

Κλινική Έρευνα

Λευκοκυτταρικές Αποθήκες «Ασταθούς» (Οξειδοαναγωγικά Ενεργού) Σιδήρου σε Ασθενείς με Συστολική Καρδιακή Ανεπάρκεια

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΟΡΑΝΤΖΟΠΟΥΛΟΣ¹, ΧΑΡΑ ΒΛΑΧΟΥ², ANNA ΚΩΤΣΙΑ¹, ΚΑΛΛΙΡΡΟΗ ΚΑΛΑΝΤΖΗ¹, ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΜΠΑΡΜΠΟΥΤΗ³, ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΛΑΡΗΣ², ΙΩΑΝΝΗΣ Α. ΓΟΥΔΕΒΕΝΟΣ¹

¹Καρδιολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, ²Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα, ³Εργαστήριο Ανατομίας, Ιστολογίας και Εμβριολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα

Λέξεις ευρετηρίου:
**Συστολική
 δυσλειτουργία
 αριστερής κοιλίας,
 λευκά αιμοσφαίρια,
 κλάσμα εξώθησης
 αριστερής κοιλίας,
 «ασταθής» σίδηρος,
 οξειδοαναγωγικά
 ενεργός σίδηρος,
 οξειδωτικό stress.**

Ημερ. παραλαβής
 εργασίας:
 5 Ιουλίου 2011
 Ημερ. αποδοχής:
 16 Ιανουαρίου 2012

Διεύθυνση
 Επικοινωνίας:
 Παναγιώτης
 Κοραντζόπουλος

Καρδιολογική
 Κλινική, Ιατρική
 Σχολή Πανεπιστημίου
 Ιωαννίνων, Σταύρου
 Νιάρχου 1, 451 10
 Ιωάννινα
 e-mail: [p.korantzopoulos@
 yahoo.gr](mailto:p.korantzopoulos@yahoo.gr)

Εισαγωγή: Τα δεδομένα σχετικά με τις πηγές του οξειδωτικού stress στο ανεπαρκούν μυοκάρδιο είναι λιγοστά. Τα λευκοκύτταρα φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά στην οξειδωτική βλάβη που παρατηρείται στην ανθρώπινη καρδιακή ανεπάρκεια (ΚΑ). Η ενδοκυττάρια αποθήκη «ασταθούς» σιδήρου (Intracellular labile iron pool - LIP) αντιπροσωπεύει μια πηγή τοξικών δραστικών μορφών οξυγόνου.

Μέθοδοι: Μελετήσαμε ασθενείς με χρόνια συστολική ΚΑ που είχαν κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF) \leq 45%. Εξετάσαμε την κατάσταση της LIP σε διαφορετικούς πληθυσμούς λευκοκυττάρων σε ασθενείς με ΚΑ και διερευνήσαμε τη σχέση της με κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους, περιλαμβανομένων συμβατικών φλεγμονωδών δεικτών.

Αποτελέσματα: Εξήντα ασθενείς περιλήφθηκαν τελικά στην ανάλυση (μέση ηλικία: 67 ± 11 έτη, 54 άνδρες, 42 με ισχαιμική καρδιομυοπάθεια). Η πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε ότι μόνο η LIP στα κοκκιοκύτταρα [OR: 0,73; 95% CI: 0,55-0,98; $p=0,039$] και η συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας (RVSP) [OR: 0,95; 95% CI: 0,92-0,99; $p=0,027$] σχετιζόνταν ανεξάρτητα με σοβαρή συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας (LVEF \leq 30%). Η ανάλυση συσχέτισεως αποκάλυψε ότι το LVEF έχει αντίστροφη συσχέτιση με τη LIP στα κοκκιοκύτταρα (Spearman's rho: -0,39; $p=0,002$), τη LIP στα μονοκύτταρα (Spearman's rho: -0,35; $p=0,007$) και τη RVSP (Spearman's rho: -0,43; $p=0,003$). Δε σημειώθηκε σημαντική συσχέτιση του LVEF με φλεγμονώδεις δείκτες.

Συμπεράσματα: Η LIP στα κοκκιοκύτταρα σχετίζεται ανεξάρτητα με τη σοβαρότητα της δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με συστολική καρδιακή ανεπάρκεια. Ο ενδοκυττάριος οξειδοαναγωγικός σίδηρος πιθανόν αντιπροσωπεύει μια πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου στα λευκοκύτταρα σε έδαφος καρδιακής ανεπάρκειας.

