

ACȚIUNEA RADICALILOR LIBERI LA NIVELUL CARDIAC

Șef lucr.dr. *Nicoleta Taus*¹, dr. *Laurian Taus*², *Mirela Donea*¹,
dr. *Monica Potrovița*³, as.univ.dr. *Daniela Marinescu*¹, șef lucr.dr. *Ligia Neica*¹

¹Universitatea „Transilvania” din Brașov, Facultatea de Medicină

²Spitalul Clinic Județean de Urgență Brașov

³Direcția Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor Brașov

Abstract:

A significant number of in vitro and animal studies have demonstrated ROS activation in the cardiovascular system in response to various stressors and in the failing heart.

Hypoxia / reoxygenation increases level of oxidative species and attenuation of those species protects cardiomyocytes from induced damage.

Keywords: ROS activation, stress, heart

Introducere

Inima este cel mai susceptibil organ la îmbolnăvire prematură și stres oxidativ indus de radicalii liberi.

Alterările induse de radicalii liberi pot fi rezultatul leziunilor acute de ischemie – reperfuze, deteriorărilor endoteliale date de hiperhomocisteinemia ca și a alterărilor oxidative secundare peroxidării lipidelor.

Metalele grele din organism, în special cele tranziționale – Fe și Cu, sunt capabile să inițieze reacții adverse la radicali liberi.

Bardenheuer a demonstrat că înainte de angioplastia coronariană transluminală percutană, în condiții de perfuzare normală, concentrațiile de adenzină și hipoxantina erau 176 ± 34 nM respectiv 723 ± 73 nM. La 30 secunde după dezumflarea balonului, concentrațiile adenozinei erau crescute direct proporțional cu durata ocluziei: 326 ± 47 nM la 30 secunde, 531 ± 80 nM la 60 secunde și 793 ± 150 nM la 90 secunde. În timpul reperfuziei au fost obținute rezultate similare și în cazul hipoxantinei și acidului uric [4].

Miocardul de șobolan izolat supus la 15 minute de ischemie, urmate de 30 de minute de reperfuze a prezentat acumulări concomitente de Ca^{2+} liber (tehnica indo-1- fluorescenței) și degradarea fosfolipidelor membranare, indicată de creșterea conținutului intracelular de acid arahidonic (IVANICS et al.). Această observație este sugestivă pentru o relație a fluorescenței legată de Ca^{2+} și acumularea de acid arahidonic, probabil datorită unei stimulări a fosfolipazei A_2 (PLA_2) mediată de Ca^{2+} [8].

Performanța mușchilor papilari izolați în perioada de hipoxie a fost îmbunătățită de pre-

zența manitolului hipertonic [19].

Acest lucru se datorează creșterii cantității fluxului colateral într-o zonă miocardică ischemizată, demonstrat pe un model experimental utilizând o inimă intactă [16].

În miocardul de iepure reperfuzat, MnSOD a avut un efect crescut de protecție până la o doză reperfuzată de 5 μ g/ml, peste această valoare pierzându-și capacitatea de protecție, iar la doze foarte mari (peste 50 μ g/ml) a exacerbat leziunea.

În timp ce inimile izolate de iepure reperfuzate cu soluții tampon standard pentru 45 de minute au prezentat o eliberare marcată de GSSG (glutathion oxidat) cu un peak la 5 minute de la reluarea fluxului, GSSH eliberat din inimile tratate cu SOD timp de 15 minute și apoi cu perfuzie standard alte 30 de minute, a fost neglijabil [17].

Tratamentul celulelor miocardice la șoarece cu SOD (Cu,Zn-SOD 100u/ml) a suprimat semnificativ alterările celulare induse de hipoxie. Din moment ce SOD a suprimat și fragmentarea ADN indusă de hipoxie, îmbunătățirea supraviețuirii celulare de către SOD se crede a fi mediată prin efectul său antiapoptotic.

Acțiunea radicalilor liberi la nivelul miocardului hipoxic

Ide și colaboratorii au realizat un model experimental de infarct miocardic și remodelare ventriculară creat prin ligaturarea timp de 4 săptămâni a arterei coronare anterioare descendente. Ide a identificat în acest model experimental prezența radicalilor OH^{\cdot} care provin de la anionul superoxid, cât și formarea de peroxizi lipidici în mitocondrie, în număr crescut în

ventriculul stâng post ischemie.

