

---

TEZĂ DE DOCTORAT

**STRESUL OXIDATIV ÎN  
CARDIOPATIA ISCHEMICĂ:  
VALOARE PROGNOSTICĂ ȘI  
ABORDARE TERAPEUTICĂ**

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

---

Doctorand Marius-Alin Iliescu

---

Conducător de doctorat Prof. univ. dr. Remus Orăsan

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	15
<b>1. Stresul oxidativ</b>	17
1.1 Definiție	17
1.2 Speciile reactive de oxigen	17
1.2.1 Anionul superoxid	17
1.2.2 Alte specii reactive de oxigen	20
<b>2. Apărarea antioxidantă</b>	22
2.1 Enzimele antioxidante	22
2.1.1 Superoxid dismutazele (SOD)	22
2.1.2 Catalaza	22
2.1.3 Glutacion peroxidazele	23
2.1.4 Peroxiredoxinele	23
2.1.5 Ceruloplasmina	23
2.2 Antioxidanți care întrerup lanțul reacțiilor oxidative	24
2.2.1 Vitamina E	24
2.2.2 Vitamina C (acidul ascorbic)	25
2.2.3 Carotenoizii și vitamina A	25
2.2.4 Flavonoizii	26
2.2.5 Compuși conținând grupări tiol	26
2.2.6 Acidul uric	27
2.2.7 Bilirubina	27
2.2.8 Ubiquinol-10	27
2.2.9 Hormoni cu activitate antioxidantă	27
2.2.10 Oxidul nitric	28
2.3 Sechestrarea ionilor metalici redox activi	28
2.4 Răspunsul celular la stresul oxidativ	28
<b>3. Stresul oxidativ în cardiopatia ischemică</b>	29
3.1 Intervenția stresului oxidativ în procesul aterosclerotic	29
3.2 Factorii de risc cardiovascular și stresul oxidativ	30
3.2.1 Fumatul și stresul oxidativ	31
3.2.2 Hipertensiunea arterială și stresul oxidativ	34
3.2.3 Diabetul zaharat și stresul oxidativ	36
3.2.4 Hipercolesterolemia și stresul oxidativ	41
3.3 Tratamentul antioxidant în cardiopatia ischemică	43
3.3.1 Vitamine antioxidante	43
3.3.2 Polifenoli	43
3.3.3 Compuși conținând grupări tiol	44
3.3.4 Inhibitorii de xantin-oxidază	44
3.3.5 Coenzima Q10	44
3.3.6 Minerale antioxidante	45
3.3.7 Alți antioxidanți de sinteză	45
3.3.8 Medicamente utilizate curent în tratamentul cardiopatiei ischemice cu efecte antioxidante	46
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	48
<b>1. Obiectivele cercetării</b>	49
<b>2. Metodologie generală</b>	50