Το κλινικό σύνδρομο της καρδιακής ανεπάρκειας (ΚΑ) είναι μια αναπτυσσόμενη επιδημία αντιπροσωπεύοντας μια πολυπαραγοντική δυναμική διαταραχή με διαφορετικά υποκείμενα υποστρώματα και σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία.¹ Ένας αυξανόμενος όγκος δεδομένων δείχνει ότι το οξειδωτικό stress εμπλέκεται στην παθογένεση και στην προοδευτική εξέλιξη της μυοκαρδιακής δυσλειτουργίας περιλαμβανομένης της χρόνιας ΚΑ.²⁻⁴ Αρκε-

τές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού stress στο πλάσμα ή στα ούρα σχετίζονται με τη σοβαρότητα της ΚΑ.⁴⁻¹⁴ Ωστόσο, τα δεδομένα που αφορούν υποκείμενους μηχανισμούς όπως κυτταροπλασματικές πηγές οξειδωτικού stress στο ανεπαρκούν μυοκάρδιο είναι λιγοστά.¹⁵ Υπάρχουν ενδιαφέροντα δεδομένα που υποδηλώνουν ότι τα λευκοκύτταρα συμμετέχουν ενεργά στην οξειδωτική βλάβη που παρατηρείται στην ανθρώπινη ΚΑ.¹⁶⁻¹⁸ Από την άλ-

λη μεριά, η ενδοκυττάρια αποθήκη «ασταθούς» σιδήρου (labile iron pool - LIP) αντιπροσωπεύει τον κύριο καταλύτη στη μετατροπή ασθενών δραστηκών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του ανιόντος σουπεροξειδίου, σε εξαιρετικά δραστικές ελεύθερες ρίζες, όπως ρίζες υδροξυλίου και αλκοξυλίου.^{15,19} Επομένως, η εκτίμηση της LIP πιθανόν να συνεισφέρει στην αποσαφήνιση της σχέσης μεταξύ της κατάστασης μεταβολής του σιδήρου και των παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με οξειδωτικό stress.²⁰⁻²⁴ Σκοπός μας ήταν να εξετάσουμε την κατάσταση της LIP σε διαφορετικούς πληθυσμούς λευκοκυττάρων που συλλέχθηκαν από ασθενείς με συστολική ΚΑ έτσι ώστε να διερευνήσουμε το δυνητικό ρόλο του οξειδοαναγωγικού σιδήρου σε αυτή την παθολογική κατάσταση. Επίσης, διερευνήσαμε τη σχέση της LIP στα λευκοκύτταρα με κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους, περιλαμβανομένων και συμβατικών φλεγμονωδών δεικτών.

Μέθοδοι

Πρωτόκολλο μελέτης και ασθενείς

Σε αυτή τη μελέτη παρατήρησης ελέγχθηκαν διαδοχικοί ασθενείς με συστολική ΚΑ που παρακολουθούνταν στην κλινική μας. Μελετήσαμε ασθενείς με χρόνια συστολική ΚΑ (ισχαιμική ή διατατική καρδιομυοπάθεια για περισσότερο από 6 μήνες) που είχαν κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF) \leq 45%. Όλοι οι ασθενείς βρισκόταν σε βέλτιστη φαρμακευτική αγωγή χωρίς να φέρουν εμφυτεύσιμες συσκευές καρδιακού επανασυγχρονισμού ή συσκευές υποβοήθησης της αριστερής κοιλίας. Αποκλείσαμε ασθενείς με οξεία απορρόθμιση της ΚΑ, σοβαρή βαλβιδική δυσλειτουργία, πρόσφατη στεφανιαία επέμβαση ή καρδιακό χειρουργείο, πρόσφατο οξύ στεφανιαίο επεισόδιο, πρόσφατη ή ενεργό λοίμωξη, χρόνια ρευματική/φλεγμονώδη νόσο, κακοήγη νόσο, αιματολογική δυσκρασία, αιμορραγική διαταραχή, πρόσφατη αιμορραγία, τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια, καθώς και αυτοί που λάμβαναν φάρμακα με αντιφλεγμονώδη και/ή αντιοξειδωτική δράση εκτός από στατίνες και αναστολείς του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης. Επίσης αποκλείσαμε ασθενείς που κατανάλωναν αλκοόλ ή που ήταν καπνιστές.

Καταγράψαμε προσεκτικά τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά για κάθε συμμετέχοντα. Το LVEF υπολογίστηκε με τη μέθοδο Simpson και η συστολική πίεση της δεξιάς κοιλίας

(RVSP) με καθιερωμένες υπερηχοκαρδιογραφικές μεθόδους. Χωρίσαμε τον πληθυσμό των ασθενών σε 2 ομάδες (σοβαρή δυσλειτουργία αριστερής κοιλίας με LVEF \leq 30% και μέτρια δυσλειτουργία αριστερής κοιλίας με LVEF > 30%). Επίσης ελέγξαμε για πιθανές διαφορές ανάμεσα σε ασθενείς με λειτουργική κλάση I-II και κλάση III-IV κατά New York Heart Association (NYHA).