Daneshrad demonstrează că în condiții de hipoxie artificială (expunerea în condiții de 10% oxigen pentru 3 săptămâni) se produce o creștere a activității hexokinazei în ventriculul drept și stâng și în septul inimii de șobolan, precum și o scădere a activității hidroxiacil-CoA-dehidrogenazei în miocardul ambilor ventriculi [6].

Există din ce în ce mai multe dovezi că multiple proteinkinaze, mitogen activate, sunt sensibilizate în timpul ischemiei și/sau reperfuziei și pot contribui la modificările structurale și funcționale după ischemia miocardică [1].

Expunerea celulelor miocardice de șobolan la ischemie, au avut ca rezultat o activare rapidă și tranzitorie a kinazelor reglate de semnale extracelulare, p38 și c-Jun NH₂-proteinkinaza. În reoxigenare s-a observat activarea tuturor celor 3 proteinkinaze mitogen activate; peak-urile activităților au crescut cu 5,5, 5,2 și respectiv 6,2.

Inspecția vizuală a acestor celule cardiace expuse la cicluri ischemie/reoxigenare a identificat că 18,6% dintre celule manifestau modificări caracteristice apoptozei, care au fost confirmate prin fragmentarea AND-ului.

Miocitele tratate cu PD 98059, un inhibitor de proteinkinază mitogen activată/kinază reglată de semnale extracelulare (MEK 1/MEK 2), au manifestat o supresie a activării kinazelor reglate de semnale extracelulare, indusă de ischemie/reoxigenare, în timp ce activitățile p38 și ale proteinkinazei c-Jun NH₂-terminale au fost crescute cu 70,3% și respectiv 55% în plus numărul de celule apoptotice a crescut cu 33,4%. Prin pretratamentul celulelor cu SB 203580, un inhibitor al p38 și al proteinkinazei c-Jun NH₂-terminale, numărul de celule apoptotice indus de ischemie/reoxigenare plus PD 98059 a fost redus cu 42,8% respectiv 63,3%.

Culturi de cardiomiocite de la șobolani de 3 zile, expuse la 40 mmHg presiune de O₂, în primele 24 de ore au arătat ușoare balonizări ale cristelor mitocondriale.

La 48 de ore toate mitocondriile erau balonizate cu cristele mitocondriale distorsionate, iar membrana externă mitocondrială era frecvent întreruptă. Matricea mitocondrială era clară și conținea zone electrono-dense difuze. S-au observat și fragmentări ale mitocondriilor.

Au fost de asemenea observate modificări majore, cum ar fi marginația cromatinei nucleare, dezintegrarea nucleară și clarificarea sarcoplasmiei cu pierderea frecventă a membranei celulare. Miofilamentele au fost deteriorate, și unele miofibrile erau întrerupte și dispuse haotic.

După 20 de minute de expunere în atmosferă cu 5% O₂, reoxigenarea timp de 5 ore a cauzat o creștere în volum a reticulului sarcoplasmic, tubulilor T și mitocondriilor, în special la șobolanii mai tineri; o creștere a densității distrucțiilor lipidice, vacuolare și mitocondriale.

Reperfuzia postischemică scoate în evidență relevanța porilor de tranziție permeabili în metabolismul NAD⁺. Conținutul intramitocondrial de NAD⁺, care este intens afectat pe perioada ischemiei, devine aproape depleționat odată cu reluarea fluxului coronar (după o perioadă lungă de ischemie).

Inhibarea depleției NAD⁺ mitocondrial sugerează că după reperfuzie creșterea Ca²⁺ intracelular, împreună cu creșterea generării de radicali liberi, produc deschiderea porilor de permeabilitate tranzitorie, cauzând eliberarea NAD⁺ intramitocondrial, cu hidroliza secundară a acestuia. Inhibarea porilor nu doar previne scăderea NAD⁺ mitocondrial, dar și protejează semnificativ viabilitatea celulei, fapt dovedit prin mai multe modele experimentale.

