

Pokazatelji oksidativnog stresa i aktivnosti antioksidativnih enzima u plazmi bolesnika sa različitim stepenom hronične srčane insuficijencije

Slavica Radovanović¹, Tatjana Đukić^{2,4}, Sonja Suvakov^{2,4}, Mirjana Krotin^{1,4}, Dragan V. Simić^{3,4}, Ana Savić-Radojević^{2,4}, Marija Plješa-Ercegovac^{2,4}, Aleksandra Đoković¹, Marija Matić^{2,4}, Nataša Janković^{2,4}, Tatjana Simić^{2,4}

¹Odeljenje kardiologije, Kliničko bolnički centar „Bežanijska kosa”, Beograd, Srbija

²Institut za Medicinsku i kliničku biohemiju, Beograd, Srbija

³Klinika za kardiologiju, Klinički centar Srbije, Beograd, Srbija

⁴Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

Sažetak

Uvod: Istraživanja poslednjih nekoliko godina sugerišu da se hronična srčana insuficijencija (HSI) potencijalno može svrstati u veliku grupu oksidativnih oboljenja u čijem nastajanju i progresiji značajnu ulogu ima nekontrolisana produkcija slobodnih radikala. U ovom istraživanju su određivani pokazatelji oksidativnog oštećenja lipida i proteina kao i aktivnosti antioksidativnih enzima u plazmi bolesnika sa različitim stepenom HSI nakon infarkta miokarda. Analizirana je povezanost između markera oksidativnog stresa i pokazatelja remodelovanja leve komore.

Metode: U istraživanje je uključeno 120 konsekutivnih bolesnika sa različitim stepenom HSI definisanim prema klasifikaciji Njujorškog kardiološkog društva (NYHA) i 69 zdravih ispitanika. Koncentracija malondialdehida u plazmi (MDA), proteinske tiol (P-SH) i reaktivne karbnilne grupe (RCD), zajedno sa aktivnošću glutation peroksidaze (GSH-Px) i superoksid dismutaze (SOD) određivani su spektrofotometrijski i/ili ELISA metodom i korelirani su sa ultrazvučnim indeksima remodelovanja, enddiastolnim i endsistolnim dimenzijama i volumenima (LVEDD, LVESD, LVEDV i LVESV).

Rezultati: Kod bolesnika sa teškim stepenom HSI (NYHA klasa III/IV) izmerene su više koncentracije MDA i RCD i niži nivo P-SH grupa u odnosu na vrednosti zabeležene kod asimptomatskih bolesnika (NYHA klase I/II) ili kontrolne grupe. Oksidativni stres kod teških bolesnika bio je povezan sa značajnim padom aktivnosti GSH-Px u plazmi. Nađene su i značajne korelacije između sadržaja RCD i indeksa remodelovanja, posebno volumena na kraju sistole ($r=0,452$; $p=0,011$) i dijastole ($r=0,469$, $p=0,008$) ali samo kod bolesnika III i IV NYHA grupe.

Zaključak: Pojačana peroksidacija lipida i oksidativno oštećenje proteina uz smanjene aktivnosti antioksidativnih enzima kod bolesnika sa teškim stepenom HSI ima važnu ulogu u nastanku sistemskog oksidativnog stresa kod ovih bolesnika, dok oksidativne modifikacije ključnih makromolekula imaju značajnu ulogu u remodelovanju leve komore u hroničnoj srčanoj insuficijenciji.

Ključne reči Hronična srčana insuficijencija, oksidativni stres, koronarna bolest

Istraživanja poslednjih nekoliko godina sugerišu da se hronična srčana insuficijencija (HSI) potencijalno može svrstati u grupu tzv. oksidativnih oboljenja¹ u čijem nastajanju značajnu ulogu ima oksidativni stres kao stanje poremećene ravnoteže između prooksidanata i antioksidativnih odbrambenih mehanizama, u korist prooksidanasa. Značaj slobodnih radikala u patofiziologiji HSI je bio u fokusu interesovanja prethodne decenije, što potvrđuje veliki broj različitih eksperimentalnih i kliničkih istraživanja. Rezultati ovih istraživanja sugerišu da slobodni radikali mogu biti uključeni u hipertrofiju kardiomiocita, apoptozu i mehanizme koji posreduju miokardno remodelovanje, učestvujući u

tranziciji od kompenzatorne hipertrofije do progresivne dilatacije Singal i Dhala.^{2,3} Progresija HSI je kompleksan proces a remodelovanje miokarda se smatra najznačajnijom determinantom u tom procesu. Međutim, još uvek nije sasvim jasno da li je oksidativni stres primarni događaj u evoluciji oboljenja, posebno u ishemijskoj HSI. Pretpostavlja se da slobodni radikali preko direktnog štetnog efekta na metabolizam miocita^{4,5} učestvuju u patogenezi remodelovanja. S druge strane, pogoršanje funkcije miokarda povećava aktivnost adrenergičkog sistema kao i drugih kompenzatornih mehanizama koji preko svojih pro-oksidativnih efekata doprinose još većoj produkciji slobodnih radikala. Za bo-

Ije sagledavanje uloge oksidativnog stresa u progresiji ishemijske hronične srčane insuficijencije, potrebno je određivati markere oksidativnog stresa u bolesnika sa različitim stepenom HSI i korelirati ih sa ehokardiografskim indeksima remodelovanja.

Sistemska oksidativni stres u HSI je u većini istraživanja praćen određivanjem pokazatelja aktivnosti slobodnih radikala, kao što su oksidativne modifikacije lipida (malondialdehid i izoprostani).^{6,7-10} Međutim, još uvek je nepoznato da li su i ostali makromolekuli koji su uobičajeno mete napada slobodnih radikala, takođe oštećeni kod bolesnika sa srčanom insuficijencijom. Naime, u prisustvu slobodnih jona metala sa promenljivim valencama (gvožđa i/ili bakra), vodonik peroksid se prevodi u veoma reaktivni hidroksil radikal, dok se lipidni peroksidi prevode u peroksil radikale. Peroksil radikal je idealan za propagaciju oksidativnih lančanih reakcija, jer ima dug poluživot.¹¹ U uslovima povećanog stvaranja vodonik peroksida, peroksil radikali mogu oksidovati osetljive amino kiseline (cistein, histidin, metionin i triptofan) u proteinima.¹¹ S druge strane, malondialdehid stvara Schiff-ove baze sa amino grupama amino kiselinjskih ostataka proteina i može doprineti povećanju sadržaja karbonilnih grupa u plazmi. Ovaj mehanizam oštećenja proteina je odnedavno u literaturi poznat pod nazivom »karbonilni stres« i potvrđen je u hroničnom oštećenju bubrega¹² i u hipertenziji.¹³ Oksidativne modifikacije proteina su određivane samo merenjem oksidacije proteinskih tiol grupa albumina¹⁰, koje se smatraju žrtvenim antioksidansima.¹⁴ Sadržaj karbonilnih grupa proteina plazme koje predstavljaju jedan od najosetljivih pokazatelja oksidativnog oštećenja proteina, nije do sada određivan u bolesnika sa HSI.