Εργαστηριακές μετρήσεις

Οι εργαστηριακές εξετάσεις, περιλαμβανομένων γενικής αίματος και βιοχημικών, έγιναν τις πρωινές ώρες με τους ασθενείς νηστικούς. Η μέτρηση των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) έγινε με αυτόματο αναλυτή Coulter. Τα επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) levels προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας υψηλής ευαισθησίας ανοσονεφελομετρική μέθοδο (Beckman Coulter/Immunochemistry Systems, Behring Diagnostics Inc., Somerville, New Jersey, USA). Η εκτίμηση της κάθαρσης κρεατινίνης έγινε με τη χρήση του τύπου Cockcroft-Gault.²⁵ Όλες οι μετρήσεις έγιναν τυφλά ως προς τα χαρακτηριστικά των ασθενών και την αγωγή.

Ανθρώπινα λευκοκύτταρα από περιφερικό αίμα απομονώθηκαν από ηπαρινισμένο ολικό αίμα μετά από υπο-ωσμωτική λύση, όπως έχει ήδη περιγραφεί.²¹ Εν συντομία, ένας όγκος αίματος αναμίχθηκε με έξι όγκους ρυθμιστικού διαλύματος λύσης που περιείχε 156 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃ και 97 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) και τοποθετήθηκε σε πάγο για 20 λεπτά έτσι ώστε να γίνει η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ακολούθως, τα λευκοκύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε 1.000xg για 5 λεπτά και εκπλύθηκαν 2 φορές σε μέσο καλλιέργειας DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Τέλος, τα κύτταρα αναδύθηκαν σε πυκνότητα 1,5x10⁶ κύτταρα ανά ml πριν γίνουν περαιτέρω αναλύσεις.

Η εκτίμηση της LIP σε φρέσκα ανθρώπινα λευκοκύτταρα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον ευαίσθητο σε μέταλλα ανιχνευτή καλσεΐνη (Molecular Probes, Eugene, OR), ως φθορίζον μόριο, σε συνδυασμό με κυτταρομετρία ροής. Παρουσία ασετομεθοξυ-εστερικών ομάδων στο αρχικό μόριο, η καλσεΐνη AM διευκολύνει τη διάχυσή της διά των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ η ενδοκυττάρια διάσπαση των εστερικών δεσμών από μη-ειδικές εστεράσες οδηγεί σε ενδοκυττάρια κατακράτηση της αρνητικά φορτισμένης καλσεΐνης. Η σύνδεση σιδήρου μαζί με άλλα δισθενή μέταλλα από την καλσεΐνη οδηγεί σε σβήσι-

μο του φθορισμού, ενώ επακόλουθη προσθήκη του ισχυρού και ειδικού δεσμευτή σιδήρου salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) (μια ευγενική προσφορά του Καθηγητή Prem Ponka, McGill University, Montreal, Canada) οδηγεί σε μετακίνηση του σιδήρου από την καλσεΐνη και ταυτόχρονη αύξηση της έντασης.²¹ Στην παρούσα μελέτη, 1,0 ml εναιωρήματος λευκοκυττάρων ($1,5 \times 10^6$ κύτταρα) μεταφέρθηκαν σε πλαστικά σωληνάκια και αναλύθηκαν από το κυτταρόμετρο ροής FACScan (PARTEC GmbH, Germany). Ανάλυση σκέδασης φωτός, δηλ. προς τα εμπρός και πλευρική σκέδαση, επέτρεψε το διαχωρισμό των λευκοκυττάρων σε 3 ξεχωριστούς πληθυσμούς με βάση το μέγεθος και την κοκκίωση. Ακολούθως, τα κύτταρα φορτίστηκαν με καλσεΐνη μέσω επώασης με nM καλσεΐνης-AM για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε 37° C. Η ένταση του φθορισμού της καλσεΐνης ανιχνεύθηκε ως πράσινος φθορισμός και εκφράστηκε σε ιστογράμματα ως προς τον αριθμό των κυττάρων. Τέλος, 100 μM του ειδικού δεσμευτή σιδήρου SIH που διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες προστέθηκε στο εναιώρημα των κυττάρων και ο φθορισμός της καλσεΐνης ανιχνεύθηκε ξανά 5 λεπτά αργότερα. Η επαγόμενη από το SIH μεταβολή του μέσου κυτταρικού μεταβολισμού σε κάθε κυτταρικό τύπο εκφράστηκε με αυθαίρετες μονάδες και ουσιαστικά αντανάκλα τα επίπεδα της LIP στα συγκεκριμένα κύτταρα.