„Rigiditatea” miocardică în insuficiența contractilă reversibilă, ce apare frecvent în cardiomiopatia ischemică este asociată cu degradarea selectivă a troponinei I, rezultând o moleculă trunchiată care prezintă o reducere considerabilă a sensibilității față de Ca²⁺. S-a postulat faptul că supraîncărcarea intracelulară cu Ca²⁺ datorită ischemiei severe ar putea activa o protează Ca²⁺-dependentă, care în schimb clivează troponina I. Klairguti și colaboratorii au demonstrat că endotelina 1 (ET 1) miocardică este crescută după 20 de minute de ischemie, și au sugerat că ET 1 ar putea juca un rol de inductor al apoptozei [9].

Sybers precizează că apare o creștere accentuată și dependentă de timp a semnalelor ESR corespunzătoare complexului NO-Fe (II) N-metil-D-glucamil ditiocarbonat ce a fost observată în zona ischemică la 8 ore și la 24 de ore după ischemie miocardică indusă de ocluzia arterei coronare stângi [16]. *In vitro*, cardiomiocitele fetușilor de șoarece reprovizionate cu

O₂ și glucoză după o oră de deprivare au prezentat degenerări mitocondriale, miofibrilare și granule de glicogen înconjurate de o membrană simplă sau dublă care era incompletă. Vacuolele au fost în mod obișnuit localizate în regiunea perinucleară, iar membrana nucleară a prezentat în mod frecvent o concavitate adiacentă vacuolelor, ca și cum ar fi fost formată prin presiunea vacuolelor asupra ei [16].

Acțiunea radicalilor liberi la nivelul endoteliului capilar

Stresul oxidativ alterează multe funcții ale endoteliului inclusiv modularea tonusului vasomotor. Inactivarea oxidului nitric prin radicalul superoxid și alte specii reactive de oxigen, pare a se produce în condiții de HTA, hipercolesterolemie, diabet zaharat, fumat. Toți acești factori de risc predispun la ateroscleroză.

Moncada indică că unul dintre evenimentele precoce ce apar după reperfuzia unui pat vascular ischiemiat este o disfuncție semnificativă a endoteliului caracterizată prin pierderea factorului relaxant endotelial, cunoscut astăzi ca oxid nitric (NO) [14].

Acesta poate contribui semnificativ la leziunile de reperfuzie, deoarece se știe că NO produce vasodilatație, inhibă agregarea plachetară, atenuază aderența și activarea PMN, distruge radicalii superoxid [7, 15].

Donorul de NO -C87-3754 a prevenit vasoconstricția coronariană determinată de PMN-urile activate și a atenuat majoritatea disfuncțiilor endoteliale la nivelul inimii de pisică ischemiată și reperfuzată [11].

Babbs demonstrează ca generarea radicalului superoxid se produce în apropierea suprafeței luminale a celulelor endoteliale, arteriolelor, venulelor și capilarelor în primele 2 minute de reoxigenare, după 60 de minute de ischemie în inimile izolate de la șobolan [2].

Experimental, arterele coronare, cu endoteliu intact izolate de la porc au generat radical superoxid cu o viteză de $90 \pm 0,8$ Pm/min/mg de substanță uscată. Această viteză a fost diminuată cu aproximativ 24% când endoteliul a fost îndepărtat. Colorarea secțiunilor arteriale cu nitroblue tetrazoliu a avut ca rezultat formarea unui precipitat de formazan în principal la nivelul intimei.

În inimile de șobolan perfuzat conform tehnicii Langendorff, radicalul superoxid a

crescut eliberarea prostanoizilor vasoconstrictori (TxA₂, PGF₂ μ) și i-a scăzut pe cei vasodilatori (PGI₂ PGE₂).

Cu toate că indometacinul (administrat în doza de 10 μ M) un inhibitor al ciclooxigenazei a atenuat creșterea presiunii de perfuzie a coronarelor în timpul perfuzării O₂⁻ creșterea nu a fost complet blocată.

OKY-046 Na (administrat în doza de 10 μ M) un inhibitor al sintezei tromboxanului nu a avut nici un efect asupra creșterii presiunii de perfuzie a coronarelor determinate de O₂⁻ pe când ONO3708 (10 μ M) un antagonist al receptorilor TxA₂ (PGH₂) a diminuat acest efect.