U ovom radu ispitivan je stepen oksidativnog oštećenja lipida i proteina kao i aktivnost antioksidativnih enzima glutation peroksidaze i superoksid dizmutaze u plazmi bolesnika sa različitim stepenom hronične srčane insuficijencije. Nivoi svih ispitivanih biohemijskih parametara su korelirani sa ehokardiografskim pokazateljima remodelovanja miokarda

Metode

U studiju je uključeno 189 ispitanika od kojih je 120 bolesnika (74 muškaraca i 46 žena) i 69 zdravih osoba (40 muškaraca i 29 žena) u okviru kontrolne grupe. Bolesnici su regrutovani uzastopno, tokom ambulantnih pregleda u poliklinici Kliničko bolničkog centra „Bežanijska kosa“ i svi su imali anamnestički i klinički potvrđenu dijagnozu hronične srčane insuficijencije sa prethodno dijagnostikovanom koronarnom bolešću, koja je dokumentovana angiografski. Osnovni kriterijum za uključivanje bolesnika u studiju je bio da ejakciona frakcija leve komore bude manja od 45%, da je hronična srčana insuficijencija bila stabilna u zadnje 2 nedelje i da je postojalo pismeno odobrenje pacijenta za sprovođenje planiranog istraživanja koje je u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji kao i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Kriterijumi za isključivanje bolesnika su bili: akutna ili dekompenzovana srčana insuficijencija, kardiogeni šok, akutna embolija pluća, teške smetnje u funkciji pluća ili teška bronhijalna astma, nekontrolisani hiper ili hipo tireoidizam kao i poznata oboljenja ili klinički značajno promenjeni laboratorijski parametri, koji utiču sami po sebi na tok HSI kao što su: hronična bubrežna insuficijencija, teška oboljenja jetre i maligna bolest.

Težina HSI je procenjena na osnovu tri kriterijuma: prema subjektivnim simptomima i klasifikaciji Njujorškog kardiološkog društva (NYHA), prema ejakcionoj frakciji leve komore (LVEF) kao meri objektivno dokumentovane miokardne disfunkcije u mirovanju i prema vrednostima kvantitativnog biohemijskog markera HSI, moždanog natriuretskog polipeptida (BNP). Na osnovu klasifikacije Njujorškog kardiološkog društva (NYHA), bolesnici su bili raspoređeni u četiri grupe. EFLK (%) je određivana u ehokardiografskom kabinetu Kliničko bolničkog centra „Bežanijska kosa“, po Simpsonovoj metodi u 2D-modu. Korišćenjem ove metode prema preporukama Američkog ehokardiografskog udruženja (ASE) bilo je moguće najpreciznije odrediti volumene leve komore na kraju sistole i dijastole (LVESD, LVEDD, LVESV, LVEDV) kao ehokardiografske indekse remodelovanja miokarda. Dilatiranom komorom je smatrana ona čija je end-dijastolna dimenzija $\geq 5,8$ cm. Normalnim vrednostima smatrani su end-sistolni volumen leve komore (LVESV) 33-68 ml za muškarce i 18-65 ml za žene, a end-dijastolni volumen leve komore (LVEDV) 96-157 ml za muškarce i 59-138 za žene.

Svim ispitanicima su određivani i biohemijski pokazatelji oksidativnog stresa. Kao pokazatelj oksidativnog oštećenja lipida, određivan je malondialdehid (MDA), proizvod lipidne peroksidacije, spektrofotometrijski po metodi OxiResearch™ BIOXYTECH® LPO-586. Koncentracija MDA je izražena u $\mu\text{mol/L}$. Očekivane vrednosti MDA u normalnoj ljudskoj plazmi su 0-1 $\mu\text{mol/L}$ ¹⁵ Kao pokazatelj oksidativne modifikacije proteina određivan je sadržaj karbonilnih grupa (RCD), u plazmi metodom Levine-a i sar.¹⁶ i vrednosti izražene u $\mu\text{mol/g}$ proteina a sadržaj tiol grupa proteina (P-SH), metodom Jocelyn-a i sar.¹⁷ i vrednosti izražene u mmol/L . Antioksidativni enzimski kapacitet je procenjivan spektrofotometrijskim merenjem aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) po metodi Fridovicha i sar.¹⁸ i glutation peroksidaze (GSH-Px) po metodi Flohe i sar.¹⁹ Njihova aktivnost predstavljena je u U/L plazme.

Sve vrednosti su izražene kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom. Postojanje statistički značajnih razlika među grupama je ispitivano korišćenjem ANOVA testa nakon dobijanja normalne raspodele parametara primenom Kolmogorov-Smirnov Hi kvadrat testa. U cilju obrade podataka korišćen je statistički paket SPSS. Analize su rađene sa verovatnoćom od 95% ($p \leq 0.05$).

Rezultati

Opšte karakteristike bolesnika i ehokardiografski pokazatelji remodelovanja miokarda

Prosečna starost bolesnika sa hroničnom srčanom insuficijencijom koji su bili uključeni u naše istraživanje iznosila je 59 godina, dok je u kontrolnoj grupi iznosila 58 godina. Populaciju bolesnika sa hroničnom srčanom insuficijencijom činilo je 46 (38.3%) žena i 74 (61.7%) muškarca a u kontrolnoj grupi je bilo 29 (42.0%) žena i 40 (58.0%) muškaraca. Pored starosti i pola razmotreno je kod svih ispitanika i prisustvo ostalih faktora rizika za koronarnu bolest, (Tabela 1). Prikazani su i ehokardiografski parametri kao i rutinske laboratorijske analize svih ispitanika, koje su određivane da bi se isključilo prisustvo precipitirajućih činilaca, koji pogoršavaju ili i sami izazivaju HSI i da bi se isključila teža oštećenja bubrežne funkcije koja bi potencijalno uticala na vrednosti određenih pokazatelja oksidativnog stresa.

Pokazatelji oksidativnog oštećenja lipida i proteina u plazmi bolesnika sa HSI

Oksidativno oštećenje molekula lipida kod bolesnika sa HSI praćeno je određivanjem koncentracije malondialdehida u plazmi. Iz prikazanih rezultata (Slika 1) se vidi da sa napredovanjem HSI postoji postepeno povećanje sadržaja malondialdehida u plazmi bolesnika i da je kod bolesnika sa najtežim stepenom srčane insuficijencije to povećanje najizraženije. Nije bilo statistički značajne razlike između sadržaja MDA u plazmi bolesnika I i II NYHA grupe i zdravih osoba. Međutim, u grupama bolesnika sa NYHA III i IV stepenom HSI nivo MDA je bio značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.01$). Najteži bolesnici (NYHA IV) su imali značajno više vrednosti MDA i u odnosu na asimptomatske bolesnike sa HSI ($p < 0.001$). Razlika u koncentraciji MDA je bila statistički značajna ($p < 0.01$) i između dve simptomatske grupe (Slika 1).

Kao pokazatelj aktivnosti slobodnih radikala u ovom radu je određivan i sadržaj karbonilnih grupa i proteinskih tiol grupa koji su ukazivali na oksidativno oštećenje proteina. Iz rezultata prikazanih na Slici 2 se vidi da je sadržaj karbonilnih grupa proteina u plazmi povišen u svim ispitivanim grupama bolesnika sa HSI i statistički se značajno razlikovao u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.001$) sa najizraženijim povećanjem kod bolesnika sa najtežim stepenom hronične srčane insuficijencije. Rezultati određivanja sadržaja tiol grupa pokazuju da se sadržaj proteinskih tiol grupa nije bitno razlikovao između I, II i III NYHA grupe bolesnika i kontrolne grupe, ali je

Kao pokazatelj aktivnosti slobodnih radikala u ovom radu je određivan i sadržaj karbonilnih grupa i proteinskih tiol grupa koji su ukazivali na oksidativno oštećenje proteina. Iz rezultata prikazanih na Slici 2 se vidi da je sadržaj karbonilnih grupa proteina u plazmi povišen u svim ispitivanim grupama bolesnika sa HSI i statistički se značajno razlikovao u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.001$) sa najizraženijim povećanjem kod bolesnika sa najtežim stepenom hronične srčane insuficijencije. Rezultati određivanja sadržaja tiol grupa pokazuju da se sadržaj proteinskih tiol grupa nije bitno razlikovao između I, II i III NYHA grupe bolesnika i kontrolne grupe, ali je

Tabela 1. Osnovne karakteristike i ehokardiografski i laboratorijski parametri zdravih osoba i bolesnika sa hroničnom srčanom insuficijencijom

	Zdrave osobe	NYHA			
		I	II	III	IV
Faktori rizika					
Starosna dob (god)	58.4±5.5 ^a	57.90±4.4	57.70±5.8	62.14±5.6	61.54±5.5
Pol M/Ž	40/29	5/6	48/23	14/14	7/3
HTA(%)	0(0%)	7(63.6%)	54(76.1%)	22(81.5%)	9(81.8%)
DM (%)	0(0%)	3(27.3%)	28(39.4%)	10(37.0%)	6(54.5%)
BMI (kg/m ²)	25.61±3.5	27.78±3.9	28.12±5.1	29.36±4.4	27.60±3.4
HLP (%)	39(56.5%)	11(100%)	61(85.9%)	25(92.6%)	6(54.5%)
Pušači(%)	26(37.7%)	4(36.4%)	23(32.4%)	12(44.4%)	5(45.5%)
UZ parametri					
LVEF (%)	66.84±3.9	43.27±2.8	38.67±7.0	30.14±7.4	21.72±5.9
LVEDD cm	5.01±0.4	5.58±0.5	5.80±0.6	6.21±0.9	6.75±0.4
LVEDV ml	103.73±31.8	120.97±67.7	147.78±52.6	177.89±86.4	225.41±57.6
LVESD cm	3.18±0.3	4.02±0.7	4.38±0.7	4.94±1.0	5.78±0.8
LVESV ml	34.62±11.7	61.75±55.0	88.38±41.0	125.65±68.8	176.83±45.4
Biohemijski parametri					
Proteini(g/L)	140.13±13.5	136.45±13.0	140.34±12.6	137.0±10.4	140.90±12.6
Albumini (g/L)	4.10±2.0	46.09±1.9	46.40±2.1	45.07±2.0	45.72±2.6
Urea(mmol/l)	5.31±1.1	5.94±1.8	6.58±1.9	8.12±3.2	8.73±4.2
Kreatinin (μmol/l)	96.87±12.8	102.03±14.9	107.92±17.4	112.46±24.2	128.05±27.6
Glukoza (mmol/l)	5.28±1.3	6.08±1.0	6.80±2.1	7.25±3.5	7.79±3.3

bio značajno smanjen u NYHA IV grupi u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.05$) (Slika 3). U grupi bolesnika sa najtežim stepenom HSI statistički značajno smanjenje sadržaja proteinskih tiol grupa je postojalo i u odnosu na I i II NYHA grupu (asimptomatskih) bolesnika.

Aktivnost antioksidativnih enzima u plazmi bolesnika sa HSI

Aktivnost antioksidativnih ekstracelularnih enzima glutation peroksidaze (GSH-Px) i superoksid dizmutaze (SOD), određivana je u plazmi svih ispitanika. Iz prikazanih rezultata (Slike 4 i 5) se vidi da se aktivnost GSH-Px u plazmi asimptomatskih bolesnika ne razlikuje od vrednosti zabeleženih u kontrolnoj grupi. Međutim, glutation peroksidazna aktivnost plazme je statistički značajno niža u plazmi teških bolesnika, III i IV NYHA grupe, u odnosu na asimptomatske bolesnike ($p < 0.05$) i na zdrave ispitanike ($p < 0.01$). Aktivnost SOD je u svim ispitivanim grupama bolesnika sa hroničnom srčanom insuficijencijom povišena u odnosu na aktivnost koja je dobijena u plazmi zdravih osoba. Ta razlika je veća između bolesnika III i IV NYHA grupe i kontrolne grupe ($p < 0.01$), nego između asimptomatskih bolesnika i kontrolne grupe ($p < 0.05$).

Povezanost pokazatelja oksidativnog stresa sa remodelovanjem miokarda leve komore u HSI

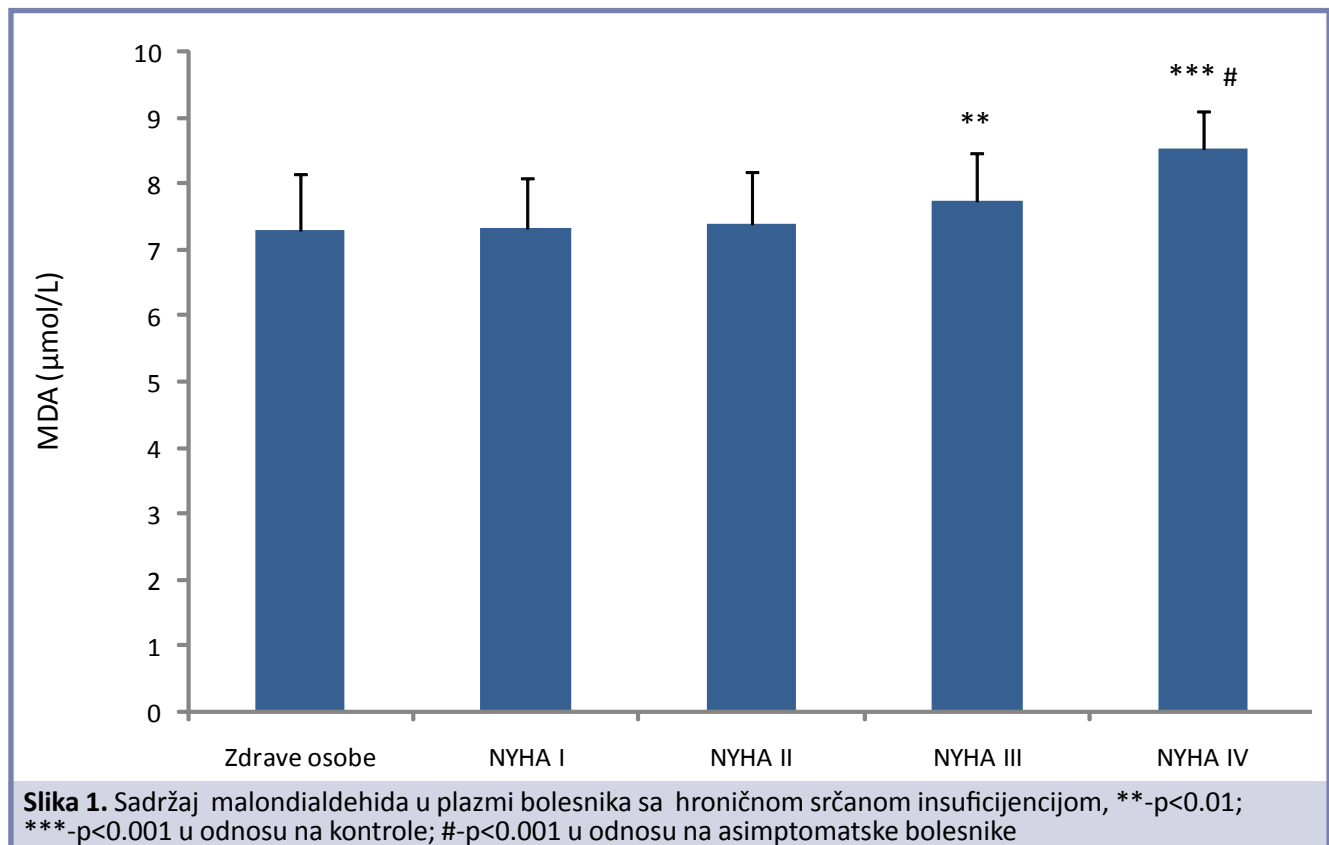
Sa napredovanjem HSI remodelovanje postaje sve izraženije, a da bi se ispitalo u kojoj meri ovo remodelovanje zavisi od stepena oksidativnog stresa, pokazatelji oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (MDA, RCD i P-SH kao i GSH-Px i SOD) su korelirani sa ehokardio-

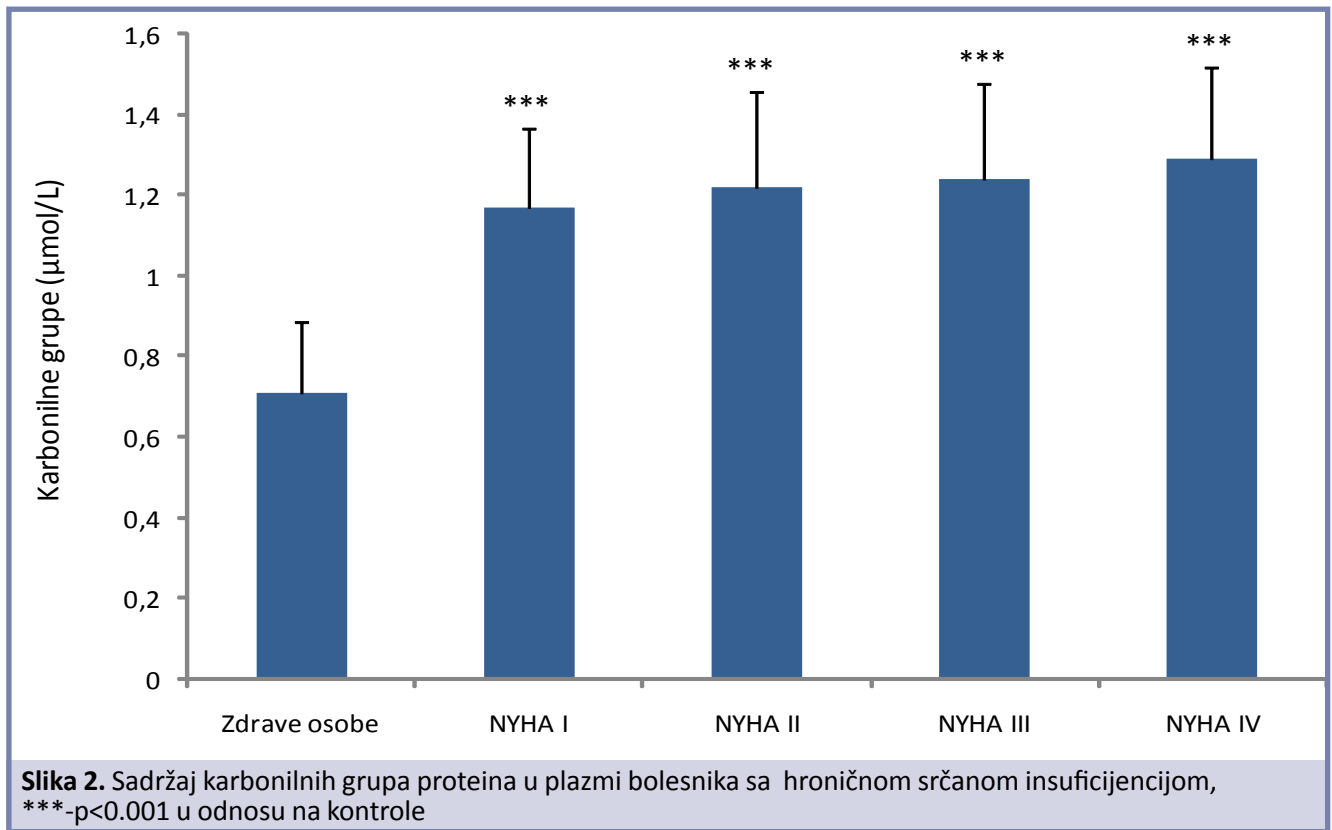
grafskim parametrima, enddiastolnim (LVEDD) i endsistolnim (LVESD) dimenzijama i volumenima (LVEDV i LVESV) kao indeksima remodelovanja miokarda. Uočeno je da sadržaj malondialdehida i karbonilnih i proteinskih tiola grupa, kao pokazatelja oksidativnog oštećenja lipida i proteina u plazmi bolesnika sa HSI, ne korelira značajno sa posmatranim ehokardiografskim parametrima remodelovanja leve komore, ($p > 0,05$) pri analiziranju svih ispitivanih bolesnika, od kojih su 2/3 bolesnici I i II NYHA funkcionalne grupe. Pokazano je da ni aktivnost antioksidativnih enzima nije statistički značajno povezana sa stepenom remodelovanja miokarda na nivou cele grupe ($p > 0,05$).

Korelacija pokazatelja oksidativnog stresa sa indeksima miokardnog remodelovanja leve komore dodatno je analizirana samo kod bolesnika III i IV NYHA grupe (Tabela 2). Iz prikazanih rezultata se vidi da postoji značajna povezanost između stepena oksidativnog oštećenja proteina određivanog kao sadržaj karbonilnih grupa u plazmi bolesnika III i IV NYHA klase i stepena remodelovanja leve komore. Naime, što je oksidacija proteina plazme bila izraženija to su i volumeni na kraju diastole i sistole, promena geometrije i oblika leve komore kao i stepena ventrikularne disfunkcije takođe bili veći ($r = 0.469$; $p = 0.008$; odnosno $r = 0.452$; $p = 0.011$) (Slike 6 i 7).

Diskusija

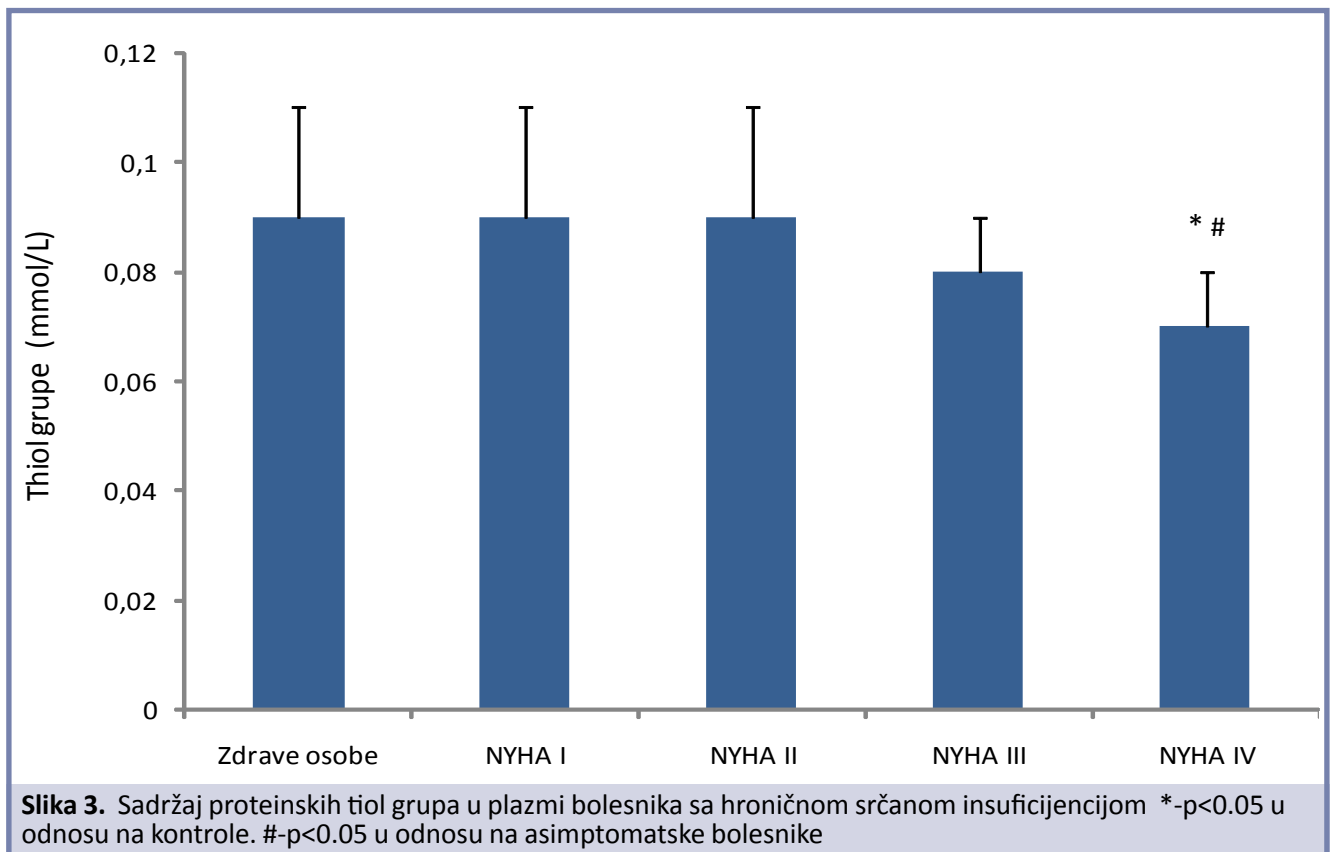
Na osnovu rezultata koji su prikazani u ovom radu prisustvo „karbonilnog stresa“ se može potvrditi i kod bolesnika sa hroničnom srčanom insuficijencijom. Štaviše, sadržaj karbonilnih grupa proteina, koje su jedan od

