

Oxidačný stres a endoteliálna dysfunkcia u pacientov s novodiagnostikovanou roztrúsenou sklerózou

MUDr. Monika Siváková¹

(neuroológia)

Spoluautori: doc. MUDr. Pavel Šiarnik, PhD.¹, MUDr. Miroslav Vlček², PhD., doc. MUDr. Richard Imrich, DrSc.², doc. Ing. Ingrid Žitňanová³, PhD., MUDr. Adela Penesová, PhD.², MUDr. Žofia Rádiková, PhD.², prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.¹

Školiteľ: prof. MUDr. Branislav Kollár, PhD.¹

¹ I. neurologická klinika LF UK a UNB, ² Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava, ³ Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK

Úvod a ciele:

Roztrúsená skleróza (RS) je chronické, zápalové, demyelinizačné a neurodegeneratívne ochorenie centrálného nervového systému (CNS), ktoré typicky postihuje mladých ľudí a je jednou z najčastejších príčin invalidity v produktívnom veku (1,2). Etiológia tohto ochorenia nie je ani v súčasnosti jednoznačne objasnená (3). Predpokladá sa, že vzájomná súhra genetických a environmentálnych faktorov prispieva ku spusteniu aberantnej autoimunitnej reakcie, ktorá vedie k poškodeniu myelínovej pošvy a následne aj samotných axónov neurónov (4). Oxidačný stres je charakterizovaný nerovnováhou medzi hladinami reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a antioxidantov. ROS sú reaktívne molekuly, ktoré majú silnú oxidačnú kapacitu. Nadprodukcia ROS vedie k poškodeniu bunky na úrovni DNA, proteínov, sacharidov a tiež lipidov napr. v bunkových membránach (5). Viaceré práce poukazujú na to, že oxidačný stres sa takisto významne spolupodieľa na patogenéze RS. Aktivované makrofágy a astrocyty môžu produkovať veľké množstvo ROS, ale tiež reaktívnych foriem dusíka (RNS) (6). U pacientov s RS boli pozorované nižšie hladiny antioxidantných látok v CNS ako v periférnej krvi (7, 8). Na druhej strane oxidačný stres zohráva dôležitú úlohu aj v patogenéze aterosklerózy. Nekontrolovaná produkcia ROS je spojená s poškodením endotelu (9). Endoteliálna dysfunkcia (ED) je skorým prediktorom kardiovaskulárnych ochorení a je považovaná za subklinické štádium aterosklerózy. ED by mohla byť tiež zapojená do patogenézy RS. V epidemiologických štúdiách bolo totiž u pacientov s RS opakovane dokázané zvýšené riziko kardiovaskulárnych a cerebrálnych ochorení (10). Cieľom našej práce bolo vzájomné porovnanie markerov oxidačného stresu u pacientov s RS a v kontrolnom súbore zdravých jedincov, ako aj preskúmanie asociácie medzi oxidačným stresom a parametrami subklinickej aterosklerózy.

Súbor a metodika:

Nábor pacientov prebiehal na I. neurologickej klinike LFUK a UNB. Išlo o pacientov, ktorí boli hospitalizovaní pre podozrenie na demyelinizačné ochorenie CNS. Celkovo bolo vyšetrených 20 pacientov, diagnóza RS sa potvrdila u 13-tich. Na stanovenie diagnózy RS boli použité McDonaldove kritériá z r. 2010 (11). Kontrolnú skupinu tvorili 13 zdravých dobrovoľníci, teda

jedinci s neprítomnými vaskulárnymi rizikovými faktormi, vekom, BMI a pohlavím podobní pacientom s RS . Inklúznymi kritériami pre pacientov s RS bolo EDSS ≤ 2 , bez akejkolvek liečby v čase stanovenia diagnózy. Exklúznymi kritériami bolo akékoľvek interné alebo iné chronické závažné ochorenie, resp. užívanie medikácie napr. hypolipidemík a nikotinizmu. Štúdia bola schválená etickou komisiou LF UK a UNB Staré Mesto a všetci jedinci podpísali informovaný súhlas.

Pacientom bola ráno o 8:00 hod nalačno odobratá vzorka krvi do EDTA a sérových skúmaviek. Zo vzoriek plazmy bola pomocou Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay stanovená hodnota antioxidantnej kapacity plazmy (12,13).

Hladiny celkového cholesterolu (T-chol), LDL cholesterolu, HDL cholesterolu a triglyceridov (TG) boli stanovené v certifikovanom laboratóriu pomocou autoanalyzéry (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA) štandardným postupom s použitím enzymatických kitov (Roche Diagnostics, Lewes, UK).

Výšetrenie funkcie endotelu bolo realizované princípom periférnej arteriálnej tonometrie (PAT) pomocou prístroja EndoPAT (Itamar Medical, Caesarea, Israel). Výšetrenie bolo realizované neinvazívne snímačmi nasadenými na 2. prst oboch rúk. Jedna končatina slúžila na stanovenie pokojovej arteriálnej tonometrie, na druhej končatine bola vyvolaná oklúzia prietoku v a. brachialis naloženou manžetou manometra a následne pozorovaná reperfúzna hyperémia. Každé meranie pozostávalo z 5-minútovej pokojovej fázy, po ktorej nasledovala 5-minútová fáza oklúzie a. brachialis zrealizovaná pomocou manžety manometra a následne uvoľnenie manžety a 5-minútové meranie počas hyperemickej periódy. Výpočty boli realizované pomocou počítačového algoritmu (software 3.1.2) dodaného s prístrojom. Stanovili sme index reaktívnej hyperémie (RHI), ktorý je parametrom endoteliálnej funkcie a augmentačný index (AI), ktorý je parametrom tuhosti arteriálnej steny. Parameter AI@75 je AI štandardizovaný na pulzovú frekvenciu 75/min. Za patologickú bola považovaná hodnota RHI ≤ 1.67 (14).

Ako alternatívnu nepriamu metódu, ktorá odráža endoteliálnu funkciu sme použili stanovenie cirkulujúcich vaskulárnych adhézných molekúl [VCAM]-1 a intercelulárnych adhézných molekúl [ICAM]-1. [VCAM]-1 a [ICAM]-1 boli vyšetrené pomocou Milliplex MAP Kit (Human Neurodegenerative Disease Magnetic Bead Panel 3) od firmy EMD Millipore (Billerica, MA, USA). Metóda je založená na prítomnosti polystyrénových mikrosfér, ktoré sú kódované dvoma farbami a každá je potiahnutá špecifickou protilátkou. Po pridaní vzorky sa na jednotlivé mikrosféry naviažu v závislosti od protilátky analyzované zložky, pridá sa ďalšia označená detekčná protilátka. Následne sa hodnoty merajú pomocou prietokového cytometra.

Štatistická analýza získaných dát bola realizovaná pomocou programu SPSS version 18 (SPSS Inc., Chicago, USA). Kategorické premenné boli vyjadrené ako počty a percentuálne zastúpenie (%), kontinuálne premenné ako priemer \pm smerodajná odchýlka alebo medián (medzikvartilový rozsah [IQR], minimálna-maximálna hodnota). Na porovnanie premenných medzi skupinami sme použili Mann-Whitneyho *U* test, Studentov *t* test a Fisher exact test. Na určenie vzťahu medzi RHI a TEAC bol použitý Spearmanov korelačný koeficient. Všetky testy boli 2-stranové a za štatisticky významné boli považované hodnoty $P < 0.05$.

Výsledky:

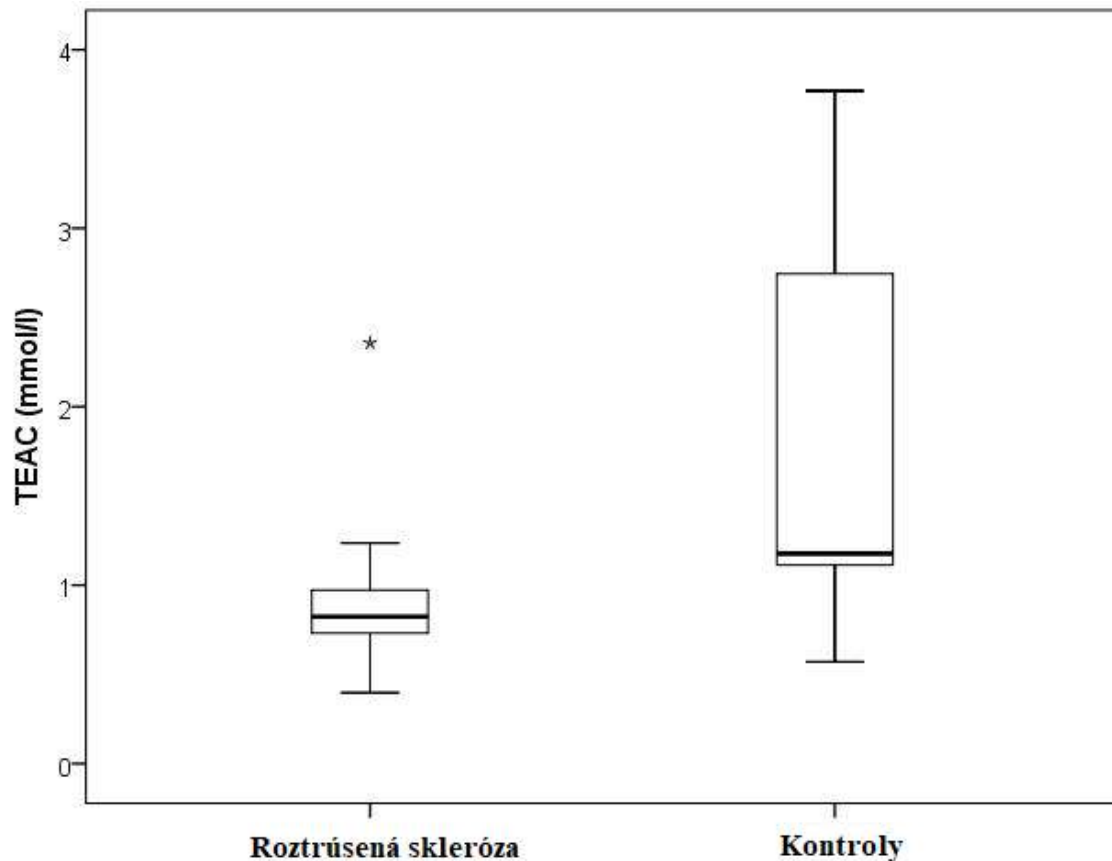
Klinická charakteristika pacientov s RS a kontrolnej skupiny je uvedené v tabuľke 1. U pacientov s RS boli v porovnaní s kontrolami zistené signifikantne nižšie hodnoty TEAC v porovnaní s kontrolnou skupinou [0,8 (0,4-2,4) vs. 1,2 (0,6-3,8) mmol troloxu/l; $p=0,004$]. Výskyt endoteliálnej dysfunkcie (charakterizovanej ako $RHI < 1,68$) a zvýšenej tuhosti arteriálnej steny ($AI@75 > -10$) nebol u pacientov s RS oproti kontrolnej skupine signifikantne vyšší (46,2% vs. 38,5%; $p=0,691$ a 61,6% vs. 30,8%; $p=0,116$). V stanovených parametroch cirkulujúcich adhézných molekúl [ICAM]-1 a [VCAM]-1 sa nám nepodarilo zistiť štatisticky významné rozdiely medzi skupinami (ICAM: $121242,40 \pm 36079,54$ pg/ml vs. $129766,56 \pm 62242,15$ pg/ml; $p=0,721$ a VCAM: $1014715,59 \pm 300947,29$ pg/ml vs. $129766,56 \pm 296185,31$ pg/ml; $p=0,476$).

V populácii s RS sa nám nepodarilo dokázať štatisticky významnú koreláciu TEAC s RHI ($r=0,011$; $p=0,972$), $AI@75$ ($r=0,077$; $p=0,789$), ICAM ($r=-0,170$; $p=0,578$), VCAM ($r=-0,203$; $p=0,505$). Podobne, ani v kontrolnej populácii nebola zistená štatisticky významná korelácia TEAC s RHI ($r=0,093$; $p=0,762$), $AI@75$ ($r=-0,376$; $p=0,206$), ICAM ($r=0,225$; $p=0,459$), VCAM ($r=0,071$; $p=0,817$).

Tabuľka 1: Klinická charakteristika sledovaných skupín pacientov s RS a zdravých kontrol

	Pacienti s RS	Kontroly	P
N	13	13	
Vek (roky)	29,8±6,6	30,8±6,9	0,954
Ženy/muži	7/6 (53,8/46,2%)	6/7 (46,2/53,8%)	0,695
Body-mass index (kg/m ²)	23,0±2,3	23,0±2,7	0,991
Systolický TK (mmHg)	116,2±12,4	120,4±14,6	0,442
Diastolický TK (mmHg)	76,8±10,5	74,8±7,5	0,567
T-chol (mmol/l)	4,3±0,5	4,0±0,6	0,311
LDL cholesterol (mmol/l)	2,8±0,4	2,5±0,5	0,106
HDL cholesterol (mmol/l)	1,3±0,3	1,3±0,3	0,648
TG (mmol/l)	0,3±0,1	0,4±0,2	0,598
RHI	2,0±0,8	2,0±0,6	0,947
Endoteliálna dysfunkcia (RHI<1,68)	6 (46,2%)	5 (38,5%)	1,0
AI@75	-6,0; 12,5 (-28,0-12,0)	-12,0; 24,5 (-33,0-61,0)	0,336
Zvýšená tuhosť arteriálnej steny (AI@75>-10)	8/13 (61,6%)	4/13 (30,8%)	0,237
ICAM (pg/ml)	121242,40 ± 36079,54	129766,56 ± 62242,15	0,721
VCAM (pg/ml)	1014715,59 ± 300947,29	129766,56 ± 296185,31	0,476
TEAC (mmol troloxu/l)	0,8; 0,4 (0,4-2,4)	1,2; 2,1 (0,6-3,8)	0,004* **

Hodnoty v tabuľke sú uvedené ako počet (%), priemer ± smerodajná odchýlka alebo medián, medzikvartilový rozsah (min–max). ***p < 0,001. TK: krvný tlak, T-chol: celkový cholesterol, TG: triglyceridy, RHI: index reperfúznej hyperémie, AI@75: tuhosť arteriálnej steny normalizovaná na srdcovú frekvenciu 75/min, TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity.



Graf 1: Hodnoty TEAC u pacientov s RS v porovnaní s kontrolami (medián 0,8, rozsah: 0,4-2,4 vs. medián 1,2; rozsah: 0,6-3,8; $p=0,004$). Hviezdička reprezentuje extrémne hodnoty TEAC

Diskusia:

Patogenéza RS sa v súčasnosti vysvetľuje kaskádou rôznych patofyziologických dejov, ktoré vedú k demyelinizácii a axonálnej degenerácii (15). Niektorí autori predpokladajú, že RS by mohla byť aj primárne degeneratívnym ochorením, pri ktorom by kľúčovú úlohu zohrával oxidačný stres a mitochondriálna dysfunkcia (16,17). Výsledky našej práce by mohli tieto hypotézy podporovať, lebo u našich pacientov s RS sme v sére pozorovali signifikantne nižšiu celkovú antioxidantnú kapacitu (TEAC) v porovnaní s kontrolným súborom zdravých jedincov. Treba zdôrazniť, že išlo o novodiagnostikovaných pacientov s RS a teda, že oxidačný stres sa naozaj ukazuje ako faktor, ktorý zohráva dôležitú úlohu už v úvodných štádiách tohto invalidizujúceho ochorenia. Zvýšený oxidačný stres nám na druhej strane môže nepriamo poukazovať aj na možnosť mitochondriálnej dysfunkcie prítomnej u týchto pacientov.

Ako sme už spomínali v úvode tejto práce, výsledky viacerých štúdií poukazujú na zvýšené riziko a vyšší výskyt vaskulárnych ochorení u pacientov s RS (10,18,19,20). To nás viedlo už v minulosti k hypotéze, že toto zvýšené riziko je v priamej súvislosti s endoteliálnou dysfunkciou, ktorá sa považuje za najdôležitejší iniciálny krok v procese aterogenézy. Túto hypotézu sme v minulosti aj potvrdili na neselektovanom súbore pacientov s RS, kde sme dokázali signifikantne vyšší výskyt ED v porovnaní s kontrolnou populáciou (21). V tejto práci sme sa snažili zhodnotiť výskyt ED aj v homogénnom súbore novodiagnostikovaných pacientov s RS, teda v úvodných štádiách RS. Na rozdiel od predchádzajúcej práce na

neselektovanom súbore pacientov s RS sme však štatisticky signifikantný výskyt ED u novodiagnostikovaných pacientov nezaznamenali, výskyt ED bol síce v našom súbore pacientov zvýšený, no len nesignifikantne. Nenašli sme teda žiadne štatisticky významné rozdiely v sledovaných parametroch endoteliálnej funkcie vyjadrenej pomocou indexu reperfúznej hyperémie (RHI) a tuhosti arteriálnej steny vyjadrenej ako AI@75. Signifikantné rozdiely medzi skupinami sme nenašli ani pri porovnaní hodnôt biomarkerov endoteliálnej funkcie z periférnej krvi- cirkulujúcich adhézných molekúl ([ICAM]-1 a [VCAM]-1), ktorých zvýšené hodnoty sú taktiež preukázateľne spojené so zvýšeným vaskulárnym rizikom.

Vzhľadom k tomu, že je oxidačný stres považovaný za dôležitý faktor, ktorý sa podieľa na aterogenéze, sme sa pokúsili v tejto práci stanoviť aj možnú asociáciu medzi TEAC a subklinickou aterosklerózou. Štatisticky významnú asociáciu týchto dvoch parametrov sa nám však nepodarilo preukázať u jedincov s RS ani v kontrolnej populácii. Tento výsledok môže byť spôsobený spektrom vyšetovaných pacientov. Naši pacienti mali ochorenie v začiatočnom štádiu a nebola u nich podávaná i.v. kortikoterapia ani imunomodulačná liečba. Endoteliálna funkcia nebola teda ovplyvnená uvedenou terapiou. Pacienti mali taktiež nízke skóre zneschopenia (EDSS \leq 2) a pred diagnostikovaním ochorenia viedli normálny aktívny život. Predpokladáme, že k alterácii endoteliálnej funkcie môže dochádzať až v neskorších štádiách RS vplyvom dlhšieho trvania základného ochorenia.

Ďalšou limitáciou našej štúdie môže byť aj samotná selekcia nami zaradených pacientov. Aterogenéza, vrátane endoteliálnej dysfunkcie, je asociovaná s veľkým množstvom tradičných vaskulárných rizikových faktorov ako dyslipidémia, arteriálna hypertenzia, hyperglykémia, diabetes mellitus a iné. Napriek zaradeniu doposiaľ zdravej populácie nebolo cieľené pátranie po všetkých potenciálnych rizikových faktoroch súčasťou algoritmu tejto práce. Ako kľúčovú limitáciu musíme pripustiť taktiež nízky počet jedincov v našom súbore.

Naše výsledky môžu naznačovať, že oxidačný stres nepatrí medzi kľúčové faktory podieľajúce sa na aterogenéze u pacientov s novodiagnostikovanou RS. Na druhej strane sa však môžu následky oxidačného stresu prejavovať v pokročilejších štádiách ochorenia. Túto hypotézu však budú musieť potvrdiť alebo vylúčiť budúce prospektívne štúdie.

Práca bola podporená grantom APVV-15-0228.

Zoznam literatúry:

1. Compston A, Coles A: Multiple sclerosis. Lancet 2008;372:1502–17.
2. Trapp BD, Nave K-A: Multiple Sclerosis : An Immune or Neurodegenerative Disorder ? Annu Rev Neurosci 2008:247–69.
3. Ebers GC: Environmental factors and multiple sclerosis. Lancet Neurol 2008;7:268–77.
4. Stadelmann C, Bru W: The spectrum of multiple sclerosis : new lessons from pathology. Curr Opin Neurol 2005;18:221–4.
5. Preiser J-C: Oxidative stress. J Parenter Enter Nutr 2012;36:147–54.
6. Croxford AL, Spath S, Becher B: GM-CSF in Neuroinflammation: Licensing Myeloid Cells for Tissue Damage. Trends Immunol 2015;36:651–62.

7. Garg N, Smith TW: An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav* 2015;5:1–13. <https://doi.org/10.1002/brb3.362>.
8. Ohl K, Tenbrock K, Kipp M: Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Exp Neurol* 2016;277:58–67.
9. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL: Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2017;19.
10. Thormann A, Magyari M, Koch-Henriksen N, Laursen B, Sorensen PS: Vascular comorbidities in multiple sclerosis : a nationwide study from Denmark. *J Neurol* 2016;263:2484–2493.
11. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al.: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69:292–302.
12. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231–7.
13. Zhong Y, Shahidi F: Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. In *Handbook of antioxidants for food preservation.*, Woodhead Publishing, 2015, 287-33.
14. Moerland M, Kales AJ, Schrier L, van Dongen MGJ, Bradnock D, Burggraaf J: Evaluation of the EndoPAT as a Tool to Assess Endothelial Function. *Int J Vasc Med* n.d.;2012:1–8.
15. Patergnani S, Fossati V, Bonora M, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, et al.: Mitochondria in Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms of Pathogenesis. *Int Rev Cell Mol Biol* 2017;328:49–103.
16. Horsen J Van, Schaik P Van, Witte M: Inflammation and mitochondrial dysfunction : a vicious circle in neurodegenerative disorders ? *Neurosci Lett* 2019. 710:1-6
17. Penesova A, Vlcek M, Imrich R, Vernerova L, Marko A, Meskova M, et al.: Hyperinsulinemia in newly diagnosed patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis* 2015;30:895–901.
18. Khan F: Assessment of endothelial function as a marker of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2010;13:189–95.
19. Koch-Henriksen, N. Brønnum-Hansen, H. Stenager E: Underlying cause of death in Danish patients with multiple sclerosis: results from the Danish Multiple Sclerosis Registry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:56–9.
20. Marrie RA, Garland A, Schaffer SA, Fransoo R, Leung S, Yogendran M, et al.: Traditional risk factors may not explain increased incidence of myocardial infarction in MS. *Neurology* 2019;92:e1624–33.
21. Kemenyova P, Siarnik P, Sutovsky S, Blaho A, Turcani P, Kollar B: Impairment of endothelial function in patients with multiple sclerosis. *Neuroendocrinol Lett* 2015;36:67–71.