2.1 Criterii de includere și definirea factorilor de risc cardiovascular evaluați	50
2.2 Metode de determinare a parametrilor de stres oxidativ studiați	51
2.2.1 Dozarea malondialdehidei plasmatică prin fluorescență	51
2.2.2 Determinarea proteinelor carbonilate	51
2.2.3 Determinarea capacității de donator de hidrogen	52
2.2.4 Determinarea grupărilor SH	52
2.2.5 Determinarea glutationului	52
2.3 Analiza statistică	53
<b>3. Studiu 1. Stresul oxidativ la pacienții cu cardiopatie ischemică și relația sa cu factorii de risc cardiovascular, severitatea afectării coronariene și terapia de fond</b>	54
3.1 Introducere	54
3.2 Ipoteza de lucru	54
3.3 Material și metodă	55
3.4 Rezultate	55
3.4.1 Caracteristicile lotului de pacienți studiați	55
3.4.2 Parametrii de stres oxidativ la pacienții cu cardiopatie ischemică vs. lotul martor	57
3.4.3 Relația parametrilor de stres oxidativ cu factorii de risc cardiovascular în lotul pacienților cu cardiopatie ischemică	59
3.4.4 Relația parametrilor de stres oxidativ cu sexul și vârsta în lotul pacienților cu cardiopatie ischemică	72
3.4.5 Relația parametrilor de stres oxidativ cu numărul arterelor coronare epicardice cu stenoze semnificative hemodinamice	77
3.4.6 Relația parametrilor de stres oxidativ cu medicația de fond	79
3.5 Discuții	82
3.6 Concluzii	84
<b>4. Studiu 2. Valoarea prognostică a parametrilor de stres oxidativ în cardiopatia ischemică și modificarea lor sub tratament cu acid alfa-lipoic</b>	86
4.1 Introducere	86
4.2 Ipoteza de lucru	86
4.3 Material și metodă	86
4.4 Rezultate	87
4.4.1 Evoluția pacienților pe parcursul urmăririi	87
4.4.2 Relația parametrilor de stres oxidativ inițiali cu mortalitatea	88
4.4.3 Modificarea parametrilor de stres oxidativ sub tratament cu acid alfa-lipoic	90
4.4.4 Răspunsul la tratamentul cu acid alfa-lipoic în funcție de factorii de risc cardiovascular	95
4.4.5 Răspunsul la tratamentul cu acid alfa-lipoic în funcție de sexul și vârsta pacienților	108
4.4.6 Răspunsul la tratamentul cu acid alfa-lipoic în funcție de medicația de fond	114
4.4.7 Relația parametrilor de stres oxidativ de la finalul tratamentului cu acid alfa-lipoic cu mortalitatea	117
4.5 Discuții	119
4.6 Concluzii	121
<b>5. Discuții generale</b>	123
<b>6. Concluzii generale</b>	125
<b>REFERINȚE</b>	127

**Cuvinte cheie:** stres oxidativ, apărare antioxidantă, cardiopatie ischemică, prognostic, acid alfa-lipoic

## INTRODUCERE

Cardiopia ischemică reprezintă o problemă majoră de sănătate publică. Deși ateromatoza coronariană debutează încă din primele decade de viață, simptomele ei apar de obicei mult mai târziu, după o lungă perioadă de evoluție silențioasă. Adesea evenimentele coronariene majore survin subit, cu consecințe devastatoare.

Pacienții cu cardiopatie ischemică au un nivel crescut al stresului oxidativ și un nivel redus al apărării antioxidante. S-a demonstrat că stresul oxidativ intervine în toate etapele procesului aterosclerotic, de la apariția primelor striuri lipidice până la fazele de placă ateromatoasă complicată.

Pornind de la aceste premise, au fost testate diferite tratamente antioxidante în speranța de a ameliora prognosticul, de multe ori rezervat, al acestor bolnavi. Rezultatele au fost în general dezamăgitoare, niciunul dintre medicamentele testate neimpunându-se în schema terapeutică uzuală a pacienților cu cardiopatie ischemică.

Motivele acestor rezultate negative nu sunt clare; s-a sugerat incapacitatea substanțelor antioxidante utilizate de a pătrunde în interiorul plăcilor de aterom sau un posibil efect cardioprotector al speciilor reactive de oxigen, mediat de fenomenul de precondiționare ischemică. Trebuie însă menționat și faptul că parametrii de stres oxidativ/apărare antioxidantă urmăriți în studii au fost foarte variați, relevanța lor clinică fiind în multe cazuri incertă.

În cercetarea actuală mi-am propus determinarea acelor parametri care identifică cel mai bine pacientul coronarian la risc înalt și care ar putea avea semnificație prognostică. În continuare am încercat influențarea terapeutică a acestor parametri, utilizând ca antioxidant acidul alfa-lipoic, singurul antioxidant intrat în practica clinică curentă, în tratamentul polineuropatiei diabetice, dar puțin studiat la bolnavii coronarieni. Am căutat de asemenea identificarea unor grupe de pacienți care au beneficiu maxim de pe urma acestui tratament, pornind de la premisa că individualizarea terapiei, concept tot mai vehiculat în medicina actuală, ar putea crește rata de răspuns.