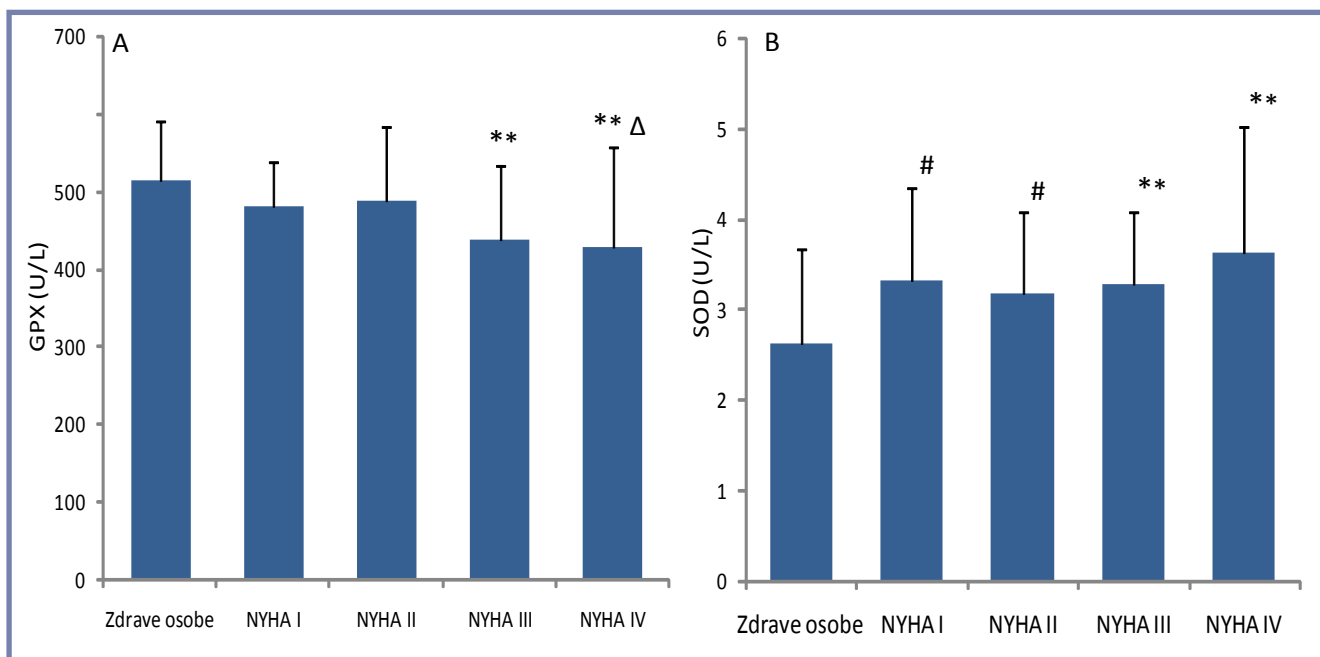




najosetljivijih pokazatelja aktivnosti slobodnih radikala značajno korelira sa osnovnim patofiziološkim procesom odgovornim za progresiju HSI, remodelovanjem miokarda. Pored povećanog sadržaja karbonilnih grupa, u prilog postojanja oksidativnih modifikacija proteina plazme u HSI su i rezultati o sniženim koncentracijama proteinskih tiol grupa u plazmi bolesnika sa HSI. Slično

smanjenje nivoa proteinskih tiol grupa u plazmi je pokazao Belch sa saradnicima¹⁴, a Yucel je 2002¹¹ pokazao smanjenje nivoa tiol grupa (SH grupa) membrana eritrocita u HSI nastaloj u bolesnika sa dilatativnom kardiomiopatijom (DCM). Poznato je da tiol grupe učestvuju kao žrtveni antioksidansi u prekidanju lančanih reakcija stvaranja radikala u plazmi.²⁰





Slika 4 i 5. Aktivnost glutation peroksidaze (A) i superoksid dizmutaze (B) u plazmi bolesnika sa hroničnom srčanom insuficijencijom **- $p < 0.01$, u odnosu na kontrolu; Δ - $p < 0.05$, u odnosu na asimptomatske bolesnika; #- $p < 0.05$ u odnosu na kontrolu

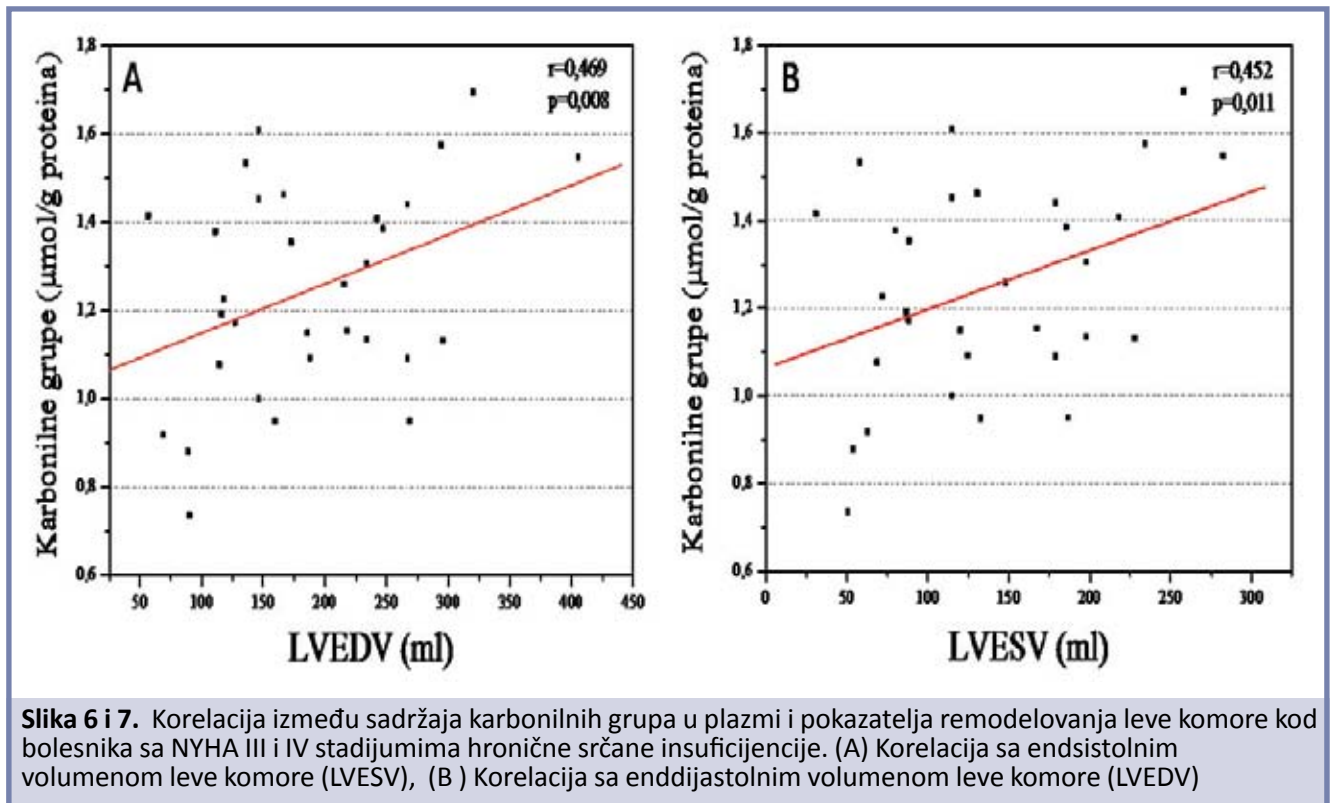
Istovremeno postojanje povećanog sadržaja proizvoda peroksidacije lipida i oksidativnih modifikacija pokazano u ovom radu je potvrdilo postojanje sistemskog oksidativnog stresa u HSI. Uprkos činjenici da se oksidativni stres definiše kao poremećaj ravnoteže između produkcije slobodnih radikala i antioksidantnog kapaciteta u literaturi ima veoma malo podataka o efikasnosti funkcionisanja različitih linija antioksidantne odbrane u HSI. Zato je u ovom istraživanju posebna pažnja posvećena proceni enzimskih mehanizama antioksidantne odbrane kod bolesnika sa HSI. Superoksid dizmutaza, kao integralna komponenta sinhronizovanog sistema enzimske antioksidantne odbrane, prevodi superoksid u vodonik peroksid i tako utiče i na koncentraciju ostalih slobodnih kiseoničnih radikala. Inaktivacijom superoksida u vodonik peroksid SOD sprečava reakciju ovog radikala sa NO i na taj način doprinosi očuvanju vazodilatacije zavisne od endotela.²¹ Interesantno je da je u ovom radu pokazana povećana aktivnost SOD u plazmi bolesnika sa HSI, što je donekle u suprotnosti sa do sada publikovanim rezultatima. Važno je napomenuti da je u ovom radu određivana samo frakcija solubilne SOD koja je otpuštena u plazmu, dok se najveći deo enzima nalazi vezan za glikoproteine membrane endotelne ćelije od kojih se može odvojiti samo infuzijom heparina. Moguće je da iako je otpuštanje SOD u plazmu povećano u HSI, ukupna količina enzima na raspolaganju ostaje značajno niža u HSI kao što su pokazali Landmassera i saradnici, koji su aktivnost SOD određivali u plazmi bolesnika tek nakon primene heparina. Rezultati određivanja aktivnosti glutation peroksidaze prikazani u ovom radu pokazuju smanjenje aktivnosti enzima kod bolesnika sa simptomatskom srčanom insuficijencijom.

Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima na animalnim modelima HSI gde je pokazano da smanjenje aktivnosti GSH-Px, koja uklanja H_2O_2 i sprečava nastajanje lipidnih peroksida in vivo, pojačava endotelnu disfunkciju koja je jedan od ključnih događaja hroničnoj srčanoj

insuficijenciji.²² Iz svega navedenog se može zaključiti da kompromitovana aktivnost antioksidantnih enzima svakako doprinosi nastanku oksidativnog stresa u HSI.

Iako je u ovom radu nedvosmisleno potvrđeno prisustvo oksidativnog stresa u HSI i njegovo postepeno pojačavanje sa progresijom HSI, za bolje sagledavanje uloge oksidativnog stresa u progresiji ishemijske HSI, u ovom radu je koreliran je nivo pokazatelja oksidativnog stresa sa ehokardiografskim indeksima remodelovanja miokarda. Rezultati (prikazani u ovom radu) su pokazali da oksidativne modifikacije proteina, pre svega povećanje sadržaja karbonilnih grupa, značajno koreliraju sa markerima remodelovanja leve komore. Što je oksidativno oštećenje proteina bilo veće, to su volumeni na kraju diastole i sistole bili veći.

Sveobuhvatna analiza pokazatelja oksidativnog oštećenja makromolekula i antioksidantne odbrane u plazmi bolesnika sa HSI nakon infarkta miokarda na relativno velikom uzorku bolesnika sugeriše da se poremećaj ravnoteže između produkcije i inaktivacije slobodnih radikala dešava već u ranim fazama HSI, na račun pojačanog stvaranja slobodnih radikala. Međutim, sa progresijom HSI pad glutation peroksidazne aktivnosti dodatno doprinosi pojačanju sistemskog oksidativnog stresa. Iako biohemijske alteracije u plazmi bolesnika sa HSI ne moraju da reflektuju poremećaj ravnoteže između oksidantata i antioksidantata na nivou miokarda, rezultati o korelaciji između povećanog sadržaja karbonilnih grupa i pokazatelja remodelovanja sugerišu značajnu ulogu koju oksidativno oštećenje proteina ima u strukturnim promenama miokarda u uznapredovalo HSI. U prilog ove pretpostavke govore i nedavni rezultati na eksperimentalnim modelima HSI u kojima se ističe da je subcelularno remodelovanje ćelijskih organela^{23, 24, 25} usled oksidativnih modifikacija proteina, mogući razlog tranzicije od kompenzatorne hipertrofije do dilatacije.²⁶



Zaključak

U hroničnoj srčanoj insuficijenciji postoje značajne oksidativne modifikacije molekula lipida i proteina koje su najizraženije kod bolesnika sa najtežim stepenom HSI. Pad glutation peroksidazne aktivnosti u plazmi bolesnika sa simptomatskom HSI daje važan doprinos postojanju sistemskog oksidativnog stresa. Oksidativne modifikacije molekula proteina mogu imati značajnu ulogu u procesu remodelovanja miokarda koje se smatra najznačajnijim procesom povezanim sa prognozom HSI.

Literatura

1. Sies H. Oxidative stress from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91:31-8.
2. Singal PK, Dhalla AK, Hill M, et al. Endogenous antioxidant changes in the myocardium in response to acute and chronic stress conditions. *Mol Cell Biochem* 1993;129:179-86.
3. Singal PK, Kapur N, Dhillon KS, et al. Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;60:1390-7.
4. Mehrabi MR, Ekmekcioglu C, Tatzber F et al. The isoprostane, 8-epi-PGF2 alpha, is accumulated in coronary arteries isolated from patients with coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 1999;43:492-9.
5. Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation
6. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran A, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1352-6.