Στατιστική ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση (mean \pm SD), ή ως διάμεση τιμή με διατεταρτημοριακό εύρος (median - interquartile range) αν οι τιμές τους δεν είχαν κανονική κατανομή. Ο έλεγχος κανονικής κατανομής πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov. Οι συγκρίσεις ανάμεσα στις συνεχείς μεταβλητές έγινε με Student's t-test ή με το μη-παραμετρικό Mann-Whitney U test, ανάλογα με την περίπτωση. Οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως απόλυτα νούμερα και συχνότητες και συγκρίθηκαν με το Fisher's exact test. Η ανάλυση συσχέτισης ανάμεσα στο LVEF και σε διαφορετικές παραμέτρους έγινε υπολογίζοντας τους συντελεστές Pearson's ή Spearman's ανάλογα με την περίπτωση. Επίσης πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης έτσι ώστε να εξεταστεί η σχέση ανάμεσα σε υποψήφιες παραμέτρους και τη σοβαρότητα της συστολικής δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας (LVEF \leq 30% έναντι LVEF $>$ 30%). Οι μεταβλητές που εμφάνισαν συσχέ-

τιση σε μονοπαραγοντική ανάλυση μπήκαν στο πολυπαραγοντικό μοντέλο. Τιμή με $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με λογισμικό SPSS (version 16,0; SPSS Inc., Chicago, Illinois).

Αποτελέσματα

Εξήντα ασθενείς με συστολική καρδιακή ανεπάρκεια περιελήφθησαν στην τελική ανάλυση (μέση ηλικία: 67 ± 11 έτη, 54 άνδρες, 42 με ισχαιμική καρδιομυοπάθεια). Τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των 2 ομάδων, δηλαδή ασθενείς με σοβαρή συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας (LVEF \leq 30%, n=28) και ασθενείς με μέτρια δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας (LVEF $>$ 30%, n=32) παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Οι περισσότερες από τις παραμέτρους ήταν συγκρίσιμες ανάμεσα στις 2 ομάδες. Οι ακόλουθες παράμετροι που είχαν αξιοσημείωτη διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες ($p \leq 0,10$) εισήχθησαν στο πολυπαραγοντικό μοντέλο: LIP στα κοκκιοκύτταρα, LIP στα μονοκύτταρα, καρδιακή συχνότητα, συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας (RVSP), και New York Heart Association [NYHA] κλάση I-II έναντι III-IV. Η πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε μόνο η LIP στα κοκκιοκύτταρα (OR: 0,73; 95% CI: 0,55-0,98; $p=0,039$) και η RVSP (OR: 0,95; 95% CI: 0,92-0,99; $p=0,027$) σχετιζόταν ανεξάρτητα με σοβαρή συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας. Η ανάλυση συσχέτισης αποκάλυψε ότι το LVEF σχετιζόταν αντίστροφα με τη LIP στα κοκκιοκύτταρα (Spearman's rho: -0,39; $p=0,002$), τη LIP στα μονοκύτταρα (Spearman's rho: -0,35; $p=0,007$) και τη RVSP (Spearman's rho: -0,43; $p=0,003$). Δεν σημειώθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ LVEF και φλεγμονωδών δεικτών.

Σύγκριση των ασθενών με NYHA class I-II (n=34) και αυτών με κλάση NYHA III-IV (n=26) έδειξε ότι υπήρχε σημαντική διαφορά στη LIP των κοκκιοκυττάρων (13,69[3,78] έναντι 15,40[4,16], $p=0,03$), στην κάθαρση κρεατινίνης (65[28,7] ml/min έναντι 42[40,3] ml/min, $p=0,04$), στην RVSP ($26,8 \pm 15,1$ mmHg έναντι $46,1 \pm 18,6$ mmHg, $p=0,003$), στο LVEF ($P=0,002$) και μια οριακά σημαντική διαφορά στα επίπεδα ουρικού οξέος ($7,1 \pm 2,5$ mg/dl έναντι $8,9 \pm 1,9$ mg/dl, $p=0,054$). Ωστόσο, πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε ότι μόνο η RVSP σχετιζόταν ανεξάρτητα με προχωρημένη κλάση κατά NYHA (OR: 1,07, 95% CI: 1,01-1,12, $p=0,015$).

Πίνακας 1. Δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών.