Nu mi-am propus în acest studiu demonstrarea eficacității *clinice* a tratamentului antioxidant la pacienții cu cardiopatie ischemică. Acesta ar fi fost un obiectiv irealizabil la acest nivel, fapt demonstrat de eșecul unor studii pe loturi mult mai mari de bolnavi, urmărite pe termen lung. Consider însă că identificarea unor parametri de stres oxidativ/apărare antioxidantă cu adevărat semnificativi clinic și demonstrarea răspunsului lor la un anumit tratament antioxidant poate constitui un punct de plecare pentru un trial mai amplu care să obțină și beneficiile clinice așteptate pentru acești bolnavi.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

### Stresul oxidativ

Stresul oxidativ reprezintă un dezechilibru între producția de specii reactive de oxigen și mecanismele enzimatice și non-enzimatice de apărare antioxidantă, rezultând în generarea unui exces de specii reactive, care induc leziuni oxidative la nivel celular și molecular.

Speciile reactive de oxigen sunt molecule caracterizate printr-o reactivitate chimică înaltă, capabile să acționeze ca agenți oxidanți. Ele includ radicali liberi precum radicalii superoxid ( $O_2^-$ ) sau hidroxil ( $OH\cdot$ ), dar și alte molecule care, deși nu sunt radicali, au proprietăți oxidante, ca apa oxigenată ( $H_2O_2$ ) sau peroxinitritul ( $ONOO\cdot$ ).

Metabolismul celular al organismelor aerobe generează permanent specii reactive de oxigen. În cantități mici, acestea joacă roluri fiziologice importante, intervenind în apărarea imună celulară (acidul hipocloros HOCl) sau ca sisteme semnal intra- și extracelulare. În condiții patologice, producția crescută de specii reactive de oxigen sau ineficiența mecanismelor de apărare antioxidantă determină amplificarea stresului oxidativ, cu efectele lui detrimentale la nivelul întregului organism.

### **Apărarea antioxidantă**

Pentru a se proteja de efectele detrimentale ale speciilor reactive de oxigen, organismul dispune de numeroase mecanisme de apărare antioxidantă. Aceste mecanisme acționează prin prevenirea formării speciilor reactive, neutralizarea lor sau repararea leziunilor celulare/tisulare secundare stresului oxidativ.

*Enzimele antioxidante* inactivează speciile reactive de oxigen catalizând reacțiile de conversie a lor la compuși mai puțin nocivi, de obicei la nivel intracelular. Ele sunt reprezentate de superoxid dismutaze, catalază, glutation peroxidaze, peroxiredoxine, ceruloplasmină.

*Antioxidanții care întrerup lanțul reacțiilor oxidative* sunt molecule mici capabile să accepte un electron de la un radical liber sau să îi doneze acestuia un electron, cu formarea unui produs stabil. Ei includ vitaminele C, E, A și carotenoizii, flavonoizii, compușii conținând grupări tiol, acidul uric, bilirubina, coenzima Q10, oxidul nitric și hormoni cu activitate antioxidantă (melatonina, 17β-estradiolul).

*"Sechestrarea" ionilor metalici redox activi*, precum cei de fier și cupru, care generează radicali hidroxil prin reacția Fenton, este un alt mecanism antioxidant, realizat de proteine precum hemoglobina, mioglobina, feritina, transferina, lactoferina, albumina și ceruloplasmina.

Expunerea celulelor la stres oxidativ activează *factori transcripționali* care se translocă în nucleu, stimulând expresia unor gene implicate în sinteza enzimelor antioxidante și enzimelor de detoxifiere de faza a doua. În cazul unui stres oxidativ sever, care depășește mijloacele de apărare celulară, se declanșează *apoptoza*, protejându-se țesuturile învecinate prin limitarea răspunsului inflamator.

### **Stresul oxidativ în cardiopatia ischemică**

Stresul oxidativ este strâns corelat cu inițierea și evoluția procesului aterosclerotic, de la apariția primelor striuri lipidice până la fazele de placă ateromatoasă complicată.

S-au acumulat numeroase dovezi privind rolul stresului oxidativ ca verigă patogenică intermediară comună principalilor factori de risc pentru cardiopatia ischemică: fumatul, diabetul, dislipidemia și hipertensiunea arterială.

Cu toate acestea, majoritatea studiilor care au testat eficacitatea tratamentului antioxidant în prevenția primară și secundară a evenimentelor cardiovasculare nu au reușit să demonstreze efectul benefic al antioxidantilor.

# CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

## Obiectivele cercetării

Am pornit de la ipoteza că pentru găsirea unui tratament antioxidant eficient este întâi necesară identificarea unor parametri de stres oxidativ/apărare antioxidantă cu impact clinic cert, și ulterior a unor antioxidanți în măsură să influențeze semnificativ acești parametri.

Drept urmare, scopul cercetării actuale a fost identificarea markerilor cel mai bine asociați cu prezența cardiopatiei ischemice, a factorilor de risc cardiovascular și cu severitatea afectării coronariene. Am urmărit apoi care dintre acești markeri ar putea avea semnificație prognostică și am testat efectul tratamentului antioxidant asupra lor.

Am conceput cercetarea actuală ca pe un studiu pilot care să identifice acei markeri de stres oxidativ/apărare antioxidantă care merită urmăriți pe termen lung și un tratament antioxidant capabil să influențeze acești parametri, putând servi ca punct de plecare pentru trialuri mai ample în măsură să evalueze și eficacitatea clinică a terapiei antioxidante.

## Studiu 1. Stresul oxidativ la pacienții cu cardiopatie ischemică și relația sa cu factorii de risc cardiovascular, severitatea afectării coronariene și terapia de fond

### Ipoteza de lucru

Am căutat identificarea markerilor de stres oxidativ și de apărare antioxidantă cel mai bine corelați cu prezența cardiopatiei ischemice, prin compararea valorilor acestor parametri între un lot de bolnavi cu boală coronariană confirmată și un lot de subiecți sănătoși. În cadrul lotului de pacienți cu cardiopatie ischemică, am urmărit identificarea markerilor corelați cu factorii de risc cardiovascular majori (fumat, hipertensiune arterială, diabet zaharat, hipercolesterolemie), cu sexul și vârsta bolnavilor, cu numărul arterelor coronare epicardice cu leziuni semnificative și cu medicația de fond.

### Material și metodă

Am luat în studiu un lot de 21 de pacienți cu cardiopatie ischemică stabilă și un lot martor de 12 subiecți sănătoși. La toți subiecții s-a cuantificat nivelul stresului oxidativ pe baza estimării modificărilor oxidative ale lipidelor plasmatică (prin dozarea malondialdehidei) și proteinelor plasmatică (prin determinarea grupărilor carbonil), și s-a evaluat capacitatea antioxidantă prin determinarea capacității de donor de hidrogen, a grupărilor SH și a glutationului. Am comparat parametrii de stres oxidativ între pacienții cu cardiopatie ischemică și subiecții din lotul martor.

Malondialdehida plasmatică s-a dozat prin fluorescență, pe baza reacției acesteia cu acidul tiobarbituric, cu formarea unui aduct fluorescent. Determinarea proteinelor carbonilate s-a făcut prin dozarea spectrofotometrică a 2,4-dinitrofenilhidrazinei rezultată din reacția proteinelor carbonilate cu 2,4-dinitrofenil hidrazina. Măsurarea capacității de donor de hidrogen a serului s-a bazat pe reducerea radicalului stabil 1,1-difenil-picrilhidrazil (DPPH) de către o serie de componente antioxidante neenzimatice ale serului: glutation, tocoferol, acid ascorbic, reducere care poate fi urmărită prin schimbarea culorii de la violet la galben pal, monitorizată

prin modificarea absorbantei la 520 nm. Determinarea grupărilor SH s-a făcut pe baza reacției de culoare pe care o dau aceste grupe cu acidul 2,2-ditiobisnitrobenzoic (DTNB) (reactivul Ellman), iar a glutatationului pe baza reacției acestuia cu o-ftalaldehida, cu formarea unui produs fluorescent.

La pacienții cu cardiopatie ischemică s-a verificat prezența hipertensiunii arteriale, a diabetului zaharat, a hipercolesterolemiei și consumul de țigări. S-a testat relația markerilor de stres oxidativ/apărare antioxidantă cu fiecare dintre acești factori de risc cardiovascular în analiză univariată, precum și cu numărul total al factorilor de risc, cu sexul și vârsta pacienților. De asemenea, la bolnavii care aveau coronarografie la intrarea în studiu am verificat relația dintre parametrii de stres oxidativ/apărare antioxidantă și severitatea angiografică a bolii coronariene, exprimată ca numărul arterelor coronare epicardice majore (interventriculară anterioară, circumflexă și coronară dreaptă) cu stenoze >50%.

În evaluarea relației stresului oxidativ și apărării antioxidante cu medicația de fond a pacienților cu cardiopatie ischemică am ținut cont de prezența în schema de tratament a acestor bolnavi a inhibitorilor enzimiei de conversie a angiotensinei și statinelor, clase de medicamente cu efecte antioxidante demonstrate.

### **Rezultate**

Lotul de pacienți cu cardiopatie ischemică a prezentat un nivel mai crescut al malondialdehidei plasmatică ( $3,23 \pm 3,10$  vs.  $1,47 \pm 0,41$  nmol/ml,  $p=0,017$ ) și valori mai scăzute ale grupărilor SH ( $0,21 \pm 0,06$  vs.  $0,26 \pm 0,05$  mmol/l,  $p=0,025$ ) și donorilor de protoni (inhibiție%  $39,77 \pm 13,10$  vs.  $50,89 \pm 11,71$ ,  $p=0,02$ ) față de lotul de control. Nu au existat variații semnificative ale proteinelor carbonilate ( $1,65 \pm 0,81$  vs.  $1,98 \pm 0,48$  nmol/mg proteine,  $p=0,154$ ) și glutatationului ( $21,24 \pm 19,34$  vs.  $16,76 \pm 3,88$   $\mu$ mol/l,  $p=0,315$ ) între cele două loturi.

În ceea ce privește relația parametrilor de stres oxidativ cu factorii de risc cardiovascular în lotul pacienților cu cardiopatie ischemică, nu am găsit asocieri semnificative între markerii studiați și diferiții factori de risc luați individual, cu excepția unui nivel mai scăzut al grupărilor SH la diabetici față de nondiabetici ( $0,18 \pm 0,04$  vs.  $0,24 \pm 0,06$  mmol/l,  $p=0,007$ ). Același parametru a fost singurul asociat și cu *numărul total* al factorilor de risc, constatându-se o reducere a nivelului grupărilor SH pe măsura acumulării factorilor de risc ( $0,18 \pm 0,03$  vs.  $0,27 \pm 0,03$  mmol/l pentru 3 vs. 0 factori de risc,  $p=0,017$ ).

Nu au existat variații semnificative ale parametrilor de stres oxidativ/apărare antioxidantă studiați în funcție de sexul și vârsta pacienților cu cardiopatie ischemică.

Nivelul grupărilor SH s-a asociat invers cu numărul arterelor coronare stenozate, scăzând pe măsura creșterii severității bolii coronariene ( $0,18 \pm 0,04$  vs.  $0,25 \pm 0,04$  mmol/l pentru 3 vs. 1 coronare stenozate,  $p=0,007$ ). Nu au existat relații semnificative între ceilalți parametri studiați și severitatea bolii coronariene.

În ceea ce privește medicația de fond cu efecte antioxidante, pacienții sub tratament cu IECA și statină precum și cei sub tratament doar cu statină au avut niveluri semnificativ mai crescute ale grupărilor SH față de bolnavii sub tratament doar cu IECA ( $0,22 \pm 0,06$  mmol/l la pacienții cu IECA+statină vs.  $0,16 \pm 0,003$  mmol/l la pacienții cu IECA vs.  $0,21 \pm 0,06$  mmol/l la pacienții cu statină,  $p=0,003$  pentru IECA+statină vs. IECA și  $p=0,05$  pentru statină vs. IECA). Pentru ceilalți parametri de stres oxidativ/apărare antioxidantă nu am găsit relații semnificative cu medicația de fond.

#### 4. Studiu 2. Valoarea prognostică a parametrilor de stres oxidativ în cardiopatia ischemică și modificarea lor sub tratament cu acid alfa-lipoic

##### Ipoteza de lucru

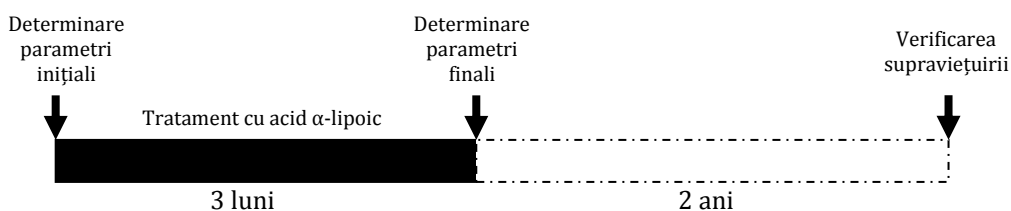
Ne-am propus identificarea unor parametri de stres oxidativ/apărare antioxidantă cu posibilă valoare prognostică la pacienții cu boală coronariană stabilă, și am urmărit evoluția parametrilor sub terapie antioxidantă. Ca tratament am ales acidul alfa-lipoic, un antioxidant ușor de administrat, fără efecte adverse semnificative, cu eficacitate demonstrată în tratamentul polineuropatiei diabetice dar puțin studiat în cardiopatia ischemică.

##### Material și metodă

Studiul a inclus aceleași lot de 21 de pacienți cu cardiopatie ischemică stabilă din studiul 1, cărora le-am administrat acid alfa-lipoic (Thiogamma ®) 600 mg/zi p.o. timp de 3 luni și am determinat parametrii de stres oxidativ/apărare antioxidantă la începutul studiului și la sfârșitul celor 90 de zile de tratament. Nivelul stresului oxidativ s-a cuantificat pe baza estimării modificărilor oxidative ale lipidelor plasmatice (prin dozarea malondialdehidei) și proteinelor plasmatice (prin determinarea grupărilor carbonil), iar capacitatea antioxidantă prin determinarea capacității de donare de hidrogen, a grupărilor SH și a glutatationului. Am analizat efectul tratamentului cu acid alfa-lipoic asupra markerilor dozați și am verificat dacă acest efect este influențat de fiecare dintre factorii majori de risc cardiovascular (fumat, hipertensiune arterială, diabet zaharat, hipercolesterolemie) și de numărul total al acestor factori de risc, precum și de prezența în schema de tratament a inhibitorilor enzimei de conversie a angiotensinei și statinelor, clase de medicamente cu efecte antioxidante demonstrate.

La 2 ani după terminarea terapiei cu acid alfa-lipoic am verificat telefonic supraviețuirea pacienților din studiu. Am testat dacă există diferențe între nivelul parametrilor de stres oxidativ/apărare antioxidantă, determinați la începutul studiului și la sfârșitul celor 3 luni de tratament, la pacienții care au supraviețuit versus cei decedați pe parcursul urmăririi.

Protocolul studiului este schematizat mai jos.



##### Rezultate

20 dintre pacienți (95,24%) au încheiat cele 3 luni de tratament cu acid alfa-lipoