

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
MEDICINĂ GENERALĂ**

*Implicațiile speciilor înalt reactive de oxigen – peroxinitrit, radical hidroxil și anion hipoclorit – în continuumul cardiovascular, aplicații clinice*

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. IOAN TIBERIU NANEA**

**Student-doctorand:  
LITEANU (ȘERBAN) STELA-ANDREEA**

**2020**

# CUPRINS

## PARTEA GENERALĂ

<i>Introducere</i> .....	1
<b>1. Stadiul actual al cunoașterii în domeniu</b> .....	<b>4</b>
1.1. Definiție și terminologie .....	4
1.2. Radicalul hidroxil (OH) .....	5
1.3. Peroxinitritul ONOO <sup>-</sup> .....	6
1.4. Anionul hipoclorit.....	7
<b>2. Metode clasice pentru detecția in vitro a ROS/RNS</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Implicarea ROS/RNS în continuumul cardiovascular</b> .....	<b>8</b>
<b>4. Studiul agregabilității plachetare – date din literatura de specialitate</b> .....	<b>9</b>

## PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

<b>5. Scop și obiective generale</b> .....	<b>11</b>
<b>6. Material și metodă</b> .....	<b>11</b>
6.1. Designul studiului .....	11
6.2. Investigatii clinice și paraclinice .....	11
6.3. Metoda de laborator – protocol .....	12
6.4. Studiul speciilor înalt reactive de oxigen/nitrogen .....	12
6.5. Studiul agregabilității plachetare .....	13
6.6. Modalități de analiză statistică a datelor .....	13
<b>7. Rezultate</b> .....	<b>14</b>
7.1. Caracteristicile lotului .....	14
7.2. Etiologia insuficienței cardiace și clasificarea în funcție de fracția de ejeție a ventriculului stâng .....	14
7.3. Parametrii ecocardiografici.....	14
7.4. Tratamentul pacienților cu insuficiență cardiacă în lotul studiat .....	15

7.5.	Analize de laborator .....	15
7.6.	Parametrii de agregare .....	15
7.7.	Analiza statistică a valorilor fluorescenței APF, HPF si DCF .....	16
8.	<i>Discuții</i> .....	19
9.	<i>Concluzii</i> .....	22
10.	<i>Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</i> .....	24
	<i>Bibliografie</i> .....	25

## Introducere

Ultimele decade au fost marcate de un progres remarcabil în domeniul biologiei moleculare, atât datorită avansării tehnologiei și aparaturii dedicate, cât și datorită creșterii experienței în domeniul cercetării fundamentale.

Numeroase studii au dovedit implicarea speciilor reactive de oxigen și nitrogen (ROS/RNS) în fazele incipiente cât și în progresia a numeroase patologii, inclusiv cardiovasculare.

Cu toate că noțiunea de stres oxidativ și rolul său în patologia cardiovasculară au fost intens studiate în ultimele decade, o analiză ținută asupra dimensiunii producției de specii înalt reactive de oxigen și nitrogen și a rolului pe care acestea îl joacă în declanșarea și progresia anumitor patologii cardiovasculare, nu a fost posibilă.

Astfel, este nevoie de noi metode, de noi probe fluorescente, capabile să identifice cu sensibilitate și specificitate mare aceste hROS/RNS, pentru a vedea dacă într-adevăr ele constituie o componentă majoră a stresului oxidativ, și în ce măsură aceste hROS/RNS ar putea reprezenta viitoare ținte biologice în tratamentul diverselor patologii cardiovasculare.

Noutatea studiului a constat în detecția hROS/RNS la nivel plachetar, protocolul fiind adaptat pentru suspensia de trombocite. Fluoroforii APF și HPF au fost utilizați pentru prima oară într-o suspensie de trombocite, fiind primele date din literatură publicate în acest sens.

De asemenea este prima oară când se decelează cu specificitate și sensibilitate înaltă producția de specii înalt reactive de oxigen sau nitrogen – ONOO, OCl, OH – în insuficiența cardiacă cronică.

Este primul studiu care constată creșterea nivelului de hipoclorit în paralel cu severitatea insuficienței cardiace.

Explorarea chelatorilor de anion hipoclorit ca resurse terapeutice la pacienții cu insuficiență cardiacă în clasa III-IV NYHA constituie o perspectivă promițătoare, fiind necesare studii suplimentare pentru a determina un potențial benefic. Capacitatea diferiților compuși de descompunere a OCl<sup>-</sup>, comparată prin determinarea concentrației care produce 50% din inhibiția OCl<sup>-</sup> (IC50) a arătat că acidul dihidrolipoic, N-acetilcisteina și acidul ascorbic sunt dintre cei mai puternici compuși, după cum urmează: acidul dihidrolipoic > GSH, N-acetilcisteina > cisteina > S-metil glutationul > acidul lipoic, acidul ascorbic > cisteina, GSSG și acidul uric. [1]

Studii experimentale au sugerat că ambroxolul, un drog utilizat clinic pentru a crește producția pulmonară de surfactant, exercită un efect antagonist, semnificativ, dependent de concentrație împotriva monocloraminei și împotriva acidului hipocloros. [2]

În plus s-a observat creșterea producției plachetare de hROS/RNS la pacienții cu dislipidemie necontrolată, rezultat menționat pentru prima oară în literatura de specialitate.

Cei mai importanți predictorii ai producției plachetare de hROS/RNS au fost hipocalcemia, hipertrigliceridemia și trombocitoza.

Astfel, la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică, în special la cei în clasele III-IV NYHA, controlul riguros a dislipidemiei și al hipocalcemiei poate conduce la scăderea toxicității induse de producția de specii înalt reactive de oxigen.

În plus, au fost analizate simultan curbele de agregare plachetară în relație cu producția de specii reactive de oxigen și nitrogen, atât la pacienții aflați sub cât și la cei fără tratament antiagregant plachetar.

În ceea ce privește agregarea plachetară, în afară de maximul de agregare și de agregarea la 50% (parametrii cei mai citați în literatura de specialitate) teza a analizat pentru prima oară noi parametri ai curbei de agregare la pacienții cu ICC precum: agregarea în stadiu bazal, maximul deformării plachetare, timpul în secunde la care s-a produs agregarea maximă, agregarea totală (măsurată ca transmitanța (%)) de la adăugarea agonistului la agregarea maximă), agregarea la 5, 10 și 15 minute și viteza de agregare.

Cei mai importanți predictorii ai agregării totale au fost masa VS indexată, volumul plachetar mediu și viteza de sedimentare a hematiilor. S-a constatat că pe lângă creșterea agregării totale plachetare, hiperglicemia crește și viteza cu care acestea agregă.

Se observă pentru prima oară creșterea producției plachetare de hROS/RNS la pacienții aflați sub tratament antiagregant plachetar.

Controlul hiperglicemiei, reducerea inflamației, reducerea presiunii arteriale pulmonare și prevenirea remodelării ventriculare la pacienții cu insuficiență cardiacă scad agregabilitatea plachetară, reducând riscul de evenimente aterotrombotice.

## **PARTEA GENERALĂ**

## 1. Stadiul actual al cunoașterii în domeniu

Apariția unor noi metode de detecție ROS/RNS a permis o mai bună înțelegere a modului prin care acestea acționează cât și a potențialului lor toxic celular. Din întreg spectrul de ROS/RNS, unele se rezumă la a avea un efect fiziologic la nivel tisular sau celular, îndeplinind funcția de mesageri intra- și intercelulari, sau funcția de precursori în formarea altor specii reactive de oxigen/nitrogen. Cu toate acestea, stresul oxidativ cuprinde o constelație de specii reactive oxigen, nitrogen și compuși halogenați, dintre care unele extrem de instabile, al căror timp de înjumătățire scurt a reprezentat o limită majoră în detecția selectivă și specifică a acestora.

### 1.1. Definiție și terminologie

Stresul oxidativ este generat de specii chimice ce conțin oxigen, denumite specii reactive de oxigen (ROS). În această categorie intră specii precum radicalul anion superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), peroxidul de hidrogen ( $H_2O_2$ ), ozonul ( $O_3$ ), singletul de oxigen ( $^1O_2$ ) sau radicalul hidroxil ( $OH\bullet$ ) (Tabelul 1).

O definiție mai cuprinzătoare include și compușii capabili să genereze stres nitrosativ precum speciile reactive de nitrogen: oxidul nitric (NO), dioxidul de nitrogen ( $NO_2$ ), peroxinitritul (ONOO), etc. (tabel I.1). Alți compuși precum hipocloritul (OCl), hipobromitul (HOBr), radicalii peroxil ( $ROO\bullet$ ), alcoxil ( $RO\bullet$ ) și carbonat ( $CO_3^{\bullet-}$ ) și hidroperoxizi organici (ROOH) sunt câteodată incluși în această definiție.[3][4]

În această lucrare noțiunea de stres oxidativ va face referire și la cea de stres nitrosativ generat de speciile reactive de nitrogen (RNS). Stresul oxidativ generat într-un anumit sistem poate fi considerat ca un dezechilibru între producția de ROS/RNS de către sistem și abilitatea acestuia de a elimina acești compuși. [3]

Progresele din ultimele decenii au arătat că ROS/RNS pot fi clasificate în specii slab, moderat sau înalt reactive de oxigen și nitrogen (hROS/RNS) în funcție de factorii enumerați mai sus - configurația electronică, potențialul redox și timpul de înjumătățire). Astfel devine necesară diferențierea între anumite tipuri de ROS/RNS utilizând markeri specifici și sensibili.

hROS/RNS sunt acele specii a căror capacitate oxidantă este suficient de mare astfel încât să hidroxileze direct inelele hidrocarburilor aromatice. [5]

A fost dificil de apreciat activitatea hROS/RNS *in vivo*, studiile experimentale bazându-se majoritar pe măsurători indirecte. Prin urmare hROS/RNS nu au putut fi diferențiate cu acuratețe de speciile slab reactive de oxigen/nitrogen.

