

VARIATIA MARKERILOR DE STRES OXIDATIV IN AVC ISCHEMIC PE SUBTIPURI DE AVC

VARIATION OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN ISCHEMIC STROKE – COMPARATION BETWEEN STROKE SUBTYPES

As.univ.dr lucr. *Ioana Varga*¹, Prof. univ. dr. *Minea Dan Ioan*¹, dr. *Iulian Ionescu*²

¹Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania Braşov, Spitalul de Neuropsihiatrie – Braşov

²Spitalul de Recuperare Cardiovasculară "Dr. Benedek Geza" Covasna

Abstract:

Objective: to analyze variance between lacunar and territorial stroke subtypes for levels of some oxidative stress markers.

Patients and methods: prospective study done on a group of 55 patients with acute ischemic stroke, comparing with a control lot of 19 healthy subjects. We assessed markers of oxidative stress - albumin, uric acid, copper, TAS (Total Antioxidant Status) - initial and 2 months after the onset of stroke, and try to find if there is any correlation between them or with the neurologic deficit.

Results and conclusions: For the whole lot, levels of TAS and albumin were initial significant lower than in controls and 2 months after the stroke, higher than initial, but still lower than in controls. Levels of albumin, uric acid and TAS were no significant lower in patients with territorial infarcts. From the individual oxidative stress markers, only albumin correlated significantly with TAS at both determinations.

Key-words: oxidative stress, markers, stroke

Este pe deplin demonstrat că infarctul cerebral inițiază o cascadă de evenimente metabolice complexe în țesutul imediat adiacent, iar distrugerea oxidativă mediată prin radicali liberi joacă un rol-cheie în patogenia ischemiei cerebrale. Radicalii liberi sunt eliberați de o varietate de surse, incluzând celulele inflamatorii, mitocondrii disfuncționale și prin mecanisme excitotoxice stimulate de creșterea concentrațiilor glutamatului și a aspartatului. Radicalii hidroxil (formați din peroxidul de hidrogen), peroxinitrit și superoxid reprezintă radicali puternici ce pot cauza peroxidarea lipidelor, o reacție în lanț autopropagată, care distruge ireversibil membranele celulare și mitocondriale. În AVC acut, concentrațiile in vivo ale produșilor de peroxidare lipidică sunt semnificativ crescute, datorită activității excesive a radicalilor liberi. Evaluarea statusului oxidativ în AVC acut se poate face fie prin măsurarea directă a produșilor de peroxidare lipidică sau a hidroperoxidilor colesteril ester (CEOOH), care reprezintă markeri sensibili și specifici de peroxidare lipidică, ce s-a dovedit că se corelează pozitiv cu mărimea infarctului calculată prin examen CT și cu gradul de severitate al

deficitului neurologic evaluat prin scorul NIHSS, fie indirect prin măsurarea antioxidantilor individuali (albumina, acidul uric, bilirubina, tiolii proteici sau vitaminele C și E) sau mai concludent prin măsurarea statusului antioxidant total, care reprezintă o măsură cumulativă a cât pot antioxidanții prezenți în organism să protejeze împotriva distrugerii oxidative [7, 17].

În studiul de față ne-am propus să evidențiem variația și corelația câtorva dintre acești markeri de stres oxidativ la pacienții cu AVC ischemic, diferențiat, în cadrul celor 2 subtipurii de stroke lacunar și teritorial.

Material și metodă

Am realizat un studiu prospectiv care a inclus un număr de 55 pacienți cu AVC ischemic acut și 19 subiecți care au format lotul control – indivizi cunoscuți fără afecțiuni medicale sau chirurgicale majore în ultimii 5 ani și care desfășurau o viață activă independentă. Am exclus din studiu pacienții care au prezentat situații sau alte afecțiuni ce ar fi putut influența statusul oxidativ cum sunt: infecții recente, boli inflamatorii de orice tip, istoric de gută,

neoplazii, insuficiență renală, hepatită sau de alte boli neurodegenerative, consumul anterior de medicamente, vitamine sau suplimente nutritive cu efecte antioxidante. Toți pacienții au fost evaluați din punct de vedere neurologic cu ajutorul scorului NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) atât inițial cât și la 2 luni după AVC. Examenul CT cerebral s-a efectuat în primele 24 de ore de la internare pentru a exclude AVC hemoragic.