Chen arată că leziunile miocardice perfuzate (prin metodă Langendorff) ale șoarecilor cu modificări genetice, care au prezentat o supraexprimare a Cu/Zn SOD în celulele coronarelor, au fost atenuate după 45 de minute de reperfuzie ce au urmat după 35 de minute de ischemie globală comparativ cu leziunile depistate la inimile nemodificate genetic [5].

De asemenea a existat și o eliberare scăzută a LDH în inimile șoarecilor cu modificări genetice.

Mehta și Li au incubat celulele endoteliale din arterele coronare umane cu următoarele substanțe: epinefrină (10^{-9} - 10^{-5} M); analogul hidrosolubil al vitaminei E –trolox (10^{-5} M); vitamina E liposolubilă (5×10^{-5} M) și atenolol (10^{-5} M) [13].

La o oră respectiv la 24 de ore de incubare cu epinefrină, generarea radicalilor superoxid a crescut cu 102% respectiv 81%. Au fost crescute și activitățile Mn SOD și Cu/Zn SOD.

Tratamentul celulelor în prealabil cu trolox și vitamina E a scăzut generarea de radical superoxid, iar tratarea celulelor cu atenolol a blocat up-reglarea SOD.

Ballinger evidențiază leziunile ADN în endoteliocitele din vena ombilicală umană expusă la superoxid, hidrogen peroxid, oxid nitric și α tocoferol, peroxinitrit. Atât în endoteliocite cât și în miocitele din aorta umană leziunile s-au înregistrat mai frecvent la nivelul ADN-lui mitocondrial comparativ cu ADN-ul nuclear [3].

Sinteza proteinelor mitocondriale a fost inhibată dependent de doza de peroxinitrit, rezultatul fiind o scădere a nivelelor intracelu-

lare de ATP și a funcției redox mitocondriale.

În culturi de endoteliu de venă safenă umană incubate 2 ore în condiții de hipoxie, aderența neutrofilelor a crescut de 5-6 ori comparativ cu rezultatele obținute în condiții de normoxie.

Maxwell și Ward au observat că o combinație între SOD și catalaza a micșorat atât sângerările la nivelul membranei luminale cât și balonizarea celulelor endoteliale în inimile de șobolani supuse la ischemie/reperfuzie. Trolox, un analog hidrosolubil al α tocoferolului, a redus sângerarea asemănător SOD [12,18].

Pretatamentul cu N-(2-mercaptopropionil)-glicina, un îndepărtător de ROS a inhibat complet inducția proteinei α 1-chemotactice monocitare în infarctele reperfuzate la câine.

In vitro tratarea culturilor de endoteliu obținute din vena jugulară de câine cu H_2O_2 a determinat o creștere, dependent de doze, a nivelului ARNm a proteinei α 1-monocitare chemotactice. Acest proces ce a fost inhibat de N-acetil-L-cisteina (un precursor al glutatoniului) dar nu a fost inhibat de pyrrolidinditiocarbonat. În anumite circumstanțe NO s-a dovedit a avea un efect protector a celulelor endoteliale față de speciile reactive de oxigen produse la acest nivel în condiții de ischemie/reperfuzie.

Okayama și colaboratorii au examinat adeziunea PMN de celulele endoteliale, ca marker al stresului oxidativ endotelial. În acest scop au folosit celule endoteliale din vena ombilicală umană și NO și H_2O_2 utilizate în alte teste similare. Creșterea adeziunii determinate de NO și H_2O_2 a fost atenuată semnificativ de 0,1 mM desferioxamina cât și de 1 mM metionina.

NOS endotelial (NOS III, NOS-endotelial) este exprimată în sistemul cardiovascular și este foarte fin reglată de Ca^{2+} 100-500 nmol/L, și de calmodulină.

Activarea eNOS atât în condiții de ischemie cât și mediate de receptor a crescut reactivitatea NADPH-diaphorazei în miocardul de șobolan. Procesul a fost cuantificat prin măsurarea anticorpilor formați împotriva aminoacizilor din domeniul central al eNOS de origine bovină sau din capătul N-terminal al eNOS umană.