Tabela 2. Korelacije pokazatelja oksidativnog stresa sa remodelovanjem miokarda leve komore kod SIMPTOMATSKIH bolesnika sa hroničnom srčanom insuficijencijom

	LVEDD (cm)	LVESD (cm)	LVEDV (ml)	LVESV (ml)
MDA(µmol/L)	r=0.138 p=0.408	r=0.285 p=0.083	r=0.133 p=0.476	r=0.141 p=0.449
RCD (µmol/g proteina)	r=0.057 p=0.733	r=0.052 p=0.757	r=0.469 p=0.008	r=0.452 p=0.011
P-SH (mmol/L)	r=-0.147 p=0.379	r=-0.134 p=0.424	r=0.133 p=0.476	r=0.137 p=0.463
GSH-Px (U/L)	r=0.052 p=0.756	r=0.016 p=0.924	r=0.066 p=0.724	r=-0.085 p=0.649
SOD (U/L)	r=-0.262 p=0.112	r=-0.161 p=0.335	r=-0.218 p=0.240	r=-0.256 p=0.144

MDA-malondialdehid; RCD-karbonske grupe; P-SH-tiol grupe; GSH-Px-glutation peroksidaza; SOD-superoksid dizmutaza; LVEDD-dimenzija leve komore na kraju dijastole; LVEDV-volumen leve komore na kraju dijastole; LVESD- dimenzija leve komore na kraju sistole; LVESV- volumen leve komore na kraju sistole.

7. McMurray J, Chopra M, Abdullah I, et al. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* 1993;14(11): 1493-8.
8. Dousset JC, Trouilh M, Foglietti MJ. Plasma malonaldehyde levels during myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1983;129:319-22,
9. DiazVelez CR, GarciaCastineiras S, MandozaRamos E, et al. Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1996;131(1):146-52.
10. Radovanovic S, Krotin M, Simic DV, Mimic-Oka J, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovic M, Matic M, Ninkovic N, Ivanovic B, Simic T. Markers of oxidative damage in chronic heart failure: Role in disease progression. *Redox Report* 2008;13(3):109-116.

11. Yucel D, Aydoqdu S, Senes M, Topkaya BC, Nebioqlu S. Evidence of increased oxidative stress by simple measurements in patients with dilated cardiomyopathy. *Scand J Clin Lab Invest*, 2002;62(6):463-8.
12. Mimić-Oka J, Simić T, Plješa M, Stupar N, Turković S. Oxidative modification of plasma proteins in different stages of chronic renal failure. *Facta Universitatis* 2001;8:1-5.
13. Simić DV, Mimić Oka J, Plješa- Ercegovic M, Savić-Radojević A, Opačić M, Matić D, Ivanović B, Simić T. Byproducts of oxidative protein damage and antioxidant enzyme activities in plasma of patients with different degrees of essential hypertension. *Journal of Human Hypertension* 2006;20:149-55.
14. Belch JF, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 1991;65:245-8.
15. Purcell IF, Poole-Wilson PA. Heart failure: why and how to define it? *Eur JHeart Fail* 1999;1:7-10.
16. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233:346-357.
17. Jocelyn PC. Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymol* 1987;143:44-67.
18. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-5.
19. Gunzler WA, Kremers H, Flohe L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974;12: 444-8.
20. Inagi R, Miyata T. Oxidative protein damage with carbohydrates and lipids in uremia." Carbonyl stress ". *Blood Purif* 1999;17(2-3):95-98.
21. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissue from nine mammalian species. *Biochem J* 1984;222:649-55.
22. de Lorgeril M, Salen P. Selenium and antioxidant defenses as major mediators in the development of chronic heart failure. *Heart Fail Rev* 2006;11(1):13-7.
23. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. *Circ J* 2008;72(Suppl A): A31-A37.
24. Masano T, Kawashima S, Toh R, Satomi-Kobayashi S, Shinohara M, Takaya T, et al. Beneficial effects of exogenous tetrahydrobiopterin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats: The possible role of oxidative stress caused by uncoupled endothelial nitric oxide synthase. *Circ J* 2008;72: 1512-9.
25. Daniels MC, Naya T, Rundell VL, de Tombe PP. Development of contractile dysfunction in rat heart failure; hierarchy of cellular events. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R284-R292.
26. Ding YF, Brower GL, Zhong Q, Murray D, Holland M, Janicki JS, et al. Defective intracellular Ca²⁺ homeostasis contributes to myocyte dysfunction during ventricular remodeling induced by chronic volume overload in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:827-35.

Abstract

Indicators of oxidative stress and plasma antioxidative enzyme activity in patients with different stages of heart failure

Slavica Radovanović¹, Tatjana Đukić^{2,4}, Sonja Suvakov^{2,4}, Mirjana Krotin^{1,4}, Dragan V. Simić^{3,4}, Ana Savić-Radojević^{2,4}, Marija Plješa-Ercegovic^{2,4}, Aleksandra Đoković¹, Marija Matić^{2,4}, Natasa Janković^{2,4}, Tatjana Simić^{2,4}

¹Cardiology Department, KBC Bežanijska Kosa, Belgrade, Serbia

²Institute for medical and clinical biochemistry, Belgrade, Serbia

³Cardiology Clinic, Clinical center of Serbia, Belgrade, Serbia

⁴University of Belgrade, Medical School, Belgrade, Serbia

Background: During the last decade, considerable interest has been focused on the potential role of enhanced free radical generation in the development and progression of chronic heart failure (CHF), which belongs to the large group of oxidative diseases.

Aim: In this translational study we addressed the significance of markers of oxidative lipid or protein damage and antioxidant enzyme activities in the development of left ventricle remodeling in chronic heart failure (CHF) following myocardial infarction. We tried to establish a link between oxidative stress markers and the degree of chronic heart failure.

Patients and methods: A 120 consecutive patients with varying CHF according to New York Heart Association classification (NYHA) and 69 controls were enrolled in this study. Malondialdehyde (MDA), protein thiol (P-SH) and reactive carbonyl groups (RCD), together with glutathione peroxidase (GSHPx) and superoxide dismutase (SOD) activities were determined spectrophotometrically and/or by ELISA methods and correlated with echocardiographic indices of remodeling (LVEDD, LVESD, LVEDV i LVESV).

Results: Patients with severe CHF (NYHA III/IV) exhibited elevated MDA and RCD levels and decreased P-SH groups when compared to asymptomatic patients (NYHA I/II) or controls. Oxidative stress in severe patients was associated with significant fall in plasma GSHPx activity. Regarding remodeling, the main effects, observed in severe disease, were significant correlations between RCD and remodeling indices.

Conclusions: Gradual increase in lipid peroxidation an oxidative damage of proteins, together with the down-regulated antioxidant enzymes in severe disease, additionally increased the systemic oxidative stress. This finding plays an important role in the development of remodeling in chronic heart failure, which leads to the further deterioration of left ventricular structure.