Examele de laborator s-au efectuat la două momente: primul (T0) – în primele 72 ore după debutul stroke-ului și al doilea (T1) – la 2 luni după. S-a operat pe probe serice sau plasmă heparinizat (Heparinat de Li). Probele au fost libere de hemoliză. Proba poate fi stocată până la 36 de ore la +2 - +8 °C. Plasma/serul se pastrează la (-)20 – (-)50 °C timp de 14 zile.

Testele au fost efectuate pe un spectrofotometru Jasco V-530 (Jasco Corporation Tokio-Japonia), asistat de un program dedicat de validare, cuve de unică folosință, (Hellma GmbH & Co.KG Mulheim-Germania) certificate. Determinările s-au efectuat la 600 nm., 37°C, drum optic 1 cm. Reactivii utilizați au fost furnizați de firma Randox Laboratories Ltd.U.K., Standard TAS Lot.no. 224NX, concentrație 1.87 mmol/L, Control TAS seric uman, Lot 228NX, valoare țintă 1.88 mmol/l, domeniu de definiție 1.50-2.26 mmol/L. Antioxidanții prezenți în serul adăugat au determinat supresia producerii acestei culori proporțional cu concentrațiile lor. Acidul uric, cupru și albumina au fost analizate cu un analizor automat Hitachi 717 Boehringer Mannheim utilizând reactivi Futura System (Italy).

Prelucrarea statistică s-a realizat cu ajutorul programului STATISTICA Six Sigma version 8.0.

În funcție de simptomatologia clinică pacienții au fost împărțiți în 2 subloturi, luând în considerare criteriile clinice și imagistice: pacienți cu infarcte lacunare - cu afectare de vas mic și pacienți cu infarcte non – lacunare (teritoriale) – cu afectare de vas mare. Din totalul de 55 de pacienți incluși în studiu, 40 au fost cu infarcte teritoriale iar 15 cu infarcte lacunare.

Rezultate

Pentru întreg lotul de pacienți luați în studiu, am obținut inițial valori semnificativ mai

scăzute pentru albumină și TAS și mai mari pentru acid uric față de lotul martor.

Pacienții cu infarcte lacunare au prezentat, cum era de așteptat, valori semnificativ statisic mai mici ale scorului NIHSS comparativ cu cei cu infarcte teritoriale ($p < 0.001$).

Lotul cu infarcte teritoriale a prezentat valori medii mai mici ale albuminei comparativ cu cele lacunare, fără a atinge pragul semnificației statistice, la ambele determinări.

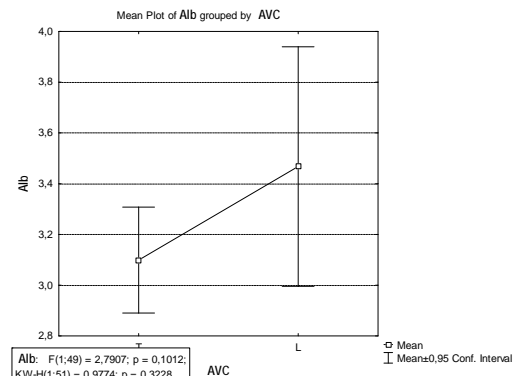


Fig. 1. Valorile albuminei lot T vs. L la T0

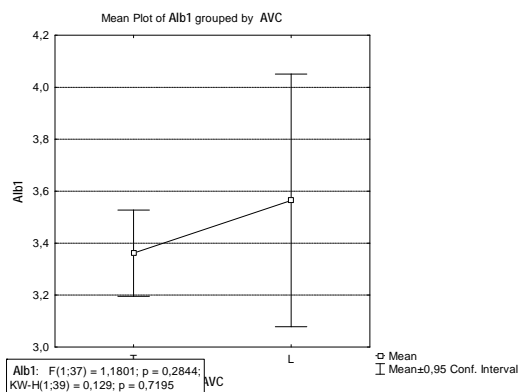


Fig. 2. Valorile albuminei lot T vs. L la T1

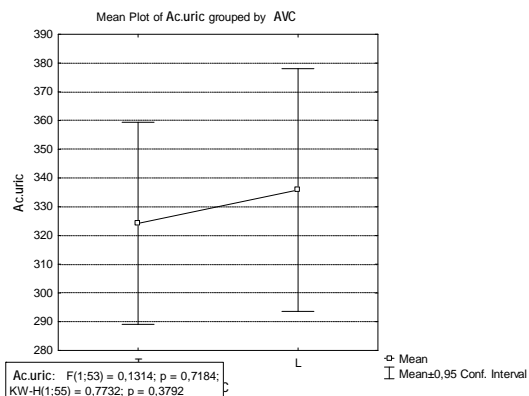


Fig. 3. Valorile acid uric lot T vs. L la T0

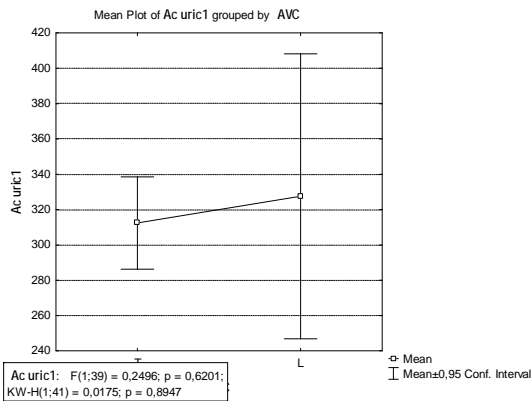


Fig.4. Valorile acid uric lot T vs. L la T1

Acidul uric a avut, de asemenea, valori ne semnificativ mai scăzute la pacienții cu infarcte mari, teritoriale față de cei cu infarcte lacunare la T0 și T1 iar cuprul valori aproximativ egale în cele două loturi la ambele determinări.

La cea de-a doua determinare, valorile albuminei și TAS pentru întreg lotul de pacienți cu AVC au fost mai mari comparativ cu cele determinate imediat după ictus, dar încă semnificativ mai mici decât cele ale lotului martor.

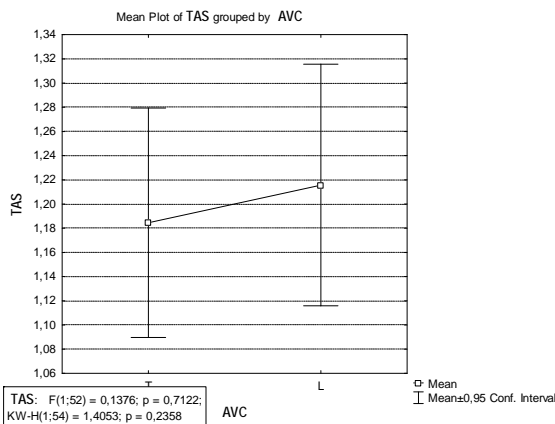


Fig. 5. Valorile TAS lot T vs. L la T0

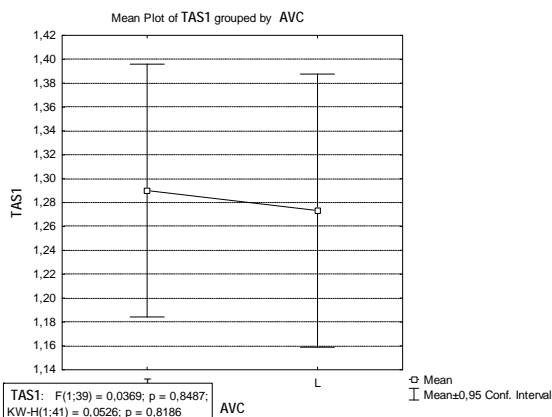


Fig. 6. Valorile TAS lot T vs. L la T1

În concordanță cu evoluția markerilor de stres oxidativ individuali, statusul antioxidant total (TAS) prezintă, inițial, valori mai scăzute (fără semnificație statistică) în lotul teritorial comparativ cu cel lacunar. În schimb, la două luni remarcăm o inversare a mediilor cu valori mai mici la lotul cu infarcte lacunare.

În continuare, am urmărit dacă cele două loturi se diferențiază în ceea ce privește corelația între statusul antioxidant total (TAS) și scorul NIHSS, respectiv între TAS și markerii individuali de stres oxidativ (albumina, acid uric, cupru).

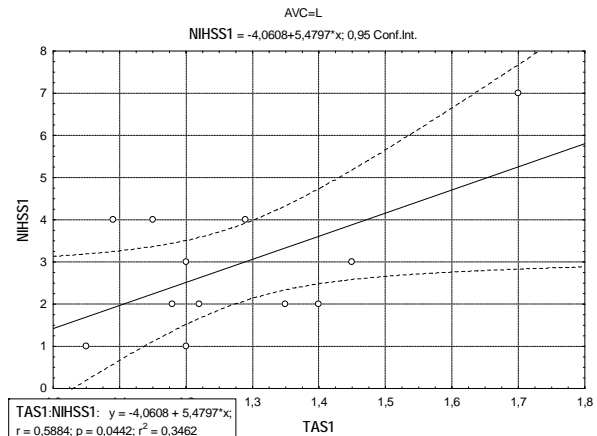


Fig. 7. Corelația NIHSS – TAS la lotul L la 2 luni

Inițial, nu a existat vreo corelație între TAS și statusul neurologic cuantificat prin scorul NIHSS la nici unul dintre cele două subploturi: teritorial sau lacunar. În schimb, la 2 luni după AVC remarcăm o corelație semnificativă statistic între TAS și NIHSS ($r^2=0,3462$) la lotul de pacienți cu infarcte lacunare.

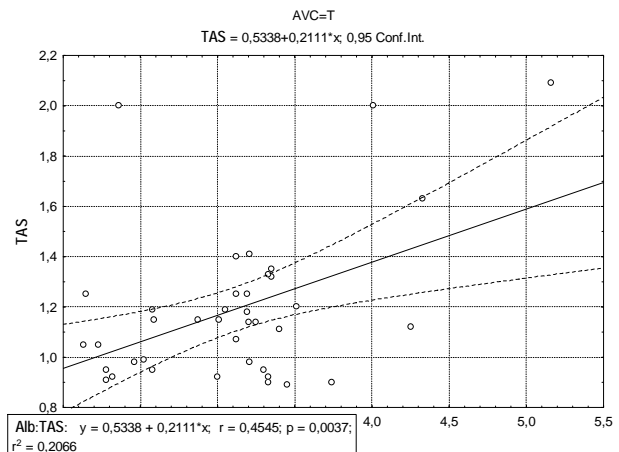


Fig. 8. Corelația TAS – albumină inițial pentru lotul T

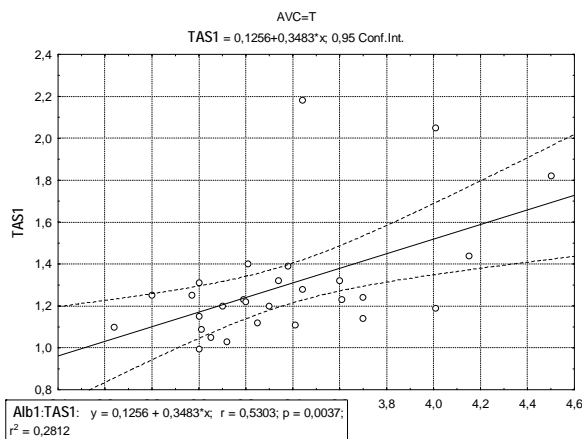


Fig. 9. Corelația TAS – albumină la 2 luni pentru lotul T

Corelația între albumină și statusul antioxidant total (TAS) a fost semnificativ mai evidentă la pacienții cu infarcte teritoriale comparativ cu cei cu infarcte lacunare inițial și la două luni după ictus. În ce privește valorile serice ale acidului uric acestea au corelat, fără semnificație statistică, cu valorile TAS, mai evident la lotul teritorial comparativ cu cel lacunar iar cuprul nu a corelat cu TAS la nici unul din cele două subploturi la nici una dintre cele două determinări.

Discuții

În acest studiu am obținut nivele semnificativ scăzute, comparativ cu lotul martor, ale albuminei și TAS la pacienții cu AVC ischemic imediat după debutul infarctului, rezultate similare și cu ale altor studii [7, 15]. Astfel, Garibala și Shikrishna au obținut, de asemenea, valori serice mai mici ale TAS [7, 14] iar Yildirim a demonstrat scăderea valorilor TAC (Capacității Antioxidante Totale) în ser și LCR, în primele 48 ore după debutul ictusului [18].

În ceea ce privește nivelele serice ale albuminei, Dziedzic, într-un studiu pe 705 pacienți cu AVC ischemic pune în evidență valori scăzute ale albuminei la 45,5% din pacienți [6]. În acest sens și noi am observat la pacienții luați în studiu valori scăzute inițial ale albuminei la un număr, chiar mai mare, de 41 de pacienți reprezentând 74,5% din total. Într-un alt studiu Abboud împreună cu Amarengo evidențiază nivele mai ridicate ale albuminei în primele 6 ore la cei cu infarcte cerebrale față de cei cu AIT și remarcă o scădere a valorilor

acesteia în primele 24 de ore. Această observație este în concordanță cu rezultatele obținute de noi, care am obținut nivele mai scăzute ale albuminei, întrucât recoltarea probelor s-a făcut la majoritatea pacienților după primele 6 ore, până la 72 ore de la debutul stroke-ului [1].

Nivelele serice mai scăzute ale markerilor de stres oxidativ (individuali și total) în infarctele mari, teritoriale – chiar dacă nu ating pragul semnificației statistice – apar, mai probabil, printr-un consum mai mare de antioxidanți la locul țesutului infarctat imediat după debutul ictusului, proporțional cu volumul infarctului. Am observat că la două luni, valorile tuturor markerilor oxidativ (cu semnificație statistică pentru albumină și TAS) sunt încă mai mici ca și valorile obținute pentru acești markeri la lotul de control, ceea ce sugerează că modificarea statusului oxidant după producerea AVC ischemic este una de lungă durată, dar cu tendință la revenire către valorile de bază, în timp. Chiar dacă valorile celorlalți markeri antioxidanți individuali și-au menținut distribuția între cele 2 subtipuri de AVC, cu valori mai mici ale acestora la lotul teritorial, este interesant faptul că, totuși, statusul antioxidant total tinde să fie mai scăzut (fără semnificație statistică) la infarctele lacunare, la două luni după ictus.

Există puține studii în care să se facă diferențierea variației markerilor de stres oxidativ între subtipurile de AVC ischemic.

În concordanță cu rezultatele obținute de noi, Srikrishna într-un studiu, efectuat pe un lot de 73 pacienți cu AVC ischemic subîmpărțiți, conform imaginii CT cerebral, în două loturi: pacienți cu infarcte de vas mare (corticale și subcorticale) și de vas mic (lacunare), evidențiază valori cu semnificație statistică mai crescute ale acidului uric și mai mici ale nivelelor serice ale vitaminei E, C și SOD, la cei cu infarcte de vas mare față de cei cu infarcte lacunare [14]. Ullegaddi menționează, de asemenea, o corelație semnificativă între valoarea serică a capacității antioxidante totale, în ziua a șaptea după producerea ictusului și subtipul de AVC [15]. Un studiu mai recent al lui Alvarez, găsește valori semnificativ mai mici ale albuminei și mai mari ale D-dimerilor la cei cu infarcte cardioembolice și mortalitatea corelată cu valorile mai scăzute ale albuminei, cu

etiologia cardioembolică și scorul NIHSS mai mare [3].