	LVEF ≤ 30% (N=28)	LVEF > 30% (N=32)	Τιμή P
Ηλικία (έτη)	67,6 ± 9,5	66,9 ± 12,7	0,82
Φύλο (άνδρες)	26 (93%)	28 (88%)	0,67
ΔΜΣ (kg/m ²)	25,4 (9,7)	24,7 (5,0)	0,59
ΝΥΗΑ κλάση III-IV	14 (50%)	9 (28%)	0,10
Κολπική μαρμαρυγή	12 (43%)	9 (28%)	0,28
Καρδιακή συχνότητα (παλμοί/λεπτό)	70 (17)	73 (11)	0,09
Συστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	120 (20)	130 (22)	0,81
RVSP (mmHg)	42,6 ± 19,6	28,3 ± 15,9	0,01
Ισχαμική καρδιομυοπάθεια	21 (75%)	21 (65%)	0,57
Διαβήτης	7 (25%)	10 (32%)	0,77
Υπέρταση	16 (57%)	20 (62%)	0,79
Φαρμακευτική θεραπεία			
ACE-I/ARBs	25 (89%)	31 (96%)	0,33
B-αναστολείς	25 (89%)	26 (81%)	0,48
Ανταγωνιστές αλδοστερόνης	21 (75%)	18 (56%)	0,17
Στατίνες	19 (67%)	25 (78%)	0,39
Εργαστηριακές παράμετροι			
Αιμοσφαιρίνη (gr/dl)	13,5 (3,8)	13,2 (3,6)	0,373
WBC (per mm ³)	7,340 (2,150)	7,400 (1,295)	0,89
Κάθαρση κρεατινίνης (ml/min)	53,4 ± 24,6	62,1 ± 29,6	0,26
K ⁺ (mEq/l)	4,2 ± 0,5	4,4 ± 0,4	0,23
Na ⁺ (mEq/l)	136 (3)	138 (3)	0,36
Ουρικό οξύ (mg/dl)	8,5 ± 2,5	7,6 ± 2,3	0,21
hsCRP (mg/l)	9,2 (7,8)	8,67 (8,8)	0,43
Φερριτίνη (ng/ml)	112 (143)	140 (202)	0,62
Fe (μg/dl)	68 ± 41	76 ± 32	0,42
TIBC (μg/dl)	311 ± 87	315 ± 46	0,83
LIP στα Κοκκιοκύτταρα (αυθαίρετες μονάδες)	16,21 (4,92)	14,12 (3,31)	0,01
LIP στα Μονοκύτταρα (αυθαίρετες μονάδες)	26,03 (5,99)	23,01 (5,91)	0,05
LIP στα Λεμφοκύτταρα (αυθαίρετες μονάδες)	10,63 (3,17)	9,95 (2,00)	0,22

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± σταθερή απόκλιση, ή ως διάμεση τιμή (διατεταρτημοριακό εύρος), ή ως νούμερο (ποσοστό). LVEF = κλάσμα εξώθησης αριστεράς κοιλίας, ΔΜΣ = δείκτης μάζας σώματος, ΝΥΗΑ = New York Heart Association, RVSP = συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας, ACE-I = αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης, ARBs = αναστολείς υποδοχέα αγγειοτενσίνης, WBC = λευκά αιμοσφαίρια, hsCRP = υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, Fe = σίδηρος, TIBC = ολική διηροδεομευτική ικανότητα, LIP = αποθήκη «ασταθούς» σιδήρου

Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η LIP στα κυκλοφορούντα κοκκιοκύτταρα σχετίζεται ανεξάρτητα με τη σοβαρότητα της δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με συστολική ΚΑ. Ειδικότερα, φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ LVEF και LIP στα κοκκιοκύτταρα ή στη LIP στα μονοκύτταρα, ενώ η LIP στα κοκκιοκύτταρα σχετιζόταν ανεξάρτητα με σοβαρή συστολική ΚΑ (LVEF≤30%). Παρόλο που μελετήσαμε αρκετές επιπλέον κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους, περιλαμβανομένων συμβατικών φλεγμονωδών δεικτών (hsCRP, WBC και ουρικό οξύ), μόνο η LIP στα κοκκιοκύτταρα και η

RVSP σχετιζόνταν ανεξάρτητα με σοβαρή συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας.

