

3. The INDIANA (Individual Data Analysis of Antihypertensive intervention trials) Project Collaborators (1997) Effect of antihypertensive treatment in patients having already suffered from stroke: gathering the evidence. *Stroke* 28: 2557–2562
4. Tuomilehto J, Rastenyte D (1999) Diabetes and glucose intolerance as risk factors for stroke. *J Cardiovasc Risk* 6: 241–249
5. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB, Levy D (2001) Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 345: 1291–1297
6. Viscoli CM, Brass LM, Kernan WN, Sarrel PM, Suissa S, Horwitz RI (2001) A clinical trial of replacement-replacement Therapy after ischemic stroke. *N Engl J Med* 345: 1243–1249
7. Walker SP, Rimm EB, Ascherio A, et al. (1996) Body size and fat distribution as predictors of stroke among US men. *Am J Epidemiol* 144: 1143–1150
8. Wannamethee SG, Shaper AG, Ebrahim S (2000) HDL Cholesterol, total cholesterol, and the risk of stroke in middle-aged British men. *Stroke* 31: 1882–1888
9. West of Scotland Coronary Prevention Study Group (1998) Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation*
10. World Health Organization (1996) Ischaemic stroke and combined oral contraceptives: results of an international, multicentre, case-control study: WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet* 348: 498–505

## **STRESUL OXIDATIV LA PACIENȚII CU ACCIDENT VASCULAR CEREBRAL ISCHEMIC ȘI HIPERGLICEMIE**

**Viorel Grigor**

Laboratorul Neurobiologie și Genetică Medicală , USMF „Nicolae Testemițanu”

### **Summary**

#### **Oxidativ stress in patients with ischaemic stroke and hyperglycemia**

Cerebral ischemia and reperfusion are accompanied of making active components of oxygen, which increase the oxidative stress. High blood level of glucose is a risk factor which decrease the activity of antioxidative system and increases the potential of the free radicals. In this study, there are presented the results of an analyze of 3 groups of patients with stroke, hospitalized in the first six hours from the start of the stroke, depending of the blood level of glucose by that time and its continuous screening and modulation .

Has been observed in the group of patients with both stroke and high glicemic level the oxidative stress is greater but the treatment with insulin lead to a decrease of the oxidative stress.

### **Rezumat**

Ischemia și reperfuzia cerebrală sunt însoțite de formarea compușilor activi ai oxigenului, ce amplifică stresul oxidativ. La rândul său, hiperglicemia este un factor ce diminuează activitatea sistemului de antioxidare și crește potențialul de formare a radicalilor liberi. În lucrare sunt prezentate datele de analiză a trei grupe de pacienți cu AVC ischemic, internați în primele 6 ore de la debut, în dependență de nivelul glicemic la spitalizare și modularea glicemiei în continuare. S-a evidențiat că în lotul pacienților cu AVC și hiperglicemie stresul oxidativ este mai marcat, iar tratamentul cu insulină al pacienților a dus la o diminuare evidentă a stresului oxidativ.

### **Actualitatea temei**

Ischemia cerebrală completă sau incompletă se manifestă prin afectarea tuturor funcțiilor circulației locale și anume: aportul de oxigen, aportul de substanțe plastice – substrat al oxidării

și îndepărtarea produselor de metabolism din focarul de ischemie. Afectarea acestor procese rezultă în lezarea funcțională și structurală a celulei, inclusiv moarte celulară [8].

Important este că restabilirea circulației după o ischemie severă – reperfuzia, determină leziuni secundare, afectarea de reperfuzie, ceea ce amplifică schimbările ischemice și deseori le implică un caracter ireversibil [5]. Activarea oxidării peroxidice a lipidelor joacă un rol decisiv în leziunile ischemice și postreperfuzie. În stresul oxidativ contează nu atât conținutul absolut de oxigen, cât raportul formelor active de oxigen către sistemul de antioxidare. Chiar în condiții de ischemie totală, un timp îndelungat se păstrează mici cantități de oxigen (2-5 mmHg timp de 1,5-2 ore, până la 6 ore), prin eliberare din HbO<sub>2</sub> [7].

În țesuturile ischemizate și reperfuzate se formează compuși activi ai oxigenului, care în mod normal sunt lichidați prin intermediul sistemului de antioxidare [8].

Sistemul de antioxidare include componenta intracelulară, componenta extracelulară, fermentativă și nefermentativă. Sistema fermentativă intracelulară este constituită din superoxidismutaza, catalaza, glutationperoxidaza. Factorii intracelulari nefermentativi sunt: a-tocopherol, acidul ascorbinic, b-carotin, glutation, care interacționează cu formele active de oxigen formînd compuși mai puțin activi. Sistema extracelulară constă din: ceruloplasmin-transferin, albumin, haptoglobin, acidul uric [4].

Sistemul nervos central este foarte sensibil la stresul oxidativ datorită particularităților sale: o concentrație înaltă de fosfolipide, acizi grași polinesaturați, Fe<sup>2+</sup>, o cantitate scăzută de vitamina A, activitate scăzută a glutationperoxidazei și insuficiență aproape completă a catalazei și ceruloplasminei și un consum sporit de oxigen [7].

Încercînd a găsi un mecanism de bază ce ar unifica diversele efecte ale hiperglicemiei acute, s-a ajuns la concluzia că acest mecanism ar putea fi stresul oxidativ [1, 2, 3, 6].

Hiperglicemia majorează cantitatea de radicali liberi și scade capacitatea antioxidantă. Hiperglicemia acută experimentală la nivele obișnuit înfîlnite la pacienții spitalizați, induce generarea radicalilor liberi. Celulele endoteliale expuse hiperglicemiei in vitro trec de la sinteza oxidului nitric la sinteza anionului superoxid [9, 10, 11]. Prin afectarea tisulară directă sau prin intermediul mediatorilor secundari, hiperglicemia induce stresul oxidativ [8, 10].

Odată cu creșterea nivelului glicemiei, crește și pericolul glucotoxicității prin stimularea generării radicalilor oxidativi ca rezultat al glicolizei și fosforilării oxidative. Glucoza intracelulară se metabolizează prin glicoliză cu formarea de piruvat, ce se transformă în acetil-CoA, care în prezența O<sub>2</sub> generează ATP pe calea fosforilării oxidative. Pe parcursul generării ATP se formează concomitent și o cantitate mică de superoxid. În mod normal, 2 – 5 % din O<sub>2</sub> se utilizează pentru generarea ionului superoxid, care este neutralizat de superoxid dismutaza [6].

În cazul cînd în celulă trece mai multă glucoză, mai mult piruvat urmează calea fosforilării oxidative și respectiv mai mult superoxid se va forma. Superoxidul interacționînd cu NO formează peroxinitritul, care agravează toxicitatea glucozei asupra celulei.

Alte mecanisme de implicare a glucozei în stresul oxidativ sunt: comutarea metabolismului glucidic de la calea aerobă la calea anaerobă, creșterea producției intracelulare de acid lactic, scăderea pH-ului intracelular, epuizarea stocului energetic de fosfați, creșterea concentrației neurotransmițătorilor excitatori, deschiderea canalelor de calciu, influxul intracelular al calciului, activarea fosfolipazelor membranare, eliberarea acizilor grași cu generarea de substanțe rapid oxidabile (SRO) cu potențial citotoxic [6].

Repercusiunile patologice ale tulburării secreției de NO sunt legate de creșterea sau micșorarea sintezei lui. Limitarea producției endoteliale de NO, asociată cu inactivarea lui exagerată, reprezintă expresia incipientă a disfuncției endotelului, constatată ca regulă în afecțiunile aterosclerotice, diabetice, hipertensive, stresul oxidativ, precum și în hipercolesterolemie [10, 11].

Majoritatea factorilor de antioxidare se conțin nu în substanța cerebrală dar în sânge [8].

În cazul unei ischemii prelungite și severe are loc o afectare ireversibilă a neuronilor: necroza și apoptoza. După reperfuzie se observă o intensificare a morții neuronale. Moarte celulară este rezultatul câtorva mecanisme:

1. creșterea intracelulară a  $Ca^{2+}$ ,
2. edemul de origine vasculară, amplificat de:
3. acidoza lactică,
4. activarea sistemului de oxidare [8].

Formarea radicalilor liberi și altor forme de oxigen activ, în țesutul cerebral în cazul ischemiei, amplifică degradarea structurilor fosfolipidice ale membranelor neuronale (activarea fosfolipazei A2) cu eliberarea acizilor grași, inclusiv polinesaturați, care reprezintă substratul oxidării peroxidice a lipidelor [5]. Eliberarea intensă a acizilor grași nesaturați (în primul rând acidul arahidonic) determină creșterea în cascadă a formelor active de oxigen în procesul de oxidare peroxidică a lipidelor și inhibarea respirației mitocondriale [8].

### Material și metode

Pentru examinarea dereglărilor proceselor de oxidare și antioxidare, în dependență de nivelul glicemic, s-a studiat un lot de 46 pacienți cu AVC ischemic, internați în primele 6 ore de la debut, repartizați în 3 grupe:

Lotul I – 14 pacienți cu un nivel glicemic sporit ( $>6.1$  mmol/l și  $<11.1$  mmol/l) cu tratament convențional.

Lotul II – 16 pacienții cu un nivel glicemic sporit ( $>6.1$  mmol/l și  $<11.1$  mmol/l) și tratament intensiv cu insulină.

Lotul III – 16 pacienți cu un nivel glicemic normal și tratament convențional.

Pacienții au fost examinați clinic și paraclinic, inclusiv tomografie computerizată a creierului. Au primit tratament conform protocoalelor medicale în vigoare, iar la lotul II s-a mai administrat insulină în perfuzie pentru menținerea glicemiei în limitele 4,0 – 6,1 mmol/l pe parcursul primelor 24 ore de la spitalizare.

S-a colectat sânge venos pentru evaluarea sistemului de oxidare și antioxidare. În primele 6 ore de la debutul maladiei și a 7-a zi. S-a apreciat în serul plasmatic: aldehida malonică, hidroperoxizii timpurii, hidroperoxizii intermediari, hidroperoxizii tardivi, activitatea oxidantă totală și activitatea antioxidantă totală; de asemenea, oxidul de azot și histidinele serinice.

Aprecierea indicilor stresului oxidativ s-a efectuat în cadrul Laboratorului Central de Biochimie sub conducerea profesorului universitar V. Gudumac.

Determinarea valorilor s-a efectuat cu ajutorul fotospectrometrului 46 (SF-46) și cu analizatorul biochimic „FP-901”.

### Rezultate

Observăm la toți pacienții studiați, că nivelele hidroperoxizilor, aldehida malonică și activitatea oxidantă totală sunt mai crescute față de normă, cu o exprimare mai accentuată în lotul 1 și 2. Astfel, observăm că la pacienții cu un nivel glicemic sporit sistemul de oxidare are o activitate crescută comparativ cu pacienții cu normoglicemie. Activitatea antioxidantă totală este mult sub limită la spitalizare, inclusiv și la pacienții normoglicemici, cu o tendință spre normalizare la a 7-a zi în loturile 2 și 3. În tabelele 1, 2 și 3 sunt reprezentate valorile stresului oxidativ și dinamica sa la a 7-a zi la pacienții loturilor I, II și III.

*Tabelul 1*

**Evoluția stresului oxidativ la pacienții din lotul I**

|                      | 1 zi           | 7 zi          | P      | Modificare (%) |
|----------------------|----------------|---------------|--------|----------------|
| MDA                  | 11,36 ± 2,08   | 9,81 ± 2,42   | <0,001 | -13,64         |
| HPL timp             | 0,36 ± 0,19    | 0,29 ± 0,17   | <0,001 | -20,03         |
| HPL inter            | 0,32 ± 0,2     | 0,27 ± 0,15   | >0,05  | -15,31         |
| HPL tard             | 0,22 ± 0,1     | 0,19 ± 0,06   | >0,05  | -10,98         |
| AAT                  | 42,61 ± 3,56   | 46,05 ± 4,66  | <0,001 | 8,05           |
| AOT                  | 66,69 ± 5,39   | 60,8 ± 4,89   | <0,001 | -8,84          |
| NO                   | 82,14 ± 16,79  | 81,57 ± 16,68 | >0,05  | -0,7           |
| Histidinele serinice | 650,71 ± 192,1 | 834,6 ± 447,6 | >0,05  | 28,25          |

Notă: MDA – aldehida malonică, HPL timp. – hidroperoxizii timpurii, HPL inter. – hidroperoxizii intermediari, HPL tard. – hidroperoxizii tardivi, AAT – activitatea antioxidantă totală, AOT – activitatea oxidantă totală, NO – oxidul nitric.

Pe parcursul primei săptămâni de la spitalizare se observă o scădere a aldehidei malonice, mai exprimată în lotul II – 23,45%, față de 13,64% în lotul I.

Tabelul 2

**Evoluția stresului oxidativ la pacienții din lotul II**

|                      | 1 zi          | 7 zi          | P      | Modificare (%) |
|----------------------|---------------|---------------|--------|----------------|
| MDA                  | 11,37 ± 2,08  | 8,7 ± 2,34    | <0,001 | -23,45         |
| HPL timp             | 0,45 ± 0,27   | 0,28 ± 0,18   | <0,001 | -37,48         |
| HPL inter            | 0,42 ± 0,26   | 0,26 ± 0,17   | <0,001 | -37,75         |
| HPL tard             | 0,28 ± 0,1    | 0,2 ± 0,1     | <0,001 | -28,07         |
| AAT                  | 43,43 ± 9,38  | 52,3 ± 5,52   | <0,001 | 20,43          |
| AOT                  | 67,37 ± 7,57  | 56,37 ± 7,97  | <0,001 | -16,33         |
| NO                   | 91,17 ± 20,1  | 89,39 ± 16,68 | >0,05  | -1,95          |
| Histidinele serinice | 617,9 ± 128,2 | 691,5 ± 300,1 | >0,05  | 11,92          |

De asemenea, se observă o diminuare mai evidentă a hidroperoxizilor timpurii și intermediari (37,45 și 37,75%), comparativ cu lotul I (20,03 și 15,31%).

Aplicarea tratamentului intensiv cu insulină la pacienții cu un nivel glicemic sporit la internare, demonstrează o modulare a răspunsului oxidativ, fiind apropiat de răspunsul oxidativ la pacienții normoglicemici. Astfel, activitatea oxidantă totală scade cu 16,33% în lotul II și cu 17,82% în lotul III, iar în lotul I - numai cu 8,84%. Concomitent observăm o creștere exprimată a activității antioxidante totale la a șaptea zi în lotul II și III (20,43% și 26,93%), comparativ cu 8% în lotul I.

Tabelul 3

**Evoluția stresului oxidativ la pacienții din lotul III**

|                      | 1 zi          | 7 zi            | p      | Modificare (%) |
|----------------------|---------------|-----------------|--------|----------------|
| MDA                  | 11,15 ± 1,67  | 8,57 ± 1,78     | <0,001 | -23,12         |
| HPL timp             | 0,45 ± 0,29   | 0,3 ± 0,19      | <0,001 | -33,83         |
| HPL inter            | 0,37 ± 0,24   | 0,28 ± 0,15     | <0,001 | -24,38         |
| HPL tard             | 0,25 ± 0,11   | 0,19 ± 0,06     | <0,05  | -22,97         |
| AAT                  | 41,75 ± 7,87  | 52,99 ± 7,09    | <0,001 | 26,93          |
| AOT                  | 66,95 ± 8,38  | 55,02 ± 8,88    | <0,001 | -17,82         |
| NO                   | 82,56 ± 16,15 | 87,55 ± 20      | >0,05  | 6,04           |
| Histidinele serinice | 718,6 ± 241,7 | 752,75 ± 197,73 | >0,05  | 4,75           |

Pacienții, care au primit un tratament intensiv cu insulină, au o diminuare mai evidentă a activității sistemului de oxidare, concomitent cu o creșterea a activității sistemului de antioxidare. Comparând lotul II și lotul III de pacienți observăm că normalizarea agresivă a glicemiei în primele ore ale accidentului vascular cerebral practic nivelează diferențele de oxidare – antioxidare la a 7 – zi.

Dinamica la a 7-a zi a oxidului nitric, și histidinelor serinice, în toate cele trei grupe, este cu o diferență statistic nesemnificativă.

**Discuții**

În cazul dezvoltării unui accident vascular cerebral are loc o activizare a sistemului de oxidare, paralel unei diminuări a sistemului antioxidant.

Stresul oxidativ joacă un rol important în patogenia accidentelor vasculare cerebrale ischemice acute. Hiperglicemia ar fi un factor esențial în stimularea formării radicalilor liberi, apariția stresului oxidativ și transformarea zonei de penumbră ischemică în zonă de necroză.

În practica clinică s-a încercat utilizarea a diverselor substanțe antioxidante, cu succese intermediare. La ora actuală se pare potrivită ideea utilizării insulinei în tratamentul agresiv de normalizare a glicemiei la pacienții cu hiperglicemie ușoară și moderată, având un efect de modulare în reacțiile de oxidare – antioxidare. Tratamentul complex cu includerea preparatelor antioxidante clasice în combinație cu administrarea în perfuzie a insulinei în perioada „ferestrei terapeutice” ar fi o alegerea perfectă în abordarea terapeutică a unui pacient cu AVC ischemic acut și hiperglicemie.

### **Concluzii**

Hiperglicemia prezintă un factor determinant al unei activități prooxidante înalte, concomitent cu o diminuare a activității antioxidante. Agravarea leziunii ischemice cerebrale prin hiperglicemie este determinată în mare măsură de stresul oxidativ.

Utilizarea insulinei pentru modularea glicemiei a determinat o scădere a activității oxidante și o creștere a activității antioxidante, valorile apropiindu-se de nivelele grupului de pacienți normoglicemici.

### **Bibliografie**

1. Aljada A., Dandona P., Effect of insulin on human aortic endothelial nitric oxide synthase. *Metabolism* 49:147–150, 2000
2. Brodsky S.V., Morrishow A.M., Dharia N., Gross S.S., Goligorsky M.S., Glucose scavenging of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F480–F486, 2001
3. Ceriello A., Quagliaro L., D'Amico M., Di Filippo C., Marfella R., Nappo F., Berrino L., Rossi F., Giugliano D., Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 51:1076–1082, 2002
4. Guha M., Bai W., Nadler J.L., Natarajan R., Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 275: 1728–1739, 2000
5. Nishikawa T., Edelstein D., Du X.L., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek M.A., Beebe D., Oates P.J., Hammes H.P., Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787–790, 2000
6. Perner A., Nielsen S., Rask-Madsen J., High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. *Intensive Care Med* 29:642–645, 2003
7. Prado R., Watson B.D., Wester P., Effects of nitric oxide synthase inhibition on cerebral blood flow following bilateral carotid artery occlusion and recirculation in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 720–723, 1993
8. Răducanu-Lichiardopol C., Stresul oxidativ în diabetul zaharat. *Info Mdica* Nr.3 (73), 2000
9. Steinberg H.O., Brechtel G., Johnson A., Fineberg N., Baron A.D., Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent: a novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 94:1172–1179, 1994
10. Steward-Marie L., Hazell A.S., Bemeur C., Butterworth R., Montgomery J., Immunohistochemical detection of inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and manganese superoxide dismutase following hyperglycemic focal cerebral ischemia. *Brain Res* 918:10–19, 2001
11. Weidig P., Master M., High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, Nr. 6, p. 432 – 441, 2004.