Actualmente rolul precis al hROS/RNS rămâne un studiu în desfășurare care necesită înglobarea tehnicilor curente de depistare, cu utilizarea unor reactivi specifici și selectivi.

Producția de ROS/RNS variază în funcție de tipul de celulă care le generează. Trombocitele joacă un rol crucial în procesele de hemostază, tromboză și inflamație asociate ICC, fiind celule ușor susceptibile la stresul oxidativ. În acest studiu trombocitele au fost celulele de interes pentru analiza producției trombocitare de hROS/RNS.

Sursele intraplachetare de ROS/RNS sunt multiple.[6] În timpul agregării normale apar modificări dramatice ale statusului redox, același lucru întâmplându-se și la adăugarea diferiților agonști, care pot induce producția intra-plachetară de hROS/RNS prin intermediul nicotinamid adenin dinucleotid (fosfat) (NAD(P)H) oxidazei. [7] O altă sursă de generare intraplachetară a hROS/RNS derivă din activarea xantin-oxidazei. [7]

Dintre hROS/RNS am selectat pentru studiul de față 3 specii cu potențial toxic celular crescut și anume: anionul hipoclorit ( $\text{OCl}^-$ ), radicalul hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) și peroxinitrit ( $\text{ONOO}\cdot$ ).

## 1.2. Radicalul hidroxil ( $\text{OH}$ )

Radicalul hidroxil  $\cdot\text{HO}$  este forma neutră a ionului hidroxid ( $\text{HO}^-$ ). [8]

Cel mai frecvent, radicalii hidroxil sunt formați prin descompunerea hidroperoxidilor sau, în chimia atmosferică, prin reacția atomilor de oxigen excitați cu apa. [8]  $\text{OH}$  este radicalul cel mai activ biologic, formându-se *in vivo* în condiții hipoxice. *In vitro*,  $\cdot\text{OH}$  este obținut prin ecuația de reducere dintre acidul ascorbic și ionii de fier.

Deși timpul de înjumătățire este extrem de scurt ( $\sim 10^{-9}$  secunde) [9],  $\cdot\text{OH}$  este o specie extrem de reactivă, astfel încât coliziunea cu orice altă moleculă rezultă într-o reacție chimică, estimându-se că  $\cdot\text{OH}$  difuzează doar câțiva Angstromi ( $1\text{Å} = 10^{-10}\text{m}$ ) până la interacțiunea cu altă moleculă.[10] Odată generat, acesta reacționează la locul formării,  $\cdot\text{OH}$  având capacitatea de a altera orice tip de macromoleculă din vecinătate: hidrocarburi, acizi nucleici, lipide și aminoacizi, această reactivitate înaltă făcându-l foarte periculos pentru organism.[9] Radicalii hidroxil reprezintă factorul declanșator al deteriorării celulare în condiții de inflamație [11], infecție [12][13], carcinogeneză [14], conducând la declanșarea procesului de apoptoză celulară. [15][16]



Studii experimentale au demonstrat că agregarea plachetară indusă de colagen se asociază cu o producție intensă de peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ) poate conduce la formarea radicalului hidroxil ( $\cdot OH$ ) printr-o reacție de tip Fenton [17]

În ciuda numeroaselor tentative, nu există metode eficiente de detecție a radicalilor hidroxil. Acest fapt se datorează reactivității foarte înalte al acestora, care vor reacționa preferențial cu componentele majore celulare – proteine, acizi nucleici, carbohidrați, metaboliți, etc.[18] Radicalul hidroxil nu poate fi eliminat printr-o reacție enzimatică. Metode de eliminare ale  $\cdot OH$  pentru protecția structurilor celulare, includ antioxidanții endogeni precum melatonina și glutathionul, sau antioxidanți exogeni, din dietă, precum manitolul și vitamina E. [8][19]

Deferoxamina a fost utilizată de rutină *in vivo* pentru chelarea fierului și indirect ca inhibitor al generării dependente de fier a radicalilor hidroxil.

### 1.3. Peroxinitritul ( $ONOO^-$ )

Anionul peroxinitrit reprezintă o specie reactivă de nitrogen cu durată scurtă de viață, produs *in vivo* în urma reacției radicalului liber superoxid ( $O_2^-$ ) cu monoxidul de azot ( $NO$ ) la o rată controlată de difuzie ( $\sim 1 \times 10^{10} M^{-1}S^{-1}$ )<sup>6-8</sup>. [20][21][22]

$ONOOH$  trece cu ușurință bistraturile lipidice și descompunerea sa în radicalii  $\cdot OH$  și  $\cdot NO_2$  pare a deveni relevantă în fazele hidrofobice pentru a iniția peroxidarea lipidelor și în procesele de nitrare a lipidelor și proteinelor. [23]

Atunci când sistemele vii sunt expuse la peroxinitrit, o multitudine de efecte biologice pot apărea, cu efecte adverse asupra viabilității și funcției celulare.[24]  $ONOO^-$  are efecte adiționale în detrimentul funcției vasculare, printr-un mecanism mixt de oxidare nitrare, nitrozare și dezaminare a proteinelor, lipidelor celulare, particulelor LDL (low-density lipoprotein) [25] și a acidului arahidonic, cu disfuncție mitocondrială secundară.[24]

Secundar multitudinii de alterări biochimice și a buclelor de feedback pozitiv ale injuriei celulare pe care peroxinitritul le produce acesta induce moartea celulară.[24]

Este totuși important de menționat că nivelele mici de  $ONOO^-$  formate continuu în condiții bazale, pot fi tolerate prin căi de detoxifiere tiol-dependente și prin mecanisme antioxidante, iar disfuncția și moartea celulară apar numai în cazul creșterii susținute a ratei de producție a  $ONOO^-$ , care poate depăși capacitatea mecanismelor de detoxifiere.[26][27][28][29]  $ONOO^-$  are efecte atât pro- cât și antiagregante [31], iar multe dintre efectele biologice atribuite  $NO$ , sunt de fapt mediate de  $ONOO^-$ . [32]

Trombocitele generează atât superoxid cât și oxid nitric, acestea fiind convertite *in vivo* enzimatic sau prin reacții chimice non-enzimatice în specia înalt reactivă de nitrogen – peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) [3], la o rată dependent de difuzie de  $\sim (1 \times 10^{10} \text{M}^{-1} \text{S}^{-1})^{6-8}$ .

[45][46][42]

Având în vedere natura formării și descompunerii  $\text{ONOO}^-$ , ce rezultă într-un timp de înjumătățire scurt și o concentrație mică în stare stabilă, acesta nu poate fi măsurat direct *in vivo*, majoritatea experimentelor bazându-se pe markerii secundari de descompunere ai  $\text{ONOO}^-$ . [44] Cea mai frecvent utilizată probă pentru măsurarea  $\text{ONOO}^-$  este dihidrorodamina (DHR) [69][70]. Metoda detecției peroxinitritului cu DHR cunoaște numeroase limite, DHR putând fi folosită numai ca un indicator nespecific al  $\text{ONOO}^-$  intracelular [72]

Metaloporfirinele pot atenua efectele toxice ale  $\text{ONOO}^-$  *in vivo* și *in vitro*, fiind fiind astfel candidați terapeutici promițători. [44]

De asemenea, toxicitatea mediată de  $\text{ONOO}^-$  poate fi diminuată utilizând antioxidanți simpli pe bază de tiol, precum mercaptoalchilguanidinele, N-acetilcisteina și acidul dihidrolipoic [44].

#### 1.4. Anionul hipoclorit

Anionul hipoclorit este un ion liposolubil compus din clor (Cl) și oxigen ( $\text{O}_2$ ), cu formula chimică  $\text{ClO}^-$ . [81] Produsul intermediar în reacția de formare a anionului hipoclorit, este acidul hipocloros.

Efectul principal al anionului hipoclorit constă în potențialul său bactericid, acesta jucând un rol important în sistemul imunitar înăscut,  $\text{OCl}^-$  fiind cea mai importantă componentă a sistemului bactericid uman. [83]  $\text{OCl}^-$  are efecte citotoxice și proinflamatorii, conducând la declanșarea a numeroase patologii (boli cardiovasculare, cancer, boli neurodegenerative, etc.). [82]

$\text{OCl}^-$  interacționează cu o varietate de ținte biologice, conducând la degradarea proteinelor, distrugerea biopolimerilor ce conțin carbohidrați, denaturarea acizilor nucleici, inactivare enzimatică și oxidarea lipoproteinelor, cu formarea de radicali liberi intermediari. [87] [82]

Principala enzimă implicată în producerea  $\text{OCl}^-$  este mieloperoxidaza (MPO). MPO este de asemenea un mediator care are capacitatea de a se lega de plachetele umane, inducând agregarea plachetară și eliberarea secundară de ROS. [98] Plachetele stimulate generează

superoxid via NAD(P)H oxidaza, care va forma oxigen și peroxid de hidrogen ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  este apoi utilizat într-o reacție catalizată de MPO pentru a converti clorura în hipoclorit. [33]

Cele mai multe teste se bazează pe determinarea indirectă a hipocloritului de sodiu, însă nu sunt suficient de specifice și sensibile pentru detecția anionului hipoclorit.

