56.00 $\pm$ 2.00	43.57 $\pm$ 1.20	p<0.001
BMI (kg/m ²)	26.71 $\pm$ 0.88	23.50 $\pm$ 1.05	p<0.05
Fumător (actual/fost/niciodată)	6/1/11	0/1/13	p<0.001
Fracție de ejeție (%)	53.42 $\pm$ 1.07	61.86 $\pm$ 1.01	p<0.0001

Valorile sunt prezentate ca Medie $\pm$ SEM (eroarea medie standard)

BMI = indice masic corporal

Materiale și metode

Pentru realizarea determinărilor biochimice în cadrul temei de cercetare a fost recoltat sânge venos (recoltat pe tuburi cu EDTA) de la fiecare subiect inclus în studiu. Recoltarea probei a fost efectuată de către un cadru specializat din Secția de Cardiologie II a Spitalului de Urgență Universitar București, România, a jeun, după un post de 12 ore. Sângele astfel prelevat a fost

centrifugat la 4000 *g* pentru 10 min, separat, marcat corespunzător și păstrat la -80° C până la efectuarea determinărilor.

Profilul lipidic, parametrii biochimici uzuali (glicemie, enzime de leziune miocardică, uree, creatinină, acid uric), hemoleucograma, EKG și ecografia bidimensională au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Biochimie și în Secția de Cardiologie II ale Spitalului de Urgență Universitar București, România. Determinările pentru evaluarea statutului antioxidant plasmatic și eritrocitar au fost realizate în cadrul Disciplinei de Biochimie din Departamentul de Științe Funcționale I al Facultății de Medicină a Universității de Medicină și Farmacie "Carol Davila", București, România și în Laboratorul IristLabmed, București, România.

Ecocardiograma a fost efectuată de către medicul cardiolog din cadrul Secției de Cardiologie II a Spitalului de Urgență Universitar București, România utilizând un scaner cu ultrasunete (Acuson Sequoia 512, Siemens, Mountain View, California). Imaginile standard ale ventriculului stâng au fost evaluate prin tehnici bidimensionale și M-mode. Grosimile peretelui ventriculului stâng, septului interventricular, precum și funcțiile sistolice, diastolice și fracția de ejeție (FEVS) au fost măsurate în conformitate cu Societatea Internațională de Ecocardiografie [9].

Modificări biochimice plasmatice la pacienții cu boală cardiovasculară (BCV)

Introducere

Boala cardiovasculară (BCV) însoțită de un infarct miocardic acut reprezintă una dintre cauzele majore ale mortalității în întreaga lume. Stresul oxidativ deține un rol important în patogeneza multor boli cardiovasculare, printre care și în cea a bolii cardiovasculare [10]. În general, leziunile severe endoteliale conduc adesea la creșterea producției de SRO [11].

Monitorizarea degradării membranei lipidice și a căilor de oxidare a acizilor grași este extrem de importantă în ischemie/reperfuzie [12]. SRO sunt capabile să reacționeze cu acizii grași polinesaturați generând malondialdehidă (MDA), compus considerat drept marker al peroxidării lipidice. De asemenea apărarea antioxidantă va fi alterată la pacienții cu boală cardiovasculară, fapt ce a fost demonstrat în studiile efectuate de către Patil și colab. (2007), care au arătat că nivele plasmatice crescute ale MDA-ului vor fi asociate cu nivele scăzute ale vitaminelor antioxidante C și E și ale enzimelor din apărarea antioxidantă (superoxid dizmutaza - SOD, catalaza - CAT, paraoxonaza- PON, glutatión peroxidaza - GPx) [13].

L-carnitina reprezintă un aminoacid ce deține un rol important în transportul acizilor grași cu lanț lung, din citoplasmă în mitocondrie [14]. L-carnitina are rol în scăderea nivelului de SRO (Buenoa et al. 2005) a trigliceridelor plasmatice (Orlandi et al. 2002), în creșterea biodisponibilității oxidului nitric (NO) atât la iepuri transgenici cât și în culturi de celule

Evaluarea profilului lipidic, proteinelor de fază acută și capacității antioxidante totale plasmatice

În ceea ce privește colesterolemia pacienților din studiul nostru, aceasta a prezentat o valoare semnificativ crescută comparativ cu lotul martor, determinările fiind realizate în primele ore de la internarea acestor pacienți în Secția de Cardiologie, SUUB, București. Conform altor cercetări [17][18] nivelul colesterolului total este crescut în prima zi postischemie la pacienții care au suferit un IMA, fapt evidențiat și de către studiul nostru.