În schimb, Guldiken nu găsește nici o diferență între nivelele serice ale capacității antioxidante totale (TAC) la pacienții cu infarcte lacunare sau teritoriale între pacienții diabetici și nondiabetici [8].

În studiul nostru nu am obținut o corelație între statusul antioxidant total și deficitul neurologic cuantificat prin scorul NIHSS imediat la debut, ci doar la pacienții cu infarcte lacunare la 2 luni după AVC. Leinonen, Alexandrova și Polidori decelează o corelație între activitatea antioxidantă totală măsurată prin TRAP, TBRAM (thiobarbituric acid-reactive material) și respectiv prin hidroperoxizii lipidici și scorul NIHSS, iar mai recent, Nanetti și col. găsesc, de asemenea, o corelație semnificativ negativă între TAC și scorul NIHSS imediat și la o lună după apariția AVC ischemic [2, 9, 10, 11, 12]. În schimb, Yldirim ca și noi într-un studiu anterior, pe un lot mai mic de 27 pacienți, nu a decelat o corelație între valoarea TAS și scorul NIHSS [16, 18]. Pentru albumină, atât Dziedzic, cât și Abboud menționează o corelare a valorilor acesteia cu scorul NIHSS de la internare [1, 6].

Corelația între TAS și markerii individuali, a fost mai evidentă la infarctele teritoriale, probabil, prin faptul că nivelele serice ale acestor markeri fiind proporționale cu volumul infarctului, a fost posibilă o diferențiere mai fină a acestor valori în cazul infarctelor mai mari. Remarcăm albumina ca și un marker antioxidant mai sensibil, dar care totodată și persistă ca modificare pe durată îndelungată și care prezintă cea mai evidentă corelație cu TAS între toți markerii de stres oxidativ individuali luați în studiu. Albumina reprezintă o proteină unică serică multifuncțională cu efecte antioxidante, antiinflamatoare și neuroprotectoare dovedite [13]. Astfel, aceasta deține un rol antioxidant major în defensiva împotriva agenților oxidanți, reprezentând o capcană pentru radicalii plasmatici ai oxigenului (SRO) și întârziind formarea speciilor înalt reactive de radicali hidroxil. Efectul neuroprotector al albuminei umane în stroke-ul ischemic acut se explică și prin antagonizarea stagnării, a trombozei, a adeziunii leucocitare la nivelul microcirculației capilare în faza precoce de reperfuzie [5]. Studii clinice recente au dovedit efectele terapeutice

benefice ale acesteia atât prin îmbunătățirea statusului neurologic cât și prin scăderea volumului infarctului și a edemului cerebral la pacienții cu AVC ischemic acut [10].

În concluzie putem aprecia că, chiar dacă nu au atins pragul semnificației statistice, nivelele serice ale celor mai reprezentativi markeri de stres oxidativ individuali (albumina, acidul uric) și total (TAS) au fost mai mici la lotul de pacienți cu infarcte teritoriale și că această diferențiere s-a menținut până la 2 luni după producerea AVC, iar dintre markerii individuali doar albumina a corelat semnificativ cu valorile TAS la ambele determinări.

Aceste rezultate vin să susțină în plus rolul stresului oxidativ în medierea distrugerii țesutului cerebral în AVC ischemic și faptul că organismul uman încearcă o reechilibrare a acestei situații în fază acută, prin consumul de antioxidanți pentru neutralizarea radicalilor liberi la locul ischemiei, consum care este diferențiat în cadrul celor 2 subtipuri de infarcte teritorial și lacunar, și deci proporțional cu volumul AVC. Studii pe un număr mai mare de pacienți sunt necesare pentru a întări aceste observații prin și pentru a putea obține prin exploatarea lor o strategie de abordare terapeutică promptă eficientă și, eventual diferențiată la acești pacienți.