HDL reprezintă un factor protector de importanță centrală care normalizează hiperreactivitatea plachetară, prin chelarea eficientă a oxidantului  $OCl^-$ . [34] Printre antioxidanții cu capacitate de inhibiție a hipocloritului se numără acidul ascorbic și acidul uric. [35] Printre chelatorii de hipoclorit cunoscuți se și numără și acidul lipoic, cisteina și glutatationul (GSH). [36]

## 2. Metode clasice pentru detecția *in vitro* a ROS/RNS

Printre limitele metodelor se numără reactivitatea extremă, rata variabilă de difuzie de-a lungul membranei celulare și instabilitatea marcată. Măsurătorile clasice ale hROS/RNS sunt indirecte, bazate pe molecule care emit fluorescent [135] în prezența unei multitudini de ROS/RNS. În 2003, un grup de cercetători japonezi introduc două noi probe fluorescente, capabile să se activeze în prezența  $ONOO^-$ ,  $OCl^-$  și  $OH^-$ . [5]

Probele sintetizate pentru detecția hROS/RNS sunt hidroxifenil fluoresceina (HPF - 2-[6-(4'-hidroxi) fenoxi-3*H*-xanten-3-pe-9-il] acid benzoic) și aminofenil fluoresceina (APF - 2-[6-(4'-amino) fenoxi-3*H*-xanten-3-pe-9-il] acid benzoic). [5]

Cu ajutorul acestor probe, hROS/RNS au putut fi diferențiate de peroxidul de hidrogen ( $H_2O_2$ ), de oxidul nitric (NO) și de superoxid. DCF poate reacționa neselectiv atât cu  $OH^-$  cât și cu NO, în timp ce APF reacționează doar cu  $OH^-$ , permițând astfel studierea concretă a rolului biologic al  $OH^-$ . [5]

## 3. Implicarea ROS/RNS în continuumul cardiovascular

Transferul LDL oxidate din lumenul vascular în tunica medie reprezintă ințiatorul aterosclerozei la locul deteriorării endoteliale. [38][39] La nivelul fibrei musculare netede vasculare, ROS produse ca rezultat al activării NAD(P)H oxidazei de către angiotensina II sunt implicate în dezvoltarea hipertrofiei fibrei musculare netede și a hipertensiunii arteriale. [40][41] Hipocloritul produs *in vivo* prin activarea neutrofilelor, monocitelor și macrofagelor modifică lipoproteine sangvine și intensifică peroxidarea lipidelor de către

radicalii liberi, ceea ce probabil joacă un rol important în fazele incipiente ale deteriorării vasculare aterosclerotice.[42]

Ischemia secundară obstrucției aterosclerotice conduce la procese inflamatorii ce inițiază alte căi pentru injuria celulară, prin producția de ROS.

Aceste nivele crescute ale ROS/RNS pot conduce la deteriorări structurale ale inimii, la creșterea permeabilității capilare și pot influența metabolismul cardiomiocitelor, deteriorând astfel atât funcția sistolică, cât și pe cea diastolică.[43]

De asemenea, reperfuzia poate conduce la disfuncția sistemului de conducere cardiac, cu apariția aritmiilor. [44][25]

Determinanții majori ai expresiei genice cardiace care joacă un rol crucial în patogeneza disfuncției cardiace sunt oxigenul și derivații liberi de oxigen. Date recente din studii clinice și experimentale susțin că producția de ROS/RNS este crescută în insuficiența cardiacă. În ciuda studiilor extinse asupra acestui subiect, rolul exact pe care ROS/RNS îl joacă în debutul și progresia insuficienței cardiace, sau din contră, efectele benefice ale acestora, nu au fost complet explicate.

#### **4. Studiul agregabilității plachetare – date din literatura de specialitate**

Trombocitele sunt celule sangvine anucleate, în formă de disc care joacă un rol crucial în procesele de hemostază, tromboză și inflamație.[45] Rolul major este acela de a adera și de a agrega la locul injuriei vasculare pentru a opri sângerarea, însă în anumite patologii, agregarea excesivă duce la aterotromboză care favorizează apariția evenimentelor ischemice.[45]

Agregometria plachetară prin protocolul descris de Born, considerată standardul de aur, determină agregarea turbimetrică cu măsurarea simultană a eliberării de ATP, folosind un spectrofotometru cu lungime de undă fixă. [46]

Mai multe tehnici au fost dezvoltate pentru a măsura timpul de agregare plachetară *in vitro* indusă de agoniști precum adenzin difosfat (ADP), epinefrină, collagen, acid arahidonic și ristocetină. [45]

## **PARTEA SPECIALĂ – CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

## **5. Scop și obiective generale**

Lucrarea de față își propune utilizarea acestei noi metode sensibile și specifice care identifică cu acuratețe producția trombocitară de hROS/RNS la pacienții cu insuficiență cardiacă și compararea cu producția trombocitară de hROS/RNS la voluntarii sănătoși. De asemenea, pentru a putea compara datele obținute cu cele din literatură și pentru a vedea în ce proporție participă aceste hROS/RNS la patofiziologia insuficienței cardiace, vom utiliza și una dintre metodele clasice de detecție a stresului oxidativ – fluoroforul dichlorodihidrofluoresceina (DCF). În plus, va fi evaluată funcția trombocitelor prin studiul agregabilității plachetare și se vor analiza posibilele relații dintre producția trombocitară de ROS/RNS și agregarea plachetară la adăugarea agonistului adenosin difosfat (ADP).

Scopul acestei lucrări este de a face distincția clară între stresul oxidativ total și producția trombocitară de specii înalt reactive de oxigen și nitrogen la pacienții cu insuficiență cardiacă. Obiectivul secundar constă în a explora efectele stresului oxidativ sau a hROS/RNS asupra funcției plachetare.

## **6. Material și metodă**

### **6.1. Designul studiului**

Au fost incluși 71 de pacienți diagnosticați cu insuficiență cardiacă cronică. În urma investigațiilor, și urmând criteriile de excludere 10 pacienți au fost excluși din studiu. Lotul de 61 de pacienți cu ICC a fost împărțit ulterior în două subgrupuri în funcție de clasa funcțională NYHA. Astfel, în primul subgrup au fost incluși 24 de pacienți cu ICC aflați în clasa I-II NYHA iar în al doilea subgrup au fost incluși 37 de pacienți cu ICC în clasa funcțională III-IV NYHA. Valoarea cut-off a NT-proBNP-ului la includere a fost de 125 pg/ml, conform ghidului ESC 2016 de insuficiență cardiacă.

### **6.2. Investigatii clinice și paraclinice**

S-a efectuat anamneza și examenul fizic pentru fiecare pacient, înregistrându-se prezența factorilor de risc cardiovascular și a comorbidităților. Pentru fiecare pacient s-au notat indicele de masă corporală, tensiunea arterială sistolică și diastolică, frecvența

cardiacă, indicele gleznă-braț, electrocardiograma, ultrasonografia vasculară carotidiană, examen ecocardiografic transtoracic standard. Au fost prelevate analize de laborator uzuale.

### **6.3. Metoda de laborator – protocol**

Studiile experimentale s-au desfășurat în cadrul departamentului de Biofizică și Biotehnologie celulară a UMF “Carol Davila” București.

Toate experimentele s-au desfășurat la temperatură camerei, utilizând tuburi de plastic de 1ml, 5ml, 10 ml, 15 ml, seringi și pipete Pasteur. Pentru spectroscopia de fluorescență și pentru spectrofotometru am utilizat cuvițe de cuarț de 3 mm (quartz SUPRASIL® Hellma GmbH & Co., Germany).

Probele de 5 mL de sânge venos periferic au fost colectate în vacutainere cu citrat de sodiu (0.32% concentrația finală) cu un raport sânge:anticoagulant de 9:1.

Prepararea soluției de Apirază 8 mg/10 UI/ml, aminofenil fluoresceină (APF) și hidroxifenil fluoresceină (HPF), de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceină diacetat (DCF) și de HHBS a fost realizată conform protocolului.

Numărul plachetelor a fost analizat cu un analizor automat pe bază de impedanță electrică – Beckman Coulter No A90728. Centrifugarea eprubetelor s-a efectuat utilizând centrifuga Beckman Coulter Allegra X-15 R, iar pentru incubarea probelor s-a folosit incubatorul Heracell Incubator 150i 5% CO<sub>2</sub>. Înregistrarea fluorescenței s-a realizat utilizând spectrofluorimetrul JOBINE YVONE FL-133. Agregarea plachetelor a fost măsurată cu spectrofotometrul JASCO V-550.

Din sângele din primul vacutainer s-au izolat trombocite care au fost ulterior incubate cu fluoroforii APF, HPF, DCF. Sângele din al doilea vacutainer a fost prelucrat pentru a obține plasma limpede și plasma bogată în trombocite – utilizate pentru studiul agregabilității plachetare.

### **6.4. Studiul speciilor înalt reactive de oxigen/nitrogen**

Se incubează suspensia plachetară cu probele fluorescente conform protocolului

Semnalul fluorescent înregistrat prin spectrofluorometrie, pentru fiecare fluorofor în parte, a fost ulterior procesat utilizând programul Spectra Manager. Pentru fiecare pacient au fost obținute 151 unități arbitrară “counts per second” (CPS), standardizate la numărul de plachete, ținând seama și de diluția anticoagulant : sânge de 1 : 9.

## 6.5. Studiul agregabilității plachetare

Spectrofotometrul măsoară transmitanța luminii în timp a suspensiei plachetare agitate cu un magnet, în cuvițe de sticlă la o temperatură de 37 °C. Aparatul este calibrat pentru transmisie utilizând plasma săracă în plachete (platelet poor plasma – PPP) autologă 100% și plasma bogată în plachete (PRP) 0%. Agonistul utilizat – adenzin difosfat (ADP) este adăugat direct în suspensia plachetară, pentru a evita crearea bulelor de aer care pot altera măsurarea semnalului transmis.

Pregătirea plachetelor pentru studiul agregabilității plachetare s-a efectuat conform protocolului.

Au fost înregistrați următorii parametri: agregarea bazală, deformarea plachetară maximă, agregarea la 10 și la 90% din maximul agregării și agregarea maximă. În plus a fost calculat timpul în secunde la care s-a produs agregarea maximă, cât și timpul în secunde de la adăugarea agonistului până la agregarea maximă. Agregarea totală a fost calculată ca distanța (transmitanță %) de la adăugarea agonistului la agregarea maximă. S-a notat și agregarea la 5, 10 și 15 minute.

## 6.6. Modalități de analiză statistică a datelor

Analiza statistică și prelucrarea graficelor s-a realizat utilizând Microsoft Excel și softul de statistică SPSS versiunea 24. Teste de normalitate Shapiro-Wilk a arătat o distribuție anormală pentru toate cele trei probe fluorescente, motiv pentru care s-au aplicat teste statistice nonparametrice. Diferența dintre grupuri a fost realizată utilizând testul Wilcoxon signed-rank, testul Mann Whitney U pentru eșantioane independente și testul pentru analiza varianței unifactoriale Kruskal-Wallis H. . Pentru alți parametri cu distribuție normală au fost utilizate testul T și testul T pentru eșantioane independente. Pentru compararea măsurătorilor ecocardiografice între două grupuri a fost aplicat testul ANOVA unifactorial. Distribuția diferitelor valori pe categorii nominale a fost efectuată cu testul McNemar. Coeficientul de corelație Pearson și testul rho Spearman au fost utilizate pentru a testa puterea asocierii între diferite variabile numerice, iar puterea asocierii dintre variabilele categoriale a fost efectuată utilizând testele Chi-square și Phi și Cramer. Pentru analiza multivariată s-a efectuat regresie liniară multiplă. În grupurile normal distribuite rezultatele au fost exprimate ca medie ± deviația standard, în timp ce în grupurile cu distribuție anormală rezultatele au fost prezentate ca mediană ± deviația standard. Pragul pentru semnificație statistică a fost ales pentru o valoare a  $p < 0.05$ .



## 7. Rezultate

### 7.1. Caracteristicile lotului

**Vârsta** medie a pacienților studiați fost de  $74 \pm 9$  ani, 30 pacienți bărbați (49%), 34% dintre pacienți fiind fumători, 34% diabetici, 46% dislipidemici și 36% dintre pacienți fiind hipertensivi.

Anemia a fost cea mai frecventă întâlnită comorbiditate, 56% dintre pacienții cu ICC au avut anemie, cu un procent mai mare la pacienții în clasa III-IV NYHA (61%) față de cei în clasa I-II NYHA (46%). S-a evaluat și prezența **deficitului de fier absolut și funcțional** în populația studiată, 23 dintre pacienți având deficit de fier absolut (DFA) și 27 pacienți (44%) au avut deficit de fier funcțional (DFF). Boala pulmonară cronică obstructivă a avut o pondere redusă la pacienții cu ICC (20%).

### 7.2. Etiologia insuficienței cardiace și clasificarea în funcție de fracția de ejeție a ventriculului stâng

În ceea ce privește etiologia insuficienței cardiace principala etiologie a fost cardiopatia ischemică (52% din totalul pacienților cu ICC), urmată de valvulopatiile semnificative hemodinamic (39% din pacienții cu ICC) în proporții similare cu hipertensiunea arterială (HTA) (36%). Tahiaritmiile (fibrilația atrială) au reprezentat factorul etiologic cu procentul cel mai mic, respectiv 25%. Însă, majoritatea pacienților au avut etiologii multiple (62%).

Valoarea medie a fracția de ejeție a ventriculului stâng (FEVS) în populația studiată a fost de  $49 \pm 13\%$ , fiind mai mare în clasa I-II NYHA decât în clasa III-IV NYHA ( $55 \pm 11\%$  vs  $45 \pm 13\%$ ,  $p=0.004$ ) (tabelul VII.16). Cei mai mulți pacienți cu ICC au avut FE VS păstrată (48%), urmând categoria de pacienți cu FEVS intermediară (33%) și doar 20% dintre pacienți având FE VS redusă. Valoarea medie a NT-proBNP în populația cu ICC a fost de  $3739 \pm 746$  pg/ml.

### 7.3. Parametrii ecocardiografici

Cum era de așteptat, valoarea medie a FE VS în lotul de pacienți în clasa I-II NYHA a fost semnificativ mai mare decât valoarea medie în lotul de pacienți în clasa III-IV NYHA ( $55 \pm 11\%$  vs  $45 \pm 13\%$ ,  $p=0.004$ ). Deși DTSVS a fost mai mare la pacienții în clasa III-IV NYHA față de cei în clasa I-II NYHA, diferența a fost la limita semnificației statistice ( $38 \pm$

9.8 mm vs  $33.8 \pm 6.7$  mm,  $p=0.048$ ). În schimb HVS a fost prezentă în proporție de 73% la pacienții cu ICC în clasa III-IV NYHA, în timp ce doar 37% dintre pacienții în clasa I-II NYHA au avut HVS ( $p=0.005$ ).

Tulburările de cinetică ventriculară au fost prezente preponderent la pacienții cu ICC în clasa III-IV NYHA (81% vs 50%,  $p=0.01$ ), lucru întărit și de scăderea semnificativă statistic a MAPSE și TAPSE la pacienții în clasele III-IV NYHA, sugerând o disfuncție biventriculară semnificativă la acești pacienți.

#### **7.4. Tratamentul pacienților cu insuficiență cardiacă în lotul studiat**

Cele mai utilizate clase de medicamente au fost betablocantele (82% dintre pacienți), diureticele (72%) urmate de inhibitori ai enzimei de conversie/sartani (57%). 64% dintre bolnavi erau sub tratament anticoagulant.

#### **7.5. Analize de laborator**

Au fost analizate hemograma, parametrii biochimici: glicemie, creatinină serică, uree serică, VSH, CRP, fier seric, feritină și TSH, profilul lipidic, marker hepatici și de colestază, ionograma și electroforeza proteinelor. S-a observat că valoarea medie a HDL colesterol a fost semnificativ mai crescută la pacienții fără tulburări de cinetică segmentară față de cei cu tulburări de cinetică ( $59 \pm 16.6$  vs  $46.5 \pm 15$ ,  $p=0.005$ ). În plus, fosfataza alcalină (FA) a avut valori semnificativ mai mari la pacienții în clasa III-IV NYHA. Dintre parametrii de coagulare doar activitatea de protrombină a fost mai scăzută în cazul pacienților cu ICC în clasa III-IV NYHA față de cei în clasa I-II NYHA, diferența fiind semnificativă statistic ( $67 \pm 27\%$  vs  $86 \pm 27.1\%$ ,  $p=0.02$ ). Având în vedere că valoarea alfa 1 globulinei a fost semnificativ influențată de clasa NYHA, fiind considerabil mai crescută la pacienții în clasa IV NYHA, s-a efectuat curba receiver operating characteristics care a fost semnificativă statistic. Valoarea cut off pentru alfa 1 globulina la pacienții în clasa funcțională IV NYHA este de 4,19% (valori normale 2-5%) cu o specificitate (Sp) de 86% și o sensibilitate (Sb) de 68%.

#### **7.6. Parametrii de agregare**

A fost necesară analiza parametrilor de agregare la pacienții sub tratament antiagregant plachetar (18 pacienți (29%)) versus cei fără tratament antiagregant (43 pacienți (71%))

Dintre parametrii de agregare studiați, tratamentul antiagregant plachetar a redus semnificativ statistic agregarea la 15 minute ( $40.7 \pm 16.3$  vs  $52.6 \pm 26.3$ ,  $p=0.035$ ), cât și timpul până la obținerea agregării maxime ( $308.5 \pm 222.4$  vs  $388 \pm 202.9$ ,  $p=0.048$ ), acesta fiind cu aproximativ 80 de msec mai scurt la pacienții sub tratament antiagregant plachetar.

S-a observat o corelație moderat-puternică, inversă și semnificativă statistic între fumat și viteza de agregare care sugerează că agregarea plachetelor este mai lentă la pacienții fumători. Prezența diabetului zaharat a influențat agregarea totală, pacienții cu DZ având o agregare totală mai mică decât pacienții fără DZ. În prezența anemiei, agregarea plachetară bazală și deformarea plachetară maximă indusă de adiția agonistului sunt mai intense. S-au observat valori mai mici ale agregării totale măsurate ca distanța de la baseline la agregarea maximă, cât și ale agregării la 5, 10 și 15 minute la pacienții cu depresie

Se poate observa o corelație moderată, pozitivă și semnificativă statistic între fracția de eiecție a ventriculului stâng (FEVS) și agregarea maximă și agregarea la 10 minute. În schimb, agregarea maximă, la 10 și la 15 minute par a fi influențate negativ de valoarea presiunii sistolice în artera pulmonară (PAPs).

Cea mai puternică corelație a fost între VSH și agregarea plachetară bazală ( $r=0.43$ ,  $p=0.004$ ). De asemenea VSH și fibrinogenul s-au corelat invers cu agregarea totală, calculată ca distanța de la baseline la agregarea maximă. Astfel, cu cât markerii inflamatorii cresc, cu atât agregarea totală scade. Volumul plachetar mediu (MPV) s-a corelat pozitiv și semnificativ statistic cu agregarea totală, astfel se poate spune că, cu cât volum plachetar mediu este mai mare, cu atât agregarea plachetară este mai intensă. Cu cât glicemia a fost mai mare cu atât timpul până la agregarea maximă a fost mai scurt ( $r=-0.337$ ,  $p=0.027$ ), în timp ce gamma globulina s-a corelat pozitiv cu timpul până la agregarea maximă.

A existat o corelație pozitivă între nivelul feritinei și agregarea bazală și deformarea plachetară maximă, dar și o corelație negativă între nivelul feritinei și agregarea totală calculată ca distanța de la baseline la adiția agonistului și până la agregarea maximă ( $r=-0.391$ ,  $p=0.01$ ). s-a efectuat o regresie liniară multiplă pentru a prezice agregarea plachetară totală care evidențiază o ecuație de regresie semnificativă statistic ( $F(3, 39) = 7$ ,  $p=0.001$ ).

### **7.7. Analiza statistică a valorilor fluorescenței APF, HPF și DCF**

Distribuția fluorescenței exprimată în CPS a fost anormală pentru toți cei trei fluorofori. S-a observat o creștere substanțială a fluorescenței în lotul de studiu, neexplicată prin generarea artificială a ROS/RNS în laborator (tabelul I).

Tabelul I - Comparatie între valorile fluorescenței plachetare obținute la pacienții cu ICC și cele obținute la lotul de voluntari sănătoși.

Mediana $\pm$ DS	Lotul cu ICC (nr=61)	Lotul martor (nr=19)	<i>p</i>
APF	18892 $\pm$ 16522	12845 $\pm$ 5919	0.036
HPF	69589 $\pm$ 38467	40213 $\pm$ 21210	0.02
DCF	17236 $\pm$ 44564	12514 $\pm$ 5308	0.02

Etiologia ICC nu a influențat producția trombocitară de specii reactive de oxigen, nici în lotul de pacienți cu ICC (n=61), nici în cele două sugrupuri.

Pacienții în clasa funcțională I-II NYHA, care au avut mai mult de o etiologie a insuficienței cardiace, au avut o producție plachetară mai redusă a ONOO, OH, OCl, decelate prin înregistrarea semnalului fluorescent al APF ( $r=-0.488$ ,  $p=0.015$ ).

La pacienții în clasa III-IV NYHA a existat o corelație semnificativă între stresul oxidativ total decelat cu DCF și diagnosticul de hipertensiune arterială ( $r=0.390$ ,  $p=0.017$ )

Se poate observa o creștere importantă a fluorescenței, măsurată prin cei trei fluorofori, în grupul de pacienți în clasele III-IV NYHA (n=24), față de cei în clasele I-II NYHA (n=37). Însă, această creștere este la limita semnificației statistice pentru APF ( $p=0.04$ ) și fără semnificație statistică pentru HPF ( $p=0.6$ ). În schimb, s-a înregistrat o creștere marcată a stresului oxidativ total (măsurat prin DCF) în paralel cu agravarea insuficienței cardiace, conform clasificării funcționale NYHA ( $p=0.009$ ).

Corelația puternică și semnificativă statistic dintre APF și HPF în populația studiată cu ICC ( $r=0.52$ ,  $p < 0.001$ ) se datorează probabil capacității lor comune de a detecta peroxinitrit și radicalul hidroxil, lucru care este cel mai bine dovedit mai ales la pacienții în clasa I-II NYHA, la care corelația dintre cei doi fluorofori devine și mai puternică ( $r=0.74$ ,  $p < 0.001$ ). Corelația scade la pacienții în clasa III-IV NYHA dar rămâne semnificativă statistic ( $r=0.43$ ,  $p=0.008$ ).

Deși APF are de asemenea și capacitatea de a detecta anionul hipoclorit, totuși fluorescența emisă de HPF a fost mai puternică, comparativ cu cea emisă de APF, în lotul de studiu (n=61) ( $69589 \pm 38467$  vs  $18892 \pm 16522$   $p < 0.001$ ) cât și în lotul I și lotul II, ceea ce ar sugera că fluoroforul HPF este mai potent decât APF.

Tensiunea arterială sistolică la momentul recoltării probelor s-a corelat invers și semnificativ statistic cu fluorescența APF, deci cu producția plachetară de ONOO, OH și OCl ( $r=-0.313$ ,  $p=0.018$ ). A existat o corelație moderată și semnificativă între producția plachetară de ONOO, OH și OCl și genul masculine. Stresul oxidative total s-a corelat cu vârsta ( $r=0.366$ ,  $p=0.026$ ) și cu prezența hipertensiunii arteriale ( $r=0.39$ ,  $p=0.017$ ).

Pentru populația totală cu ICC s-a evidențiat o corelație puternică, inversă și semnificativă statistic între numărul de plachete și fluorescența măsurată prin toți fluoroforii. Cea mai puternică corelație a fost între fluorescența APF și numărul de plachete ( $r = -0.594$ ,  $p < 0.001$ ).

La pacienții cu ICC ( $n = 61$ ) singura probă fluorescentă al cărui semnal s-a corelat cu profilul lipidic a fost APF. Cea mai puternică corelație pozitivă a fost între fluorescența APF și colesterolul total ( $r = 0.3$ ,  $p = 0.009$ ), urmată de corelația cu LDL colesterol ( $r = 0.28$ ,  $p = 0.029$ ).

S-a evidențiat o corelație moderată, pozitivă, semnificativă între fluorescența APF și nivelul albuminei plasmatică ( $r = 0.475$ ,  $p = 0.019$ ). Faptul că albumina s-a corelat atât cu fluorescența APF cât și cu cea a HPF la această categorie de pacienți, sugerează o relație între albumină și toate cele trei specii reactive de oxigen (ONOO, OH, OCl), diferită față de cea a stresului oxidativ total decelat prin DCF, cu care nu s-a evidențiat nici o relație relevantă.

S-a observat o corelație moderată, negativă și semnificativă statistic între concentrația calciului ionic și fluorescența emisă de APF în suspensia plachetară ( $r = -0.42$ ,  $p = 0.04$ ) la pacienții din clasa I-II NYHA.

În ceea ce privește terapia pacienților cu ICC, s-a remarcat o corelație între terapia cu nitrați retard și creșterea producției plachetare de ONOO și OH în lotul cu ICC ( $r = 0.294$ ,  $p = 0.021$ ), corelație care devine mai puternică la pacienții aflați în clasa funcțională III-IV NYHA ( $r = 0.326$ ,  $p = 0.049$ ).

În lotul studiat ( $n = 61$ ), s-a remarcat o corelație inversă între utilizarea statinelor și stresul oxidativ total produs de plachete ( $r = -0.286$ ,  $p = 0.037$ ), decelat prin înregistrarea semnalului fluorescent emis de DCF

Având în vedere că o proporție substanțială dintre pacienții cu ICC urmau tratament antiagregant (30%), populația cu ICC a fost împărțită în două subgrupuri – reprezentând pacienții cu tratament antiagregant plachetar ( $n = 18$ ) și fără tratament antiagregant plachetar ( $n = 43$ ).

Astfel, la pacienții care urmau tratament antiagregant plachetar se pot observa două corelații inverse, foarte puternice și semnificative statistic, între fluorescența emisă de HPF și agregarea plachetară în stadiu bazal ( $r = -0.641$ ,  $p = 0.004$ ) și între fluorescența emisă de HPF și deformarea plachetară maximă obținută după adăugarea agonistului ADP ( $r = -0.69$ ,  $p = 0.002$ ).

Aceste corelații nu se regăsesc și pentru fluorescența APF și nici pentru fluorescența DCF, sugerând că aceste asocieri se limitează doar la producția plachetară de ONOO și OH.

Din moment ce aceste corelații nu se regăsesc și la lotul de pacienți cu ICC fără tratament antiagregant plachetar, se poate sublinia rolul tratamentului antiagregant plachetar în creșterea producției plachetare ale acestor specii reactive de oxigen.

## 8. Discuții

71 de pacienți diagnosticați cu ICC (conform recomandărilor ghidului European de insuficiență cardiacă din 2016) au fost studiați din punct de vedere clinic și paraclinic. Dintre dezavantajele studiului menționăm numărul mare de criterii de excludere, ținând cont că atât stresul oxidativ cât și agregarea plachetară pot fi declanșate de o multitudine de factori intrinseci și extrinseci. Acest fapt a condus la excluderea a 10 dintre pacienți înrolați. Lotul martor a cuprins 19 voluntari sănătoși comparabili ca vârstă și sex, fără nici o boală cardiovasculară aparentă.

Compararea emisiei fluorescente a APF și HPF cu emisia fluorescentă a DCF a reprezentat o metodă de validare a tehnicii, dar și de analiză selectivă a hROS/RNS: ONOO, OH, OCl.

Lotul de pacienți cu ICC a fost analizat comparativ cu lotul de voluntari sănătoși, din punct de vedere al emisiei fluorescente cât și al agregării plachetare. În plus, s-a efectuat analiza de subgrup: lotul I – pacienții în clasa I-II NYHA versus lotul II – pacienții în clasa III-IV NYHA.

Astfel, dintre cei 61 de pacienți, cu vârstă medie  $74 \pm 9$  ani, 30% bărbați, 39% au fost în lotul I (clasa I-II NYHA, n=24) iar 61% în lotul II (clasa III-IV NYHA, n=37). Din analiza factorilor de risc cardiovascular reținem că 34% au fost fumători (n=21), 61% supraponderali (n= 37), 34% diabetici tip 2 (n=21), 46% dislipidemici (n=28) și 36% hipertensivi (n=22).

Dintre comorbidități cea mai frecventă a fost anemia 56% (n=34), urmată de prezența BPOC 20% (n=12).

La pacienții studiați, pe primul loc ca etiologie a fost boala coronariană ischemică 52% (n=32), urmată de valvulopatiile severe 39% (n=24) și de hipertensiunea arterială 36% (n=22). Majoritatea pacienților (48%, n=29) au avut etiologii multiple.

Din considerente etice tratamentul pacienților cu ICC nu a fost întrerupt înainte de prelevarea sângelui. Pacienții sub tratament antiagregant plachetar au fost analizați separat.

La analiza parametrilor de agregare între cele două subgrupuri nu au existat diferențe semnificative statistice. Analiza parametrilor de agregare a fost analizată și la pacienții sub tratament antiagregant plachetar (18 pacienți – 29%) versus cei fără tratament antiagregant (43 pacienți – 71%).

S-a observat o corelație moderat-puternică, inversă și semnificativă statistic între fumat și viteza de agregare care sugerează că agregarea plachetelor este mai lentă la pacienți fumători ( $p=0.0005$ ). Deși acest rezultat este controversat există studii experimentale concordante, dintre care îl menționez pe cel publicat de Hitoshi *et al* din 2017, care a observat că extractul din fumul de țigaretă inhibă agregarea plachetară la șoarecii de laborator indusă prin variate căi – prin acidul 9,11-dideoxi-9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -methanoepoxi-prosta-5Z,13E-dien-1-oic (U-46619), prin agonistul receptorului pentru tromboxan A2 și prin cea indusă de colagen. [47]

Dintre parametrii de agregare și markerii biochimici, cea mai puternică asociere a fost între nivelul VSH și agregarea plachetară bazală ( $r=0.43$ ,  $p=0.004$ ). În plus, VSH și fibrinogenul s-au corelat invers cu agregarea totală. Astfel, se poate spune că agregarea totală este mai scăzută în condiții de inflamație. Datele din literatură arată că valorile crescute ale glicemiei se corelează cu creșterea agregării plachetare. [48] Studiul de față arată în plus că și viteza cu care plachetele agregă se corelează cu valoarea glicemiei.

În ceea ce privește analiza speciilor înalt reactive de oxigen, s-a observat o creștere substanțială a fluorescenței prin cele trei metode în lotul de studiu, comparativ cu subiecții sănătoși.

În plus, la pacienții din clasele III-IV NYHA fluorescența celor trei probe a fost mult mai intensă comparativ cu fluorescența înregistrată la pacienții din clasele I-II NYHA. Însă, această creștere a fost semnificativă statistic doar pentru APF ( $p=0.04$ ) și foarte semnificativă pentru DCF ( $p=0.009$ ) sugerând creșterea stresului oxidativ total în insuficiența cardiacă – rezultat concordat cu numeroase studii. [49][50]

Creșterea nivelului de hipoclorit în paralel cu severitatea insuficienței cardiace nu a mai fost susținută de alți autori, de altfel neexistând studii cu privire la acest subiect.

Corelația puternică și semnificativă statistic dintre APF și HPF în lotul de pacienți cu ICC ( $r=0.52$ ,  $p< 0.001$ ) se datorează probabil capacității lor comune de a

detecta speciile de peroxinitrit și hidroxil, lucru care este cel mai bine dovedit la pacienții în clasa I-II NYHA la care corelația a fost foarte puternică ( $r=0.74$ ,  $p < 0.001$ ).

Studiile susțin rolul stresului oxidativ în geneza hipertensiunii arteriale [51],[188], asociere susținută și de studiul de față care decelează o corelație semnificativă între stresul oxidativ total și prezența hipertensiunii arteriale ( $r=0.390$ ,  $p=0.017$ ) cu precădere la pacienții în clasele III-IV NYHA.

Această asociere se datorează probabil producției de ONOO și ON cu efect puternic vasodilatator, explicând de ce valorile tensionale la momentul recoltării sângelui au fost mai mari la subiecții cu producție plachetară mai redusă a ONOO.

În ceea ce privește profilul lipidic, au existat asocieri între producția plachetară de ONOO, OH și OCl și nivelul colesterolului total ( $r=0.3$ ,  $p=0.009$ ) și a LDL colesterol ( $r=0.28$ ,  $p=0.029$ ) la pacienții cu ICC, asocieri care devin foarte puternice la pacienții în clasele III-IV NYHA. Aceste corelații nu s-au regăsit și pentru fluorescența emisă de HPF, ceea ce sugerează că nivelul anionului hipoclorit (decelat suplimentar de APF) se corelează cu profilul lipidic.

La analiza electroforezei proteinelor, la pacienții în clasa I-II NYHA, s-a evidențiat o corelație moderată, semnificativă între fluorescența APF și nivelul albuminei plasmatice ( $r=0.475$ ,  $p=0.019$ ). Corelația între albumina plasmatică și fluorescența emisă de HPF a fost mai puternică și mai semnificativă statistic ( $r=0.548$ ,  $p=0.006$ ). În anul 2013 Sitar *et al* stipulează în articolul “Human serum albumin and its relation with oxidative stress” capacitatea albuminei de antioxidant extracelular potent, care chelează radicalii liberi precum ONOO și OCl, transformându-se în albumină oxidată. [53]

Faptul că albumina s-a corelat atât cu fluorescența APF cât și cu cea a HPF la această categorie de pacienți, sugerează creșterea cantității de albumină oxidată în paralel cu creșterea producției plachetare de ONOO, OH și OCl. Asocierea s-a regăsit doar la pacienții în clasa I-II NYHA, o justificare fiind dată de inflamația, hemodiluția, malnutriția, enteropatia și cașexia caracteristice formelor avansate de ICC cu hipoalbuminemie secundară. [54].

În privința tratamentului, s-a remarcat o legătură între terapia cu nitrați retard și creșterea producției plachetare de ONOO și OH la pacienții cu ICC, nitroglicerina fiind donor de oxid nitric [55], care la rândul său contribuie la sinteza in vivo a peroxinitritului.

Utilizând modele de regresie lineară s-a observat că 33.6% din variabilitatea fluorescenței APF în lotul de pacienți cu ICC, poate fi justificată de numărul plachetelor, valoarea trigliceridelor și a LDL colesterolului, cel mai important predictor fiind numărul



plachetelor. Astfel, fluorescența medie a APF la pacienții cu ICC a crescut cu  $88.7 \pm 43.4$  unități pentru fiecare mg/dl de LDL colesterol, și a scăzut cu  $-148.52 \pm 30.7$  unități pentru fiecare  $10^3/\text{mm}^3$  de PLT.

Pentru pacienții din clasele III-IV NYHA, predictorii cei mai semnificativi ai fluorescenței APF au fost numărul plachetelor și nivelul trigliceridelor explicând 49% din variabilitatea producției de ONOO, OH și OCl la acești bolnavi.

## 9. Concluzii

### Metoda de evaluare a stresului oxidativ

1. In cadrul lucrării s-a urmărit evaluarea stresului oxidativ (SO) prin detectarea speciilor înalt reactive de oxigen (peroxinitrit, radicalul hidroxil și anionul hipoclorit) utilizând pentru prima oară fluoroforii amino – și hidroxi – fenil fluoresceina în suspensie plachetară la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică.

2. Tehnica nouă a fost comparată cu metoda clasică de detectare a stresului oxidativ care utilizează fluoroforul dicloro-dihidro-fluorescein diacetat, majoritatea studiilor desfășurate până în prezent fiind efectuate în suspensii de neutrofile. Avantajul utilizării fluoroflorilor, care au o autooxidare redusă, constă în sensibilitatea și specificitatea crescute pentru detecția speciilor înalt reactive de oxigen față de metoda clasică.

3. Hidroxifenil fluoresceina a detectat semnificativ statistic mai multe specii de peroxinitrit și de radical hidroxil decât fluoroforul aminofenil fluoresceina.

### Stresul oxidativ la bolnavii cu insuficiență cardiacă

1. Stresul oxidativ total și concentrația anionului hipoclorit sunt marcat crescute la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică și cresc în paralel cu severitatea insuficienței cardiace evaluată prin clasa NYHA.
2. Stresul oxidativ total în IC este mai mare la vârstnici și la bărbați.
3. La pacienții cu IC in clasele I-II NYHA, albumina plasmatică a fost un predictor de creștere pentru producția de peroxinitrit și hidroxil.
4. La pacienții din clasele I-II NYHA, 60% din producția plachetară de peroxinitrit, hidroxil și hipoclorit a fost influențată de timpul de tromboplastină parțial activată,

nivelul hormonului tireostimulant și nivelul gamma globulinei, însă cel mai important predictor pentru producția celor trei specii a fost nivelul scăzut al calciului ionic seric.

5. La pacienții cu IC clasele III-IV NYHA predictorii pentru creșterea producției de anion hipoclorit au fost numărul plachetelor și nivelul trigliceridelor.
6. La pacienții cu IC clasele III-IV NYHA prezența factorilor de risc cardiovascular precum hipertensiunea arterială și dislipidemia necontrolate terapeutic, contribuie la creșterea suplimentară a stresului oxidativ total.

### **Agregabilitate plachetară și stresul oxidativ**

1. Agregabilitatea plachetară a fost evaluată prin înregistrarea agregării bazale, deformarea plachetară maximă, agregarea la 10 și la 90% din maximul agregării și agregarea maximă. În plus, a fost calculat timpul în secunde la care s-a produs agregarea maximă, cât și timpul în secunde de la adăugarea agonistului până la agregarea maximă.
2. Agregarea totală a fost calculată ca distanța (transmitanță %) de la adăugarea agonistului la agregarea maximă. S-a notat și agregarea la 5, 10 și 15 minute.
3. S-a observat o reactivitate plachetară crescută odată cu înaintarea în vârstă. Statutul de fumător s-a asociat cu scăderea vitezei de agregare plachetară.
4. La bolnavii cu IC, agregarea în stadiu bazal și nivelul maxim al deformării plachetare au fost crescute la pacienții cu anemie hipocromă microcitară determinată de deficitul de fier sau de statusul inflamator crescut reflectat prin creșterea vitezei de sedimentare a hematiilor.
5. Datele din literatură arată că hiperglicemia se corelează cu creșterea agregării plachetare totale, studiul de față demonstrând în plus și o asocieră între hiperglicemie și viteza agregării plachetare.
6. Principalii predictorii ai agregării plachetare totale au fost volumul plachetar mediu și viteza de sedimentare a hematiilor, agregarea fiind pe de o parte mai intensă cu cât volumul plachetar mediu a fost mai mare, și mai redusă cu cât viteza de sedimentare a hematiilor a fost mai mare.
7. Agregarea indusă a fost mai intensă la pacienții cu hipertensiune arterială pulmonară comparativ cu cei cu presiune sistolică pulmonară normală.

8. La pacienții cu IC sub tratament antiagregant plachetar, pe lângă reducerea agregării în stadiul bazal și a deformării plachetare maxime după adăugarea adenozin difosfat, s-a constatat o creștere a producției de peroxinitrit și hidroxil.

### **Concluzii finale**

1. Controlul hiperglicemiei, reducerea inflamației, reducerea presiunii arteriale pulmonare și prevenirea remodelării ventriculare la pacienții cu insuficiență cardiacă ar putea scădea agregabilitatea plachetară, reducând riscul de evenimente aterotrombotice.
2. Sunt necesare studii suplimentare pentru a determina un potențial benefic al chelatorilor de anion hipoclorit ca resurse terapeutice la pacienții cu insuficiență cardiacă în clasa III-IV NYHA.
- 3.

## **10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Noutatea studiului a constat în detecția hROS/RNS la nivel plachetar, protocolul fiind adaptat pentru suspensia de trombocite. Fluoroforii APF și HPF au fost utilizați pentru prima oară într-o suspensie de trombocite, fiind primele date din literatură publicate în acest sens.

De asemenea este prima oară când se decelează cu specificitate și sensibilitate înaltă producția de specii înalt reactive de oxigen sau nitrogen – ONOO, OCl, OH – în insuficiența cardiacă cronică.

Este prima comunicare științifică care constată creșterea nivelului de hipoclorit în paralel cu severitatea insuficienței cardiace.

Explorarea chelatorilor de anion hipoclorit ca resurse terapeutice la pacienții cu insuficiență cardiacă în clasa III-IV NYHA constituie o perspectivă promițătoare, fiind necesare studii suplimentare pentru a determina un potențial benefic. Capacitatea diferiților compuși de descompunere a OCl, a arătat că acidul dihidrolipoic, N-acetilcisteina și acidul ascorbic sunt dintre cei mai puternici compuși. Studii experimentale au sugerat că ambroxolul, un drog utilizat clinic pentru a crește producția pulmonară de surfactant, exercită un efect antagonist, semnificativ, dependent de concentrație împotriva monocloraminei și împotriva acidului hipocloros. [56]

În plus s-a observat creșterea producției plachetare de hROS/RNS la pacienții cu dislipidemie necontrolată, rezultat menționat pentru prima oară în literatura de specialitate.

Cei mai importanți predictorii ai producției plachetare de hROS/RNS au fost hipocalcemia, hipertrigliceridemia și trombocitoza.

Astfel, la pacienții cu insuficiență cardiacă cronică, în special la cei în clasele III-IV NYHA, controlul riguros a dislipidemiei și al hipocalcemiei poate conduce la scăderea toxicității induse de producția de specii înalt reactive de oxigen.

În plus, au fost analizate simultan curbele de agregare plachetară în relație cu producția de specii reactive de oxigen și nitrogen, atât la pacienții aflați sub cât și la cei fără tratament antiagregant plachetar.

În ceea ce privește agregarea plachetară, în afară de maximul de agregare și de agregarea la 50% (parametrii cei mai citați în literatura de specialitate) teza a analizat pentru prima oară noi parametri ai curbei de agregare la pacienții cu ICC precum: agregarea în stadiu bazal, maximul deformării plachetare, timpul în secunde la care s-a produs agregarea maximă, agregarea totală (măsurată ca transmitanța (%)) de la adăugarea agonistului la agregarea maximă), agregarea la 5, 10 și 15 minute și viteza de agregare.

Cei mai importanți predictorii ai agregării totale au fost masa VS indexată, volumul plachetar mediu și viteza de sedimentare a hematiilor.

S-a constatat că pe lângă creșterea agregării totale plachetare, hiperglicemia crește și viteza cu care acestea agregă.

Se observă pentru prima oară creșterea producției plachetare de hROS/RNS la pacienții aflați sub tratament antiagregant plachetar.

Controlul hiperglicemiei, reducerea inflamației, reducerea presiunii arteriale pulmonare și prevenirea remodelării ventriculare la pacienții cu insuficiență cardiacă scad agregabilitatea plachetară, reducând riscul de evenimente aterotrombotice.

## **Bibliografie**

1. Yan LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritschler HJ, Packer L. Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation. Arch Biochem Biophys. 15 martie 1996;327(2):330–4.
2. Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Cucurullo F. Ambroxol is a scavenger of hypochlorous acid and monochloramine. Pharmacology. august 1994;49(2):132–5.

3. Oxidative Stress [Internet]. 1 ed. Academic Press; 1985 [citată 4 februarie 2020]. 507 p. Disponibil la: <https://www.elsevier.com/books/oxidative-stress/sies/978-0-12-642760-8>
4. Katerina Krumova. Overview of Reactive Oxygen Species. În: Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences. Royal Society of Chemistry; 2016.
5. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem*. 31 ianuarie 2003;278(5):3170–5.
6. Boulos C, Jiang H, Balazy M. Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues. *J Pharmacol Exp Ther*. aprilie 2000;293(1):222–9.
7. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. martie 2008;28(3):s11-16.
8. Hydroxyl radical. În: Wikipedia [Internet]. 2019 [citată 4 februarie 2020]. Disponibil la: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Hydroxyl\\_radical&oldid=929628141](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Hydroxyl_radical&oldid=929628141)
9. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 15 iulie 1993;215(2):213–9.
10. Freinblicher W, Colivicchi MA, Stefanini C, Bianchi L, Ballini C, Misini B, et al. Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. - PubMed - NCBI. [citată 5 februarie 2020]; Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21533983>
11. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1 aprilie 1984;219(1):1–14.
12. McCormick ML, Roeder TL, Railsback MA, Britigan BE. Eosinophil peroxidase-dependent hydroxyl radical generation by human eosinophils. *J Biol Chem*. 11 noiembrie 1994;269(45):27914–9.
13. Chen SX SP. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. - PubMed - NCBI. 1999 [citată 5 februarie 2020]; Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10103001>
14. Desesso JM, Scialli AR, Goeringer GC. D-mannitol, a specific hydroxyl free radical scavenger, reduces the developmental toxicity of hydroxyurea in rabbits. *Teratology*. aprilie 1994;49(4):248–59.

15. Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler AC, Best TM. Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol (Oxf)*. iulie 2015;214(3):329–48.
16. Tiedemann AV. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1 martie 1997;50(3):151–66.
17. Shah A, Passacuale G, Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet nitric oxide signalling in heart failure: role of oxidative stress. *Cardiovasc Res*. 1 septembrie 2011;91(4):625–31.
18. Von Sonntag. *Methods Enzymology*. În: *Methods Enzymology*. 1994. p. 47–56.
19. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, et al. A review of the evidence.
20. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. februarie 1990;87(4):1620–4.
21. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*. 3 aprilie 1986;320(6061):454–6.
22. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. - PubMed - NCBI [Internet]. [citat 5 februarie 2020]. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1118251>
23. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. - PubMed - NCBI [Internet]. [citat 5 februarie 2020]. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17667957>
24. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. august 2007;6(8):662–80.
25. Majidi M, Kosinski AS, Al-Khatib SM, Lemmert ME, Smolders L, van Weert A, et al. Reperfusion ventricular arrhythmia „bursts” predict larger infarct size despite TIMI 3 flow restoration with primary angioplasty for anterior ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*. aprilie 2009;30(7):757–64.

26. Shacka JJ, Sahawneh MA, Gonzalez JD, Ye Y-Z, D'Alessandro TL, Estévez AG. Two distinct signaling pathways regulate peroxynitrite-induced apoptosis in PC12 cells. *Cell Death Differ.* septembrie 2006;13(9):1506–14.
27. Virág L, Marmer DJ, Szabó C. Crucial role of apopain in the peroxynitrite-induced apoptotic DNA fragmentation. *Free Radic Biol Med.* decembrie 1998;25(9):1075–82.
28. Zhuang S, Simon G. Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells. *Am J Physiol, Cell Physiol.* august 2000;279(2):C341-351.
29. Vicente S, Pérez-Rodríguez R, Oliván AM, Martínez Palacián A, González MP, Oset-Gasque MJ. Nitric oxide and peroxynitrite induce cellular death in bovine chromaffin cells: evidence for a mixed necrotic and apoptotic mechanism with caspases activation. *J Neurosci Res.* iulie 2006;84(1):78–96.
30. Villa LM, Salas E, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 decembrie 1994;91(26):12383–7.
31. Brown AS, Moro MA, Masse JM, Cramer EM, Radomski M, Darley-USmar V. Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite. *Cardiovasc Res.* noiembrie 1998;40(2):380–8.
32. Berk BC, Abe JI, Min W, Surapisitchat J, Yan C. Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* decembrie 2001;947:93–109; discussion 109-111.
33. J. Schultz, Harisson J. E. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *Journal of Biological.* 1976;
34. Assinger A, Schmid W, Eder S, Schmid D, Koller E, Volf I. Oxidation by hypochlorite converts protective HDL into a potent platelet agonist. *FEBS Lett.* 5 martie 2008;582(5):778–84.
35. Yan LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritschler HJ, Packer L. Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation. *Arch Biochem Biophys.* 15 martie 1996;327(2):330–4.
36. Firuzi O, Giansanti L, Vento R, Seibert C, Petrucci R, Marrosu G, et al. Hypochlorite scavenging activity of hydroxycinnamic acids evaluated by a rapid microplate method based on the measurement of chloramines. *J Pharm Pharmacol.* iulie 2003;55(7):1021–7.

37. Hool LC. REACTIVE OXYGEN SPECIES IN CARDIAC SIGNALLING: FROM MITOCHONDRIA TO PLASMA MEMBRANE ION CHANNELS. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* ianuarie 2006;33(1–2):55–61.
38. Taverne YJHJ, Bogers AJJC, Duncker DJ, Merkus D. Reactive Oxygen Species and the Cardiovascular System. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2013 [citat 5 februarie 2020];2013. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655680/>
39. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* iulie 1996;16(7):831–42.
40. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, et al. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 6 august 1999;274(32):22699–704.
41. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, et al. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* septembrie 1998;32(3):488–95.
42. S. V. Panasenکو. Hipocloritul, modificari oxidative ale lipoproteinelor plasmatice si ateroscleroza. 2001;131
43. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. - PubMed - NCBI [Internet]. [citat 5 februarie 2020]. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10355961>
44. Lopes RD, Li L, Granger CB, Wang TY, Foody JM, Funk M, et al. Atrial fibrillation and acute myocardial infarction: antithrombotic therapy and outcomes. *Am J Med.* septembrie 2012;125(9):897–905.
45. B. . Marincu, Monica Neagu, Oana Munteanu, A. Neagu. KINETIC STUDY OF PLATELET AGGREGATION.
46. Bizzozero, Giulio. On a new blood particle and its role in thrombosis and blood coagulation = Über einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung - *NLM Catalog - NCBI.* 1982;1846–901.
47. Kashiwagi H, Yuhki K, Imamichi Y, Kojima F, Kumei S, Higashi T, et al. Cigarette Smoke Extract Inhibits Platelet Aggregation by Suppressing Cyclooxygenase Activity. *TH Open.* 30 octombrie 2017;1(2):e122–9.



48. Postprandial platelet aggregation: effects of different meals and glycemic index. - PubMed - NCBI [Internet]. [citată 6 februarie 2020]. Disponibil la: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22434051>
49. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol.* octombrie 2011;155(1):30–44.
50. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* decembrie 2011;301(6):H2181-2190.
51. Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am.* mai 2009;93(3):621–35.
52. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension | Hypertension Research [Internet]. [citată 6 februarie 2020].
53. Sitar ME, Aydin S, Cakatay U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress. *Clin Lab.* 2013;59(9–10):945–52.
54. Arques S, Ambrosi P. Human serum albumin in the clinical syndrome of heart failure. *J Card Fail.* iunie 2011;17(6):451–8.
55. Agvald P, Adding LC, Artlich A, Persson MG, Gustafsson LE. Mechanisms of nitric oxide generation from nitroglycerin and endogenous sources during hypoxia in vivo. *Br J Pharmacol.* ianuarie 2002;135(2):373–82.
56. Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Cucurullo F. Ambroxol is a scavenger of hypochlorous acid and monochloramine. *Pharmacology.* august 1994;49(2):132–5.

## **Lista lucrărilor științifice publicate**

### **Articole publicate în reviste de specialitate**

1. **A.S. Serban**, A. Hodoroșea, M. Iordache, S. M. Maher, I. Pisica, G.S. Gheorghe, A. Iliesiu, T. Savopol, I.T. Nanea - New insights on oxidative stress in chronic stable atherosclerosis. *A Journal of Clinical Medicine*, Volume 12, Supplement, 2017, 9. (Anexa 8) <http://www.medicina-interna.ro/articol.php?articol=998&lang=ro>

2. **S.A. Șerban**, A. Hodorogea, N. Camelia, I. Parvu, I.T. Nanea, A. Ilieșiu – Modificări structurale și funcționale ale plachetelor la vârstnicii hipertensivi. Journal of Hypertension Research (2018) 4(4):148–155. (Anexa 9) <http://hypertens.org/archive/2018-volume-4-issue-4>

3. **A. Șerban**, M.Iordache, A. Hodorogea, C.Toma, S. Maher, A.M. Ilieșiu, I.T.Nanea – Social determinants and oxidative stress among elderly patients with cardiovascular diseases – two facets of the same matter. Research and science today, Spring 2017, No. 1(13)/2017. (Anexa 10) <https://www.rstjournal.com/rst-113-2017/>

### **Lucrări prezentate la manifestări științifice organizate de asociații profesionale naționale și internaționale**

1. **A. Serban** - “Blood pressure and antihypertensive drugs effects on platelet oxidative stress and hypochlorite anion levels in hypertensive patients”, European Society Hypertension Congress, Barcelona 9-11 iunie, 2018. (Anexa)

2. A S. Hodorogea , **AS. Serban-Liteanu** , M. Iordache , I. Pisica , P. Dragomir, GS. Gheorghe , IT. Nanea, T. Savopol, AM. Iliesiu - The relationship between intraplatelet oxidative stress and platelet aggregation in patients with stable coronary artery, ESC Congress 2017, European Heart Journal 38 (suppl\_1), 2017 – poster. (Anexa)

3. **A.S. Serban**, A. Hodorogea, M. Iordache, S. M. Maher, I. Pisica, G.S. Gheorghe, A. Iliesiu, T. Savopol, I.T. Nanea - New insights on oxidative stress in chronic stable atherosclerosis - diploma de excelență Sesiunea Tânrului Cercetător, Congresul UMF Carol Davila Bucuresti, editia a V-a, Maedica, a Journal of Clinical Medicine, Vol.12 (Suppl), 29-31 mai, 2017. (Anexa)

4. **A.S. Serban**, M.M. Iordache, A. Ciobanu, A. Hodorogea, G.S. Gheorghe, T. Savopol, A. Iliesiu, I.T. Nanea - Anionul hipoclorit – marker al severității stresului oxidativ în insuficiența cardiacă cronică – metodă nouă de detecție a hipocloritului. National Congress of Cardiology Sinaia, Oct.2016, Revista Română de Cardiologie Vol. 26, Supliment 2016. (Anexa)

5. **A.S. Liteanu** (Șerban), M. Iordache, A. Iliesiu, G. Gheorghe, V.Teodorescu, C. Nicolae, G. Uscoiu, T. Savopol, I.T. Nanea – Noi metode de detecție a speciilor înalt reactive

de oxigen la nivel trombocitar în patologia cardiacă, National Congress of Cardiology Sinaia 17-19 Septembrie 2015, Revista Română de Cardiologie Vol. 25, Supliment 2015, 50-52.  
(Anexa)

### ***Contracte de cercetare***

1. Contract de cercetare doctorală încheiat în cadrul proiectului „Susținerea excelenței în cercetarea științifică doctorală interdisciplinară în domeniile economic, medical și al științelor sociale” POSDRU/187/1.5/S/155463.