Προηγούμενες μελέτες που διερεύνησαν τη σχέση μεταξύ δεικτών οξειδωτικού stress και σοβαρότητας της ΚΑ κυρίως εστίαστηκαν στη λειτουργική ικανότητα σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά ΝΥΗΑ.^{7,8,10,12,13} Παρόλο που το LVEF μπορεί να επηρεαστεί από τις συνθήκες φόρτισης (προφόρτιο), αντιπροσωπεύει ένα πιο αντικειμενικό δείκτη συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας συγκρινόμενο με την κλάση κατά ΝΥΗΑ. Στη μελέτη μας, η LIP στα κοκκιοκύτταρα ήταν αυξημένη σε ασθενείς με προχωρημένη κλάση κατά ΝΥΗΑ (III-IV) αλλά μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση αυτή η σχέση δεν ήταν σημαντική.

Σημαντικά δεδομένα δείχνουν ότι το οξειδωτικό stress εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της ΚΑ και πιθανόν συνεισφέρει στην πρόοδο της νόσου. Πράγματι, διάφορες παράμετροι όπως η απόπτωση και η νέκρωση των καρδιομυοκυττάρων, η κοιλιακή αναδιαμόρφωση, η μηχανοηλεκτρική αποσύζευξη και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία έχει δείχθει ότι επάγονται από το οξειδωτικό stress.²⁻⁴ Η κλινική εφαρμογή των δεικτών οξειδωτικού stress, ως προγνωστικοί δείκτες στην ΚΑ, είναι περιορισμένη και αμφιλεγόμενη αλλά μπορεί να διαφωτίσει νέα μονοπάτια και να υποδείξει νέους για δυνητικές παρεμβάσεις.⁶ Από την άλλη μεριά, πρέπει να αναγνωρίσουμε ότι δείκτες οξειδωτικού stress στον ορό ή στα ούρα αντιπροσωπεύουν έμμεσους δείκτες οξειδωτικής βλάβης και δεν παρέχουν μηχανιστικές πληροφορίες όσον αφορά την παραγωγή ROS. Επιπλέον, ασθενείς με ΚΑ έχουν συνυπάρχουσες νοσηρότητες που πιθανόν παρεμβαίνουν στις παθοφυσιολογικές μεταβολές και στις οξειδωτικές τροποποιήσεις που παρατηρούνται στα πλαίσια της κύριας νόσου. Επιπρόσθετα, παρά τα σημαντικά δεδομένα για τον παθογενετικό ρόλο του οξειδωτικού stress σε πειραματικά μοντέλα ΚΑ^{2-4,15}, η συσχέτιση κλινικής ΚΑ με δείκτες οξειδωτικού stress στον ορό δεν αποδεικνύει καθαρά αιτιολογική συσχέτιση.

Η φλεγμονή και η ανοσολογική ενεργοποίηση αυξάνει το οξειδωτικό stress και πιθανόν εμπλέκεται στην παθογένεση και την εξέλιξη της ΚΑ.^{4,5,26,27} Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ενίσχυση του οξειδωτικού stress στα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα σε ασθενείς με ΚΑ υποδηλώνοντας συνεισφορά τους στην οξειδωτική βλάβη.¹⁶⁻¹⁸ Ειδικότερα, έχει δείχθει ότι η ικανότητα παραγωγής σουπεροξειδίου (διαμέσου της NADPH οξειδάσης) είναι επαυξημένη σε ασθενείς με συμφορητική ΚΑ σε σχέση με άτομα ομάδας ελέγχου.¹⁶ Στο ίδιο μήκος κύματος, οι Kong και συν. έδειξαν αυξημένο ενδοκυττάριο οξειδωτικό stress σε 3 υποτύπους (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα) κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων σε ασθενείς με οξεία απορρυθμισμένη ΚΑ.¹⁷ Τα υψηλότερα επίπεδα ενδοκυττάρων οξειδωτικών παρατηρήθηκαν στα μονοκύτταρα.¹⁷ Αυτές οι μεταβολές στα λευκοκύτταρα σχετίζονταν με εκσεσημασμένη ελάττωση του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού και με αυξημένη τάση για απόπτωση.¹⁷ Σημειωτέον, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη δείχθηκε ότι το κυτταρικό οξειδωτικό stress στα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια είναι αυξημένο σε ασθενείς με επιδεινούμενη ΚΑ.¹⁸ Επίσης, υψηλά επίπεδα πρωτεϊνικής νιτροσουλώσης ανι-

χνεύθηκαν σε λευκοκύτταρα ασθενών με ΚΑ υποδεικνύοντας ότι ενδοκυτταρικές ROS προκαλούν σημαντικές πρωτεϊνικές βλάβες.¹⁸ Αυτά τα ευρήματα αποδόθηκαν σε ανεπαρκή κάθαρση των ROS-θετικών λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων από τα πνευμονικά τριχοειδή όσο και σε αυξημένη παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια.¹⁸

Τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα έχουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες και εμπλέκονται στην «αναπνευστική έκρηξη». Το σύμπλεγμα της NADPH οξειδάσης που κατανέμεται κάθετα στις κυτταρικές μεμβράνες παράγει ανιόντα σουπεροξειδίου στον εξωκυττάριο χώρο όσο και στα φαγοκυτταρικά κενοτόπια. Αυτό το σύμπλεγμα είναι πολύ λιγότερο ενεργό σε άλλους τύπους λευκοκυττάρων όπως στα Β-λεμφοκύτταρα. Η ενεργοποίηση της λευκοκυτταρικής NADPH οξειδάσης και της μυελοϋπεροξειδάσης έχει φανεί ότι εμπλέκεται στο συστηματικό οξειδωτικό stress που παρατηρείται στην ΚΑ.^{2,3,10,16} Στις προαναφερθείσες μελέτες που αφορούν την ΚΑ και το λευκοκυτταρικό οξειδωτικό stress, η ακριβής πηγή της αυξημένης ενδοκυτταρικής παραγωγής ROS production δεν διευκρινίστηκε σε βάθος.

Έχει προταθεί η ύπαρξη μιας ενδιάμεσης και μεταβατικής μορφής ενδοκυττάρου σιδήρου η οποία μπορεί να μετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και έχει διαφορετικά ονόματα όπως “LIP”, «οξειδοαναγωγικός σίδηρος», «ελεύθερος σίδηρος» και άλλα.¹⁹⁻²² Ο οξειδοαναγωγικός ενεργός ενδοκυττάριος σίδηρος επάγει ενδοκυτταρικές οξειδωτικές βλάβες καταλύοντας αντιδράσεις τύπου Fenton²⁰ οι οποίες έχουν εμπλακεί στην παθοφυσιολογία του ανεπαρκούς μυοκαρδίου καθώς και σε άλλες καρδιαγγειακές διαταραχές.^{15,24} Υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι η τοξικότητα της LIP παίζει ρόλο κλειδί στη σχετιζόμενη με την αορτοστεφανιαία παράκαμψη (bypass) οξεία νεφρική βλάβη.²³ Παρόλο που αναιμία και σιδηροπενία έχουν περιγραφεί σε πληθυσμούς ασθενών με ΚΑ,^{24,28} η κατάσταση της δεξαμενής LIP δεν έχει διερευνηθεί. Πρόσφατα, αναπτύξαμε μεθοδολογία για εκτίμηση της LIP σε ανθρώπινα λευκοκύτταρα χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Αυτή η μέθοδος έχει επικυρωθεί και έχουμε δείξει σε προηγούμενη μελέτη θετική συσχέτιση της λευκοκυτταρικής LIP με τη γήρανση.²¹ Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά τη λευκοκυτταρική LIP σε ασθενείς με συστολική ΚΑ. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω θεωρήσεις, η LIP ίσως αντιπροσωπεύει την κύρια πηγή ROS στα λευκοκύτταρα σε έδαφος ΚΑ και δυνητικό στόχο για παρεμβάσεις με ειδικές σιδηροδεσμευτικές ουσίες.

Περιορισμοί

Αρκετοί περιορισμοί είναι φανεροί. Πρώτον, πρέπει να αναγνωρίσουμε ότι αυτή ήταν μια μικρή πιλοτική μελέτη, ενώ υπήρχε επικράτηση των ανδρών στον πληθυσμό μας. Ωστόσο, οι ασθενείς επιλέχθηκαν προσεκτικά αφού εφαρμόστηκαν αυστηρά κριτήρια εισόδου και αποκλεισμού. Δεύτερον, παρόλο που καταγράψαμε αρκετές κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους δεν έχουμε στοιχεία που αφορούν τα επίπεδα BNP. Τρίτον, δε μετρήσαμε άλλους μη-ειδικούς δείκτες οξειδωτικού stress στο πλάσμα αφού πρωταρχικός μας σκοπός ήταν να εκτιμήσουμε την κατάσταση του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου στα λευκοκύτταρα διερευνώντας συγκεκριμένες πηγές ROS. Επιπρόσθετα, δεν περιλάβαμε στη μελέτη υγιή άτομα αφού υπάρχουν ουσιώδεις διαφορές σε πληθώρα κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων, περιλαμβανομένων φαρμάκων με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, μεταξύ αυτών και ασθενών με ΚΑ. Επομένως, η μελέτη ανεξάρτητων συσχετίσεων χρησιμοποιώντας πολυπαραγοντική ανάλυση θα ήταν ανέφικτη. Επιπρόσθετα, πρωταρχικός μας σκοπός ήταν να διερευνήσουμε τη δυναμική σχέση ανάμεσα στη λευκοκυτταρική LIP και τη σοβαρότητα της ΚΑ. Τέλος, δεν εκτιμήσαμε το δυναμικό προγνωστικό ρόλο των μελετώμενων παραμέτρων σε σχέση με μελλοντικά ανεπιθύμητα συμβάντα. Αυτό είναι αντικείμενο μελλοντικής έρευνας.