Bibliografie

- [1] Abboud H., Labreuche J., Meseguer E., Lavalley P.C., Simon O., Olivot J.M., Mazighi M., Dehoux M., Benessiano J., Steg P.G., Amarenco P. - Ischemia-Modified Albumin in Acute Stroke, *Cerebrovasc Dis.* 2006 Dec 1; 23 (2-3): 216-220.
- [2] Alexandrova M., Bochev P., Markova V. et al - Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome, *J. Clin. Neurosci.* 2004;11:501-506.
- [3] Alvarez-Perez F.J., Castelo-Branco M., Alvarez-Sabin J. - Albumin Level and Stroke. Potential Association Between Lower Albumin Level and Cardioembolic Aetiology, *International Journal of Neuroscience* 2010 Dec; 121, (1): 25-32(8).

- [4] Cho Y.M., Choi I.S., Bian R.X. et al - Serum albumin at admission for prediction of functional outcome in ischaemic stroke patients *Neurol Sci* (2008) 29: 445–449
- [5] Dziedzic T., Slowik A., Szczudlik A. - Serum Albumin Level as a Predictor of Ischemic Stroke Outcome, *Stroke*. 2004; 35: e156-e158.
- [6] Dziedzic T., Pera J., Slowik A., Gryz-Kurek E.A., Szczudlik A. – Hypoalbuminemia in acute ischemic stroke patients: frequency and correlates, *Eur J Clin Nutr*. 2007, Nov; 61 (11): 1318-22.
- [7] Gariballa S.E., Hutchin T.P. – Antioxidant capacity after acute ischemic stroke, *Q J Med*, 2002; 95: 685–690.
- [8] Guldiken B., Demir M., Guldiken S. - Oxidative Stress and Total Antioxidant Capacity in Diabetic and Nondiabetic Acute Ischemic Stroke Patients, *Clin Appl Thromb Hemost* December 2009; 15(6): 695-700.
- [9] Leinonen J.S., Ahonen J.-P., Lönnrot K. et al - Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke, *Stroke* 2000; 31: 33-39.
- [10] Myron D. Ginsberg, Yuko Y. Palese, et al - The Albumin in Acute Stroke (ALIAS) Multicenter Clinical Trial, Safety Analysis of Part 1 and Rationale and Design of Part 2, *Stroke*. 2011; 42: 119-127.
- [11] Nanetti L., Raffaelli F., Vignini A., Perozzi C. et al Oxidative stress in ischaemic stroke. *European Journal of Clinical Investigation*. 2011 Dec; 41 (12): 1318-22.
- [12] Polidori M.C., Frei B., Cherubini A. et al - Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke, *Free Radic Biol Med*. 1998; 25: 561–567.
- [13] Prajapati K.D., Sharma S.S., Roy N. - Current perspectives on potential role of albumin in neuroprotection. *Rev Neurosci*. 2011; 22(3): 355–363.
- [14] Srikrishna R., Suresh D.R. – Biochemical Study of Antioxidant Profile in Acute Ischemic Stroke, *BJMP* 2009; Vol.2 (1): 35-37.
- [15] Ullegaddi R., Powers H.J. and Gariballa S.E. - Antioxidant supplementation enhances antioxidant capacity and mitigates oxidative damage following acute ischaemic stroke, *European Journal of Clinical Nutrition* 2005; 59: 1367–1373.
- [16] Varga I., Pascu I., Ionescu I. - Evaluation of oxidative stress by TAS (Total Antioxidant Status) in patients with acute ischemic stroke, In: *European Journal of Neurology* 2010 Sept.;17 (Suppl. 3): 445.
- [17] Waring W.S. - Uric acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke, *Q J Med*, 2002; 95:691–693.
- [18] Yldirim A., Kotan D. et al - Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant response in serum and cerebrospinal fluid in acute ischemic stroke, *Turk J. Med. Sci*. 2007;37(2):75-81.