Creșterea activării eNOS a fost asociată cu o creștere a conținutului GMPc. În miocardul

uman supus la ischemie în timpul operațiilor pe cord, reperfuzia precoce a crescut activitatea eNOS.

Inhibarea sintezei NO de diverși NOS inhibitori a crescut eliberarea de oxidanți leucocitari și a stimulat rulara și adeziunea neutrofilelor de celulele endoteliale. Adeziunea neutrofilelor poate fi blocată prin anticorpi anti-CD18 sau anti-ICAM.

Inhibitorii NOS pot determina agregarea leucocitelor de plachetele sangvine, proces care este atenuat de 8-Br-GMPc cât și de anticorpi împotriva selectinei P. Leucocitele aderente au prezentat o creștere a nivelului de GMPc.

Adeziunea pe termen scurt a neutrofilelor de colagenul I poate fi redusă de S-nitrozopenicilinamina (NO donor) și 8-Br-GMPc. După incubare îndelungată nu s-au observat diferențe între celulele tratate cu S-nitrozopenicilinamină și cele netratate, sugerând că efectul a fost mediat de NO.

Kokura și colaboratorii au expus endoteliocite dispuse în monostrat, recoltate din vena ombilicală umană la 60 de minute de anoxie și ulterior la 24 de ore de reoxigenare; după 6 ore de reoxigenare au fost adăugate limfocite T umane. După 18 ore de incubare, cultura de limfocite T – endoteliocite a fost pusă în contact cu o altă cultură conținând celule endoteliale dispuse în monostrat și neutrofile. Nu s-a observat o creștere a adhezivității neutrofilelor de celulele endoteliale, în schimb adhezivitatea a fost crescută la adăugarea de limfocite T. Această creștere se datorează creșterii nivelului de TNF α și IL-8 în culturile de limfocite T – endoteliocite asociată cu o creștere în expresia E-selectinei endoteliale. Tratarea culturii de limfocite T – endoteliocite cu anticorpi anti TNF α sau anti IL-8 a redus adhezivitatea neutrofilelor [10].

Pentoxifilinul a scăzut producția TNF α și a inhibat acțiunea acestuia asupra neutrofilelor. NO eliberat din endoteliu difuzează atât în celulele musculare netede cât și în lumenul vascular, iar prin stimularea guanilatciclazei plachetare inhibă agregarea plachetară. Este posibil ca efectul să se producă doar în lumenul vascular, NO fiind rapid inactivat prin legare de hemoglobină.

NO stimulează legarea guanilatciclazei solubile de grupările prostetice ale hemoglobinei și determină o creștere a activității ei de

până la 400 de ori. Dintre toți radicalii NO (NO⁺, NO⁻, NO[·]) doar NO[·] a determinat o creștere a activității enzimei.

Bradikina crește semnificativ invaginările membranare și formarea veziculelor în endoteliul izolat din inima de șoarece.

Inhibarea secreției bazale de NO[·] cu N^G-nitro-L arginină nu a produs modificări în procesul de formare al veziculelor. Nitroprusiatul de Na a scăzut numărul veziculelor.

Endoteliul poate interacționa cu plachetele circulante în cel puțin 2 moduri. În primul rând produșii eliberați din plachete (ADP, serotonină) s-au dovedit stimulatori potenți ai factorului relaxant endotelial. Un al 2-lea mecanism implică acțiunea directă a factorului relaxant (antiagregant plachetar potent).

Prostaciclina (PGI₂) sintetizată de celulele endoteliale și eliberată predominant spre lumenul vascular acționează prin intermediul adenilatciclazei. La nivelul plachetelor crește cantitatea de AMP_C, inhibă adeziunea, agregarea acestora și determină eliberarea de substanțe proagregante și vasoconstrictoare (serotonina, ADP, T_X A₂).