Βιβλιογραφία

- McMurray JJ. Clinical practice. Systolic heart failure. *N Engl J Med*. 2010; 362: 228-238.
- Korantzopoulos P, Galaris D, Papaioannides D, Siogas K. The possible role of oxidative stress in heart failure and the potential of antioxidant intervention. *Med Sci Monit*. 2003; 9: RA120-125.
- Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. 2005; 115: 500-508.
- Eleuteri E, Magno F, Gnemmi I, et al. Role of oxidative and nitrosative stress biomarkers in chronic heart failure. *Front Biosci*. 2009; 14: 2230-2237.
- Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med*. 2008; 358: 2148-2159.
- Trachtenberg BH, Hare JM. Biomarkers of oxidative stress in heart failure. *Heart Fail Clin*. 2009; 5: 561-577.
- Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 31: 1352-1356.
- Hokamaki J, Kawano H, Yoshimura M, et al. Urinary biopyrins levels are elevated in relation to severity of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43: 1880-1885.
- Polidori MC, Praticó D, Savino K, Rokach J, Stahl W, Mecocci P. Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *J Card Fail*. 2004; 10: 334-338.
- Tang WH, Brennan ML, Philip K, et al. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 2006; 98: 796-799.
- White M, Ducharme A, Ibrahim R, et al. Increased systemic inflammation and oxidative stress in patients with worsening congestive heart failure: improvement after short-term inotropic support. *Clin Sci (Lond)*. 2006; 110: 483-489.
- Radovanovic S, Krotin M, Simic DV, et al. Markers of oxidative damage in chronic heart failure: role in disease progression. *Redox Rep*. 2008; 13: 109-116.
- Nagayoshi Y, Kawano H, Hokamaki J, et al. Differences in oxidative stress markers based on the aetiology of heart failure: comparison of oxidative stress in patients with and without coronary artery disease. *Free Radic Res*. 2009; 43: 1159-1166.
- Amir O, Paz H, Rogowski O, et al. Serum oxidative stress level correlates with clinical parameters in chronic systolic heart failure patients. *Clin Cardiol*. 2009; 32: 199-203.
- Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res*. 2000; 86: 152-157.
- Ellis GR, Anderson RA, Lang D, et al. Neutrophil superoxide anion – generating capacity, endothelial function and oxidative stress in chronic heart failure: effects of short- and long-term vitamin C therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36: 1474-1482.
- Kong CW, Hsu TG, Lu FJ, Chan WL, Tsai K. Leukocyte mitochondria depolarization and apoptosis in advanced heart failure: clinical correlations and effect of therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 38: 1693-1700.
- Ijsselmuiden AJ, Musters RJ, de Ruiter G, et al. Circulating white blood cells and platelets amplify oxidative stress in heart failure. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008; 5: 811-820.
- Barbouti A, Doulias PT, Zhu BZ, Frei B, Galaris D. Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31: 490-498.
- Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2008; 45: 1-23.
- Doulias PT, Vlachou C, Boudouri C, Kanavaros P, Siampoulos KC, Galaris D. Flow cytometric estimation of “labile iron pool” in human white blood cells reveals a positive association with ageing. *Free Radic Res*. 2008; 42: 253-259.
- Galaris D, Skiada V, Barbouti A. Redox signaling and cancer: the role of “labile” iron. *Cancer Lett*. 2008; 266: 21-29.
- Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A. Novel biomarkers, oxidative stress, and the role of labile iron toxicity in cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 55: 2024-2033.
- Kell DB. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics*. 2009; 2: 2.

25. Scrutinio D, Passantino A, Santoro D, Cacciapaglia E, Farinola G. Prognostic value of formulas estimating excretory renal function in the elderly with systolic heart failure. *Age Ageing*. 2009; 38: 296-301.
26. Celis R, Torre-Martinez G, Torre-Amione G. Evidence for activation of immune system in heart failure: is there a role for anti-inflammatory therapy? *Curr Opin Cardiol*. 2008; 23: 254-260.
27. Oikonomou E, Tousoulis D, Siasos G, Zaromitidou M, Papavassiliou AG, Stefanadis C. The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches. *Hellenic J Cardiol*. 2011; 52: 30-40.
28. Nanas JN, Matsouka C, Karageorgopoulos D, et al. Etiology of anemia in patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 2485-2489.