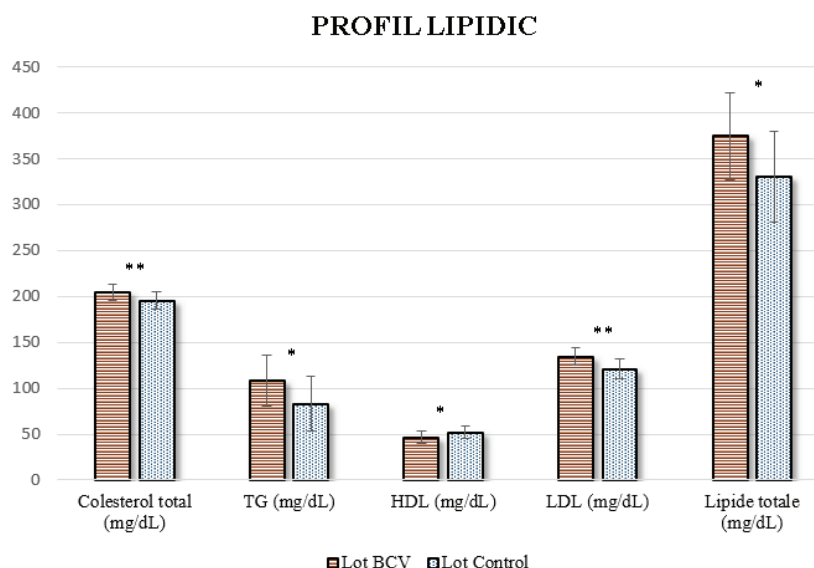


Figura 3.2.1- Profilul lipidic pentru cele două loturi.

În cazul nostru nivelul LDL-ului evaluat până în 12 ore de la producerea evenimentului cardiovascular a prezentat valori mult crescute comparativ cu lotul control. Însă nivelul LDL-ului, poate fi redus prin administrarea de statine, care au rolul de a inhiba HMG-CoA reductaza, enzimă cheie din sinteza colesterolului endogen [19]. Pacienții din lotul nostru cu BCV, au primit statine la internarea lor în spital, însă determinările ce au vizat profilul lipidic au fost efectuate înainte de inițierea tratamentului, astfel încât medicația nu a influențat valorile colesterolului total, LDL-ului, HDL-ului sau a trigliceridelor. Determinările malondialdehidei (MDA), acizilor grași liberi și a carnitinei au fost realizate pe probele acestor pacienți recoltate la 2-3 zile de la prezentarea la spital, însă studiile susțin că efectul statinelor este evident la 4 săptămâni de la inițierea tratamentului [19].

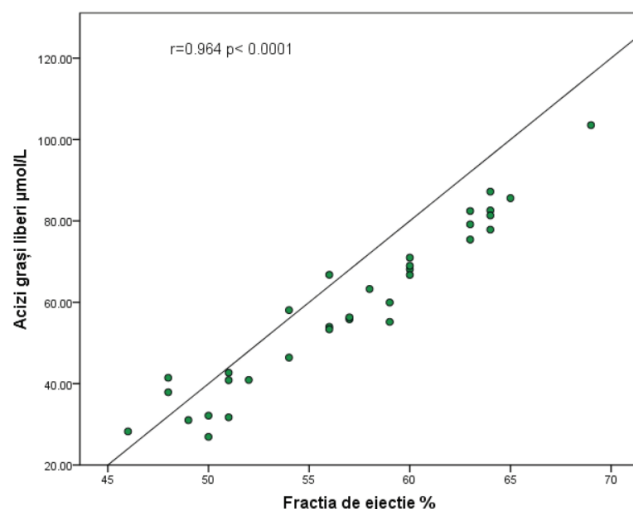
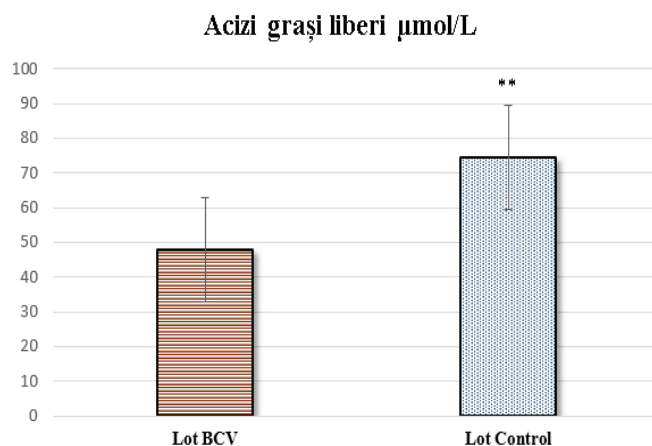


Figura 3.2.2- Concentrația de acizi grași liberi ($\mu\text{mol/L}$) pentru cele două loturi.

Corelație între nivelul plasmatic al AGL și fracția de ejeție.

În cazul subiecților cu BCV din studiul nostru am identificat o puternică corelație directă între nivelul AGL și FEVS, fapt ce a fost demonstrat și de către Wolf [20]. Scăderea FEVS la indivizii cu IMA și legătura directă cu nivelul plasmatic scăzut al AGL ar putea fi explicat pe baza ipotezei susținută de către Oie și colab. [21], care afirmă că dezechilibrul metabolismului acizilor grași influențează extrem de mult consumul de oxigen, iar concentrațiile plasmatice ridicate ale AGL vor fi în detrimentul miocardului ce va fi afectat mai devreme sau mai târziu de ischemie și astfel pacienții vor prezenta o valoare FEVS mult mai mică față de indivizii sănătoși [21].

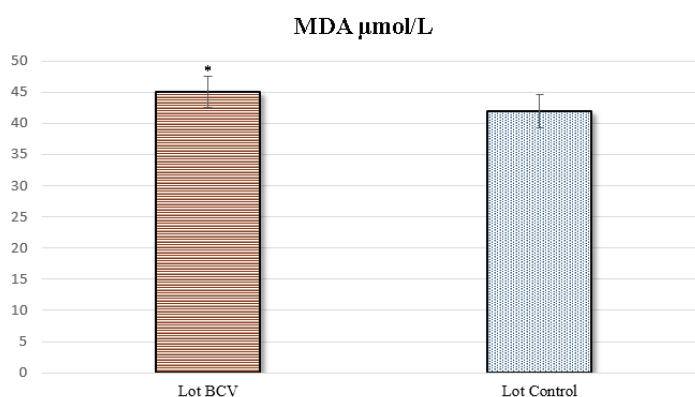


Figura 3.2.5- Nivelul de malondialdehidă pentru cele două loturi

La pacienții cuprinși în cercetarea noastră, nivelul de MDA a fost găsit semnificativ crescut comparativ cu lotul control, valori ce sunt conforme cu alt studiu recent efectuat de către Inoue și colaboratori [22]. Ischemia miocardică conduce de cele mai multe ori la declanșarea unui infarct

miocardic acut, asociat de cele mai multe ori cu o peroxidare lipidică intensă care este datorată în principiu unui dezechilibru între statusul antioxidant și cel prooxidant din cadrul celulelor [23]

Malondialdehida poate fi considerată drept un predictor pozitiv pentru un posibil viitor accident cardiovascular la subiecții care sunt diabetici, sau care au un istoric de boală cardiovasculară în familie [24].

În ceea ce privește nivelele plasmatice ale proteinelor s-au înregistrat valori semnificativ crescute la pacienții cu boală cardiovasculară pentru concentrația feritinei ($p < 0.001$) (**Figura 3.3.2**).

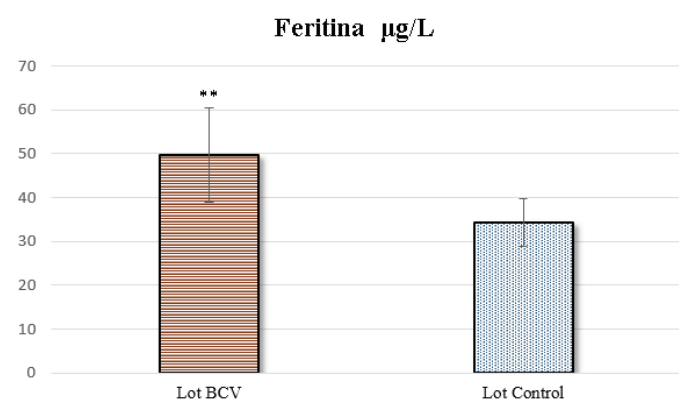


Figura 3.3.2 - Concentrația feritinei pentru cele două loturi.

Feritina plasmatică a fost pozitiv corelată cu nivelul plasmatic al LDL-ului, acest rezultat putând indica posibilitatea implicării feritinei în procesul inflamatoriu postischemic, prin capacitatea de a induce indirect oxidarea LDL-ului, care deține un rol esențial în evoluția aterosclerozei, iar acest lucru poate conduce la creșterea concentrației de CRP la pacienții cu IMA [25]

În ceea ce privește capacitatea antioxidantă susținută de enzime s-a observat că activitatea lactonazică a PON1 (DHC) a fost semnificativ crescută la pacienții cu BCV incluși în studiul nostru, acest aspect reprezentând un element de noutate și poate fi pusă pe seama faptului că această activitate se află în strânsă legătură cu nivelele lipidelor plasmatice, pe care le poate influența în diferite situații precum o boală coronariană arterială [26]. Deși am observat o activitate arilesterazică mică a PON1 (PheAc) la acești pacienți, este necesar să menționăm că activitatea lactonazică reprezintă cea mai specifică activitate a acestei enzime, fiind și cea care este influențată de calitatea colesterolului HDL și direct implicată în procesul antiaterosclerotic [27].

Tabelul 3.4.1- Activitățile enzimelor antioxidante plasmatice și nivelele de albumină, proteine plasmatice și acid uric pentru cele două loturi incluse în studiu

	Lot pacienți cu BCV n=19	Lot control n=14	Semnificație statistică*
Acid uric (mg/dL)	6.67 ± 0.34	5.72 ± 0.39	n.s.
Albumină (g/dL)	5.76 ± 0.068	6.18 ± 0.039	p<0.001
Proteine totale (g/dL)	8.79 ± 0.0098	9.69 ± 0.034	p<0.001
TEAC (mmol Trolox/L)	0.88 ± 0.009	0.93 ± 0.012	p<0.005
GAP (mmol/L)	0.475 ± 0.029	0.578 ± 0.034	p<0.05
PON PheAc (U/L)	269.42 ± 11.30	344.79 ± 7.25	p<0.001
PON DHC (U/L)	100.00 ± 8.096	94.58 ± 5.43	p<0.001

Datele sunt prezentate ca medie ± SEM, diferențe semnificative sunt considerate valorile p<0.05.

Scăderea capacității antioxidante totale (TEAC) și a celei reziduale (GAP) la pacienții incluși în cercetarea noastră se poate datora unei concentrații crescute a speciilor reactive de oxigen (SRO), ce sunt neutralizate de componente antioxidante plasmatice (paraoxonaza, albumina, acidul uric). Dovada că există concentrații crescute de SRO în plasma pacienților cu BCV din studiul nostru a fost realizată prin cuantificarea nivelului malondialdehidei, considerată ca fiind markerul ce reprezintă fidel intensitatea peroxidării lipidelor plasmatice, precum a LDL-ului.

Modificări biochimice eritrocitare la pacienții cu boală cardiovasculară (BCV)

Introducere

Scăderea activității antioxidante a enzimelor eritrocitare, cum ar fi CAT și SOD, poate fi asociată cu stresul oxidativ identificat în BCV. Radicalii liberi pot reacționa cu aceste proteine, schimbând astfel activitatea lor; de exemplu, H₂O₂, va inhiba SOD prin feedback negativ după ce a fost produs de aceasta. Prin urmare, SOD necesită o cooperare cu alte enzime care îndepărtează H₂O₂, cum ar fi CAT și GPx [28].

Tot mai multe dovezi sugerează că arginază joacă un rol important în reglarea funcției celulelor vasculare într-o varietate de boli cardiovasculare [29]. Cercetările susțin că activitatea crescută a arginazei va avea drept consecință scăderea nivelului oxidului nitric (NO) asociată de cele mai multe ori cu disfuncție endotelială vasculară [30]. Însă există tot mai multe studii care demonstrează importanța NO în patogeneza BCV, inclusiv reglarea tensiunii arteriale, inhibarea agregării trombocitare, adeziune leucocitară, proliferarea celulelor musculare netede și oxidarea

LDL, astfel că nivele crescute ale nitriților/nitraților pot fi asociate cu tulburări ale homeostaziei endoteliului vascular [31].

Evularea activității antioxidante eritrocitare

Pentru cuantificarea tuturor parametrilor eritrocitari concentrațiile, respectiv activitățile enzimatice au fost raportate la g hemoglobină.

Comparând statusul antioxidant eritrocitar la pacienții cu boală cardiovasculară cu cel al subiecților din lotul control apar modificări semnificativ statistice pentru activitatea catalazei ($p < 0.001$), glutation peroxidazei ($p < 0.005$) și capacității antioxidante totale eritrocitare ($p < 0.001$) conform *Tabelului 4.4.1*.

Tabelul 4.4.1- Activitățile enzimelor antioxidante eritrocitare și capacitatea antioxidantă totală eritrocitară

	Lot pacienți cu BCV n=19	Lot control n=14	Semnificație statistică*
Hb (g/dL)	13.022 ± 0.064	12.95 ± 0.064	n.s.
GPx (UI/g Hb)	28.60 ± 0.75	26.11 ± 0.04	$p < 0.005$
CAT (UI/g Hb)	210.76 ± 2.79	212.35 ± 2.36	n.s.
Arginaza (UI/g Hb)	1.17 ± 0.041	1.47 ± 0.031	$p < 0.001$
SOD (UI/g Hb)	755.37 ± 3.39	763.64 ± 14.13	n.s.
TEAC (μM/g Hb)	111.42 ± 0.31	113.43 ± 0.17	$p < 0.001$

Datele sunt prezentate ca medie ± SEM, diferențe semnificative sunt considerate valorile $p < 0.05$.

În ceea ce privește apărarea antioxidantă eritrocitară oferită de alte enzime precum SOD și CAT pacienții din studiul nostru au prezentat valori scăzute ale activităților acestor proteine, însă ne semnificative din punct de vedere statistic. La acești pacienți s-a observat o capacitate antioxidantă totală eritrocitară (TEAC) semnificativ redusă, aspect ce ar putea explica nivelul tiolilor scăzut, precum și al enzimelor eritrocitare SOD și CAT, așa cum s-au evidențiat la subiecți cu insuficiență miocardică non-ischemică și cei cu siclemie [32][33].

De remarcat este faptul că activitatea arginazei a fost semnificativ scăzută la pacienții cu BCV, reprezentând un paradox al acestei enzime ale cărei concentrații eritrocitare crescute au fost asociate cu progresia aterosclerozei, însoțită de inflamație [29]. Scăderea acestei activități la pacienții cuprinși în studiul nostru reprezintă un element de noutate care poate fi explicat pe seama faptului că acest proces poate reprezenta un răspuns adaptativ al eritrocitelor împotriva disfuncției endoteliale [34]. De altfel datorită acestei disfuncții endoteliale din cadrul bolilor vasculare se poate justifica prezența corelației directe semnificative ce s-a stabilit între arginază și FEVS.;

funcția miocardică fiind alterată va influența forța de pompare a inimii care va scădea, în ciuda faptului că se încearcă păstrarea integrității endoteliului vascular de către arginază.

Tabelul 4.4.2- Valorile concentrațiilor eritrocitare ale malondialdehidei, tiolilor și nitriților/nitraților

	Lot pacienți cu BCV n=19	Lot control n=14	Semnificație statistică*
MDA (mM/g Hb)	0.88 ± 0.006	0.90 ± 0.006	n.s.
Tioli neproteici (nM/g Hb)	28.03 ± 0.31	29.93 ± 0.4	p< 0.001
Tioli totali (μM/g Hb)	2.97 ± 0.97	3.97 ± 0.92	p< 0.001
NO ₂ (μM/g Hb)	8.08 ± 0.15	7.57 ± 0.10	p< 0.05
NO ₃ (μM/g Hb)	9.87 ± 0.37	8.37 ± 0.45	p< 0.05
NO ₂ +NO ₃ (μM/g Hb)	19.68 ± 0.75	15.83 ± 0.39	p< 0.001

Datele sunt prezentate ca medie ± SEM, diferențe semnificative sunt considerate valorile p<0.05.

La pacienții cu boală cardiovasculară s-au înregistrat valori semnificativ scăzute ale tiolilor atât neproteici (28.03 ± 0.31 nM/g Hb) cât și a celor totali (2.97 ± 0.97 μM/g Hb) comparativ cu subiecții din lotul control (29.93 ± 0.4 nM/g Hb, respectiv 3.97 ± 0.92 μM/g Hb) (p< 0.001). Pacienții au prezentat valori semnificativ crescute ale nitriților (NO₂) (8.08 ± 0.15 μM/g Hb), precum și ale nitraților (NO₃) (9.87 ± 0.37 μM/g Hb) față de lotul de control (p< 0.05).

Concentrațiile eritrocitare scăzute ale tiolilor neproteici, dar și a celor totali au fost asociate cu efectul intensiv al stresului oxidativ asupra moleculelor proteice în timpul reperfuziei la subiecții cu boală coronariană acută. Stresul oxidativ poate modifica fosfolipidele și proteinele membranei eritrocitare, efectul acestora fiind tradus prin modificări ale permeabilității membranei eritrocitare. Deoarece este bine cunoscut faptul că glutathionul redus deține activitate antioxidantă, nivelele eritrocitare reduse ale tiolilor la pacienții cu boală cardiovasculară pot fi asociate cu perioadele de ischemie/reperfuzie, aspect evidențiat și de către studiul nostru [35].

Așadar am efectuat corelații între nivelele tiolilor neproteici și GPx, precum și între tiolii totali eritrocitari și GPx, observând că nivelele de tioli liberi sunt corelate pozitiv cu activitatea GPx, explicând faptul că la apărarea antioxidantă participă mai mult tiolii neproteici, fiind mai ușor de mobilizat datorită moleculelor mai mici [36]. Pe lângă aceasta s-a observat o corelație inversă semnificativă între activitatea GPx și tiolii totali ce cuprind atât tiolii liberi cât și cei proteici, sugerând faptul că există posibilitatea ca proteinele ce conțin numeroase resturi de cisteină să fie ținta atacului oxidativ al SRO [37]

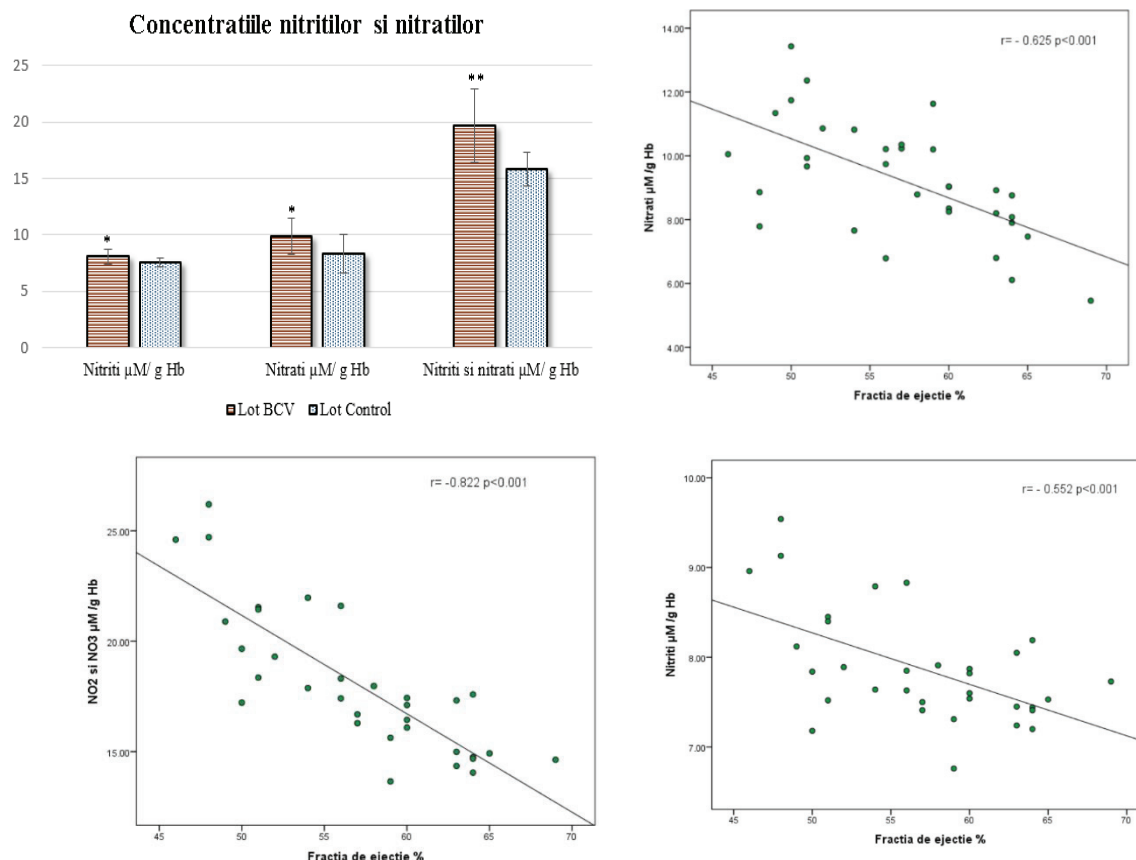


Figura 4.4.10- Concentrațiile nitriților și nitraților eritrocitare, precum și corelațiile acestora cu fracția de ejeție

Nivelele nitriților și nitraților la pacienții incluși în cercetarea noastră au fost semnificativ crescute comparativ cu subiecții sănătoși, în ciuda activității reduse a arginazei, implicată în producerea de NO. Acest efect poate fi explicat prin faptul că inhibarea arginazei postischemic va duce la stimularea oxid nitric sintetazei (NOS), cele două enzime având drept substrat comun L-arginina. Odată activată NOS, dacă nu dispune de tetrahydrobiopterină (BH₄), va produce NO în exces care va fi orientat spre sinteză de nitriți și nitrați, implicați în accelerarea peroxidării lipidice membranelor eritrocitare [38][39].

Din cauza perturbării homeostaziei eritrocitului, se va perturba și echilibrul endoteliului vascular care automat va duce la disfuncția acestuia, alterând și fracția de ejeție a miocardului, aspect relevat și de către studiul nostru. Astfel s-a observat că nivelele nitriților și ale nitraților s-au corelat negativ cu fracția de ejeție, sugerând că reducerea capacității miocardului poate fi și datorită nivelului de specii reactive de azot ce contribuie la alterarea funcției endoteliale [39].

Concluzii finale

- ❖ În cadrul studiului nostru pacienții cu boală cardiovasculară au prezentat concentrații plasmatice reduse ale acizilor grași liberi, aceste molecule fiind mobilizate către refacerea membranelor cardiomiocitelor aflate în reperfuzie. De asemenea reducerea nivelului acizilor grași circulanți poate fi asociată cu un declin al funcției cardiace sistolice, ce influențează extrem de mult consumul de oxigen și astfel pacienții vor prezenta o valoare a FEVS mult mai mică față de indivizii sănătoși.
- ❖ Pacienții cu BCV au prezentat o deficiență de carnitină, cu rol antioxidant și de transport al acizilor grași, fapt evidențiat de nivelele plasmatice reduse ale moleculelor de carnitină (Carnitina liberă, Carnitina totală și AcilCarnitină).
- ❖ Nivelul feritinemiei crescut la pacienții cu BVC s-a corelat semnificativ negativ cu FEVS, aspect ce sugerează faptul că inflamația endoteliului vascular (monitorizată prin intermediul acestui parametru) poate fi asociată cu reducerea funcției de pompă a miocardului (FEVS)
- ❖ Scăderea activității arilesterazice a PON1 la pacienții cu BCV din cercetarea noastră se poate datora accentuării catabolismului acestei proteine, care a suferit modificări în urma ischemiei produse la nivelul miocardului,
- ❖ Activitatea lactonazică a PON1 este crescută comparativ cu cea arilesterazică, fiind mult mai specifică; această activitate oferă o mai bună acuratețe cu privire la protecția sa asupra moleculei de HDL și ale efectelor antioxidante pe care le manifestă.
- ❖ Pacienții au prezentat capacitate antioxidantă totală (TEAC) plasmatică și eritrocitară scăzută și nivel crescut plasmatic al malondialhidei (MDA), explicate pe baza faptului că există o apărare antioxidantă intensă asigurată de componente plasmatice, aspect ce va duce la destabilizarea protecției împotriva speciilor reactive de oxigen.
- ❖ Pacienții cu boală cardiovasculară incluși în cercetarea noastră pe lângă nivele eritrocitare ale tiolilor (-SH) semnificativ reduse au prezentat și o corelație pozitivă cu fracția de ejeție ($p < 0.001$), sugerând că odată cu scăderea apărării antioxidante oferită de tioli scade și capacitatea de pompă a miocardului (FEVS).
- ❖ Nivelele eritrocitare tiolice reduse corelate invers cu activitatea GPx (glutathion peroxidazei) poate sugera că există un răspuns antioxidant enzimatic eritrocitar accentuat oferit de către GPx la efectele generate de perturbarea metabolismului moleculelor tiolice.

- ❖ Activitatea arginazei a fost semnificativ scăzută la pacienții cu BCV ($p < 0.05$) și acest mecanism poate fi explicat pe seama faptului că poate reprezenta un răspuns adaptativ al eritrocitelor în condiții de ischemie.
- ❖ Nivelele nitriților și nitraților la pacienții incluși în cercetarea noastră au fost semnificativ crescute comparativ cu subiecții sănătoși, în ciuda activității reduse a arginazei, efect explicat prin faptul că inhibarea arginazei postischemie poate conduce la stimularea oxid nitric sintetazei (NOS) decuplată, ce va produce NO în exces; NO va fi direcționat către sinteză de nitriți și nitrați, implicați în accelerarea peroxidării lipidice membranelor eritrocitare.

Bibliografie selectivă

- [1] B. Sjögren, C. Bigert, and P. Gustavsson, *Handbook on the Toxicology of Metals-Chapter 16 Cardiovascular Disease*, Fourth Edi., no. 1993. Elsevier, 2015.
- [2] K. Hawa, Yusof, “The Role of Oxidative Stress, Antioxidants and Vascular Inflammation in Cardiovascular Disease (A Review).,” *Vascul. Pharmacol.*, vol. 71, pp. 40–56, 2015.
- [3] H. Li and S. Horke, “Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis,” *Atherosclerosis*, vol. 237, pp. 208–219, 2014.
- [4] J. Perk, G. De Backer, H. Gohlke, I. Graham, Ž. Reiner, M. Verschuren, C. Albus, P. Benlian, G. Boysen, R. Cifkova, C. Deaton, S. Ebrahim, M. Fisher, G. Germano, R. Hobbs, A. Hoes, S. Karadeniz, A. Mezzani, E. Prescott, L. Ryden, M. Scherer, M. Syväanne, W. J. M. Scholte Op Reimer, C. Vrints, D. Wood, J. L. Zamorano, F. Zannad, M. T. Cooney, J. Bax, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, B. A. Popescu, U. Sechtem, P. A. Sirnes, M. Tendera, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, V. Aboyans, E. A. Ezquerra, C. Baigent, C. Brotons, G. Burell, A. Ceriello, J. De Sutter, J. Deckers, S. Del Prato, H. C. Diener, D. Fitzsimons, Z. Fras, R. Hambrecht, P. Jankowski, U. Keil, M. Kirby, M. L. Larsen, G. Mancina, A. J. Manolis, J. McMurray, A. Pajak, A. Parkhomenko, L. Rallidis, F. Rigo, E. Rocha, L. M. Ruilope, E. Van Der Velde, D. Vanuzzo, M. Viigimaa, M. Volpe, O. Wiklund, and C. Wolpert, “European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012),” *European Heart Journal*. 2012.
- [5] N. Strobel, R. Fassett, S. Marsh, and J. Coombes, “Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease,” *Int. J. Cardiol.*, vol. 147, pp. 191–201, 2011.
- [6] L. Lorgis, M. Zeller, G. Dentan, P. Sicard, C. Richard, P. Buffet, I. L’Huillier, J. C. Beer, Y. Cottin, L. Rochette, and C. Vergely, “The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction,” *Atherosclerosis*, vol. 213, pp. 616–621, 2010.
- [7] “Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets?”
- [8] M. Cemek, A. Hazini, İ. Işıldak, S. Alpdağtaş, A. Önül, Ü. Şenel, T. Kocaman, A. Dur, M. Iraz, and H. Uyarel, “Investigation of ischemia modified albumin, oxidant and antioxidant markers in acute myocardial infarction,” *Adv. Interv. Cardiol. Postep Kardiol Inter*, vol. 11, no. 442, pp. 298–303, 2015.
- [9] H. Tuunanen, E. Engblom, A. Naum, B. Hesse, J. Airaksinen, and P. Nuutila, “Free Fatty Acid Depletion Acutely Decreases Cardiac Work and Efficiency in Cardiomyopathic Heart Failure,” *Circulation*, vol. 114, pp. 2130–2137, 2006.
- [10] S. Lakkur, S. Judd, R. M. Bostick, W. McClellan, W. D. Flanders, V. L. Stevens, and M. Goodman, “Oxidative stress, inflammation, and markers of cardiovascular health,” *Atherosclerosis*, vol. 243, pp. 38–43, 2015.
- [11] S. Kasap, A. Gönenç, D. E. Şener, and İ. Hisar, “Serum Cardiac Markers in Patients with Acute Myocardial Infarction: Oxidative Stress, C-Reactive Protein and N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide,” *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 41, pp. 50–57, 2007.
- [12] Kalogeris Theodore, Baines Christopher P., Krenz Maïke, and Korthuis Ronald J., “Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury,” *Int Rev Cell Mol Biol*, vol. 298, pp. 229–317, 2012.

- [13] N. Patil, V. Chavan, and N. D. Patil, "ANTIOXIDANT STATUS IN PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION," *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 22, no. 1, pp. 45–51, 2007.
- [14] S. Sharma, S. M. Black, M. N. Sack, and P. M. Hwang, "Carnitine homeostasis, mitochondrial function and cardiovascular disease," *Drug Discov. Today Dis. Mech.*, vol. 6, no. 1–4, pp. e31–e39, 2009.
- [15] M. D. H. Rosario Buena, Maria Alvarez de Sotomayora, T, Concepcio ´n Perez-Guerrero, Lucia Gomez-Amoresb, Carmen M. Vazquez, "L-carnitine and propionyl-L-carnitine improve endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: Different participation of NO and COX-products," *Life Sci.*, vol. 77, pp. 2082–2097, 2005.
- [16] L. G. S. Augusto Orlandi, Marcella Marcellini, Daniela Pesce, Menotti Calvani, "Propionyl-L-carnitine reduces intimal hyperplasia after injury in normocholesterolemic rabbit carotid artery by modulating proliferation and caspase 3-dependent apoptosis of vascular smooth muscle cells," *Atherosclerosis*, vol. 160, no. 1, pp. 81–89, 2002.
- [17] P. K. Nigam, V. S. Narain, and M. Hasan, "SERUM LIPID PROFILE IN PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION," *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 19, no. 1, pp. 67–70, 2004.
- [18] B. Pitt, J. Loscalzo, J. Ycas, and J. S. Raichlen, "Lipid Levels After Acute Coronary Syndromes," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 51, no. 15, pp. 1440–1445, 2008.
- [19] T. Ota, H. Ishiiki, S. Suzuki, Y. Shibata, Y. Tatami, and S. Harata, "Impact of the statin escape phenomenon on long-term clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction: Subgroup analysis of the Nagoya Acute Myocardial Infarction Study (NAMIS)," *Atherosclerosis*, vol. 242, pp. 155–160, 2015.
- [20] P. Wolf, Y. Winhofer, M. Krssak, S. Smajis, J. Harreiter, L. Kosi-Trebotic, C. Fürsinn, C.-H. Anderwald, S. Baumgartner-Parzez, S. Trattnig, A. Luger, and M. K. A, "Suppression of plasma free fatty acids reduces myocardial lipid content and systolic function in type 2 diabetes," *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 26, pp. 387–392, 2016.
- [21] E. Oie, T. Ueland, C. P. Dahl, P. Bohov, C. Berge, A. Yndestad, L. Gullestad, P. Aukrust, and R. K. Berge, "Fatty acid composition in chronic heart failure: Low circulating levels of eicosatetraenoic acid and high levels of vaccenic acid are associated with disease severity and mortality," *J. Intern. Med.*, 2011.
- [22] T. Inoue, "Ischemia–reperfusion injury is still a big hurdle to overcome for treatment of acute myocardial infarction," *J. Cardiol.*, vol. 67, pp. 305–306, 2016.
- [23] F. Ali, S. Ali, S. Naqvi, M. Bismillah, and N. Wajid, "Comparative analysis of biochemical parameters in diabetic and non-diabetic acute myocardial infarction patients," *Indian Hear. J.*, 2015.
- [24] M. F. Walter, R. F. Jacob, B. Jeffers, M. M. Ghadanfar, G. M. Preston, J. Buch, and R. P. Mason, "Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: A longitudinal analysis of the PREVENT study," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 44, no. 10, pp. 1996–2002, 2004.
- [25] K. C. Sung, J. H. Kang, and H. S. Shin, "Relationship of Cardiovascular Risk Factors and Serum Ferritin with C-reactive Protein," *Arch. Med. Res.*, vol. 38, pp. 121–125, 2007.
- [26] T. B. Domagala, M. Lacinski, W. H. Trzeciak, B. Mackness, M. I. Mackness, and H. Jakubowski, "The correlation of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase (PON1) protein with coronary heart disease status," *Cell. Mol. Biol.*, vol. 52, no. 5, pp. 3–

- 9, 2006.
- [27] L. Gaidukov and D. S. Tawfik, "The development of human sera tests for HDL-bound serum PON1 and its lipolactonase activity," *J. Lipid Res*, vol. 48, pp. 1637–1646, 2007.
 - [28] E. Pytel, O. Banaszczyk, M. Michalak, and M. Broncel, "Increased oxidative stress and decreased membrane fluidity in erythrocytes of CAD patients," *Biochem Cell Biol*, vol. 91, pp. 1–4, 2013.
 - [29] V. C. Olivon, R. A. Fraga-Silva, D. Segers, C. Demougeot, A. M. de Oliveira, S. S. Savergnini, A. Berthelot, R. de Crom, R. Krams, N. Stergiopulos, and R. F. da Silva, "Arginase inhibition prevents the low shear stress-induced development of vulnerable atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice," *Atheroscler.* 227, vol. 227, pp. 236–243, 2013.
 - [30] R. B. Caldwell, H. A. Toque, and S. P. Narayanan, "Arginase: an old enzyme with new tricks," *CellPress*, vol. 36, no. 6, pp. 395–405, 2015.
 - [31] K. G. Rajesh, R. H. Surekha, S. K. Mrudula, Y. Prasad, K. S. Sanjib, and N. Prathiba, "Oxidative and nitrosative stress in association with DNA damage in coronary heart disease," *Singapore Med. J.*, vol. 52, no. 4, pp. 283–288, 2011.
 - [32] M. Karabacak, A. Dogan, S. Tayyar, and H. A. Bas, "Oxidative Stress Status Increase in Patients with Nonischemic Heart Failure," *Med Princ Pr.*, vol. 23, pp. 532–537, 2014.
 - [33] A. Gizia, I. Papassotirioua, F. Apostolakoua, C. Lazaropouloua, M. Papastamatakia, I. Kanavakia, V. Kalotychoub, E. Goussetisc, I. R. Antonios Kattamisd, and E. Kanavakis, "Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant– antioxidant status," *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 46, pp. 220–225, 2011.
 - [34] O. Savu, L. Iosif, O. Bradescu, C. Serafinceanu, R. Papacoea, and I. Stoian, "L-arginine catabolism is driven mainly towards nitric oxide synthesis in the erythrocytes of patients with type 2 diabetes at first clinical onset Octavian," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 52, no. 1, pp. 135–143, 2015.
 - [35] P. Bhakuni, M. Chandra, and M. K. Misra, "Oxidative stress parameters in erythrocytes of post-reperused patients with myocardial infarction," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 20, no. 4, pp. 377–381, 2005.
 - [36] D. Giustarini, F. Galvagni, M. Orlandini, P. Fanti, and R. Rossi, "Immediate stabilization of human blood for delayed quantification of endogenous thiols and disulfides," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1019, pp. 51–58, 2016.
 - [37] B. J. Day, "Catalase and glutathione peroxidase mimics," *Biochem. Pharmacol.*, 2009.
 - [38] Y. Tratsiakovich, J. Yang, A. T. Gonon, P.-O. Sjöquist, and J. Pernow, "Arginase as a target for treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 720, pp. 121–123, 2013.
 - [39] C. Franssen, S. Chen, A. Unger, I. Korkmaz, G. W. De Keulenaer, C. Tschöpe, A. F. Leite-Moreira, R. Musters, and H. W. M. Niessen, "Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction," *JACC Hear. F AIL U RE*, vol. 4, no. 4, pp. 312–324, 2016.