Bibliografie:

1. Abe K., Morita S., Kikuchi T., Itoyama Y. - Protective effect of a novel free radical scavenger, OPC-14117, on wobbler mouse motor neuron disease. *J Neurosci Res*, 1997, 48, 63-70.
2. Babbs C.F. - Histochemical demonstration of O₂ - generation by rat lung endothelium. *Free Radic Biol Med*, 1990, 9 [Suppl 1], 29.
3. Ballinger S.W., Patterson C., Yan C.N., Doan R., Burow D.L., Young C.G., Yakes F.M., Van Houten B., Ballinger C.A., Freeman B.A., Runge M.S. - Hydrogen peroxide and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res*, 2000, 86, 960-966.
4. Bardenheuer H.J., Fabry A., Höfling B., Peter K. - Adenosine: a sensitive marker of myocardial ischaemia in man. *Cardiovasc Res*, 1994, 28, 656-662.
5. Chen S.F., Chan P.H., Yu A.C.H. - Induction of intracellular superoxide radical formation by arachidonic acid and by polyunsaturated fatty acids in primary astrocytic cultures. *J Neurochem*, 1988, 50, 1185-1193.
6. Daneshrad Z., Garcia-Riera M.P., Verdys M., Rossi A. - Differential responses to chronic hypoxia and dietary restriction of aerobic capacity and enzyme levels in the rat myocardium. *Mol Cell Biochem*, 2000, 210, 159-166.
7. Furchgott R.F., Vanhoutte P.M. - Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*, 1989, 3, 2007-2018.
8. Ivanics T., Miklós Z., Dézsi L., Ikrényi K., Tóth A., Roemen T.H.M., Van der Vusse G.J., Ligeti L. - Concomitant accumulation of intracellular free calcium and arachidonic acid in the ischemic-reperfused rat heart. *Mol Cell Biochem*, 2001, 226, 119-128.
9. Kliment C.R., Suliman H.B., Tobolewski J.M., Reynolds C.M., Day B.J., Zhu X., McTiernan C.F., McGaffin K.R., Piantadosi C.A., Oury T.D. - Extracellular superoxide dismutase regulates cardiac function and fibrosis. *Mol Cell Cardiol.*, 2009 Nov, 47(5), 730-742.
10. Kokura S., Wolf R.E., Yoshikawa T., Granger D.N., Aw T.Y. - T-Lymphocyte-derived tumor necrosis factor exacerbates anoxia-reoxygenation-induced neutrophil-endothelial cell adhesion. *Circ Res*, 2000, 86, 205-213.
11. Lefer A.M., Carey C., Siegfried M.R., Ma X.-l., Weyrich A.S. - Antishock and endothelial protective actions of a NO donor in mesenteric ischemia and reperfusion. *Circ Shock*, 1992, 38, 209-216.
12. Maxwell D.S., Kruger L. - Changes in oligodendrocyte organelles during neuronal degeneration. In: VIII. Internationaler Anatomenkongress. Wiesbaden, 8.-13. August 1965. Zusammenfassungen der Vorträge, wissenschaftliche Demonstrationen und Filme. Zusammenfassung der Vorträge in den Symposien. Thieme, Stuttgart, 1965, S 76-77
13. Mehta J.L., Li D. - Epinephrine upregulates superoxide dismutase in human coronary artery endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30, 148-153.
14. Moncada S., Moilanen E., Moilanen T., Knowles R., Charles I., Kadoya Y., Al-Saffar N., Revell P.A. - Nitric oxide synthase is expressed in human macrophages

- during foreign body inflammation. *Am J Pathol*, 1997, 150, 881-887.
15. Radovsky A., Katz L., Ebmeyer U., Safar P. - Ischemic neurons in rat brains after 6, 8, and 10 minutes of transient hypoxic ischemia. *Toxicol Pathol*, 1997, 25, 500-505.
 16. Sybers H.D., Ingwall J., Deluca M., Ross J. Jr - Effects of transient hypoxia on ultrastructure in fetal mouse heart organ culture. 10th International Congress, International Academy of Pathology, Hamburg, Germany, September 16-21, 1974, p 10 [Abstract].
 17. Tritto I., D'Andrea D., Eramo N., Scognamiglio A., De Simone C., Violante A., Esposito A., Chiariello M., Ambrosio G. - Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res*, 1997, 80, 743-748.
 18. Ward B.J., Scoote M. - Antioxidants attenuate postischemic endothelial cell swelling and luminal membrane blebbing in cardiac capillaries. *Microvasc Res*, 1997, 53, 179-186.
 19. Willerson J.T., Pasceri V., Wu H.D., Yeh E.T.H. - Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor α activators. *Circulation*, 2000, 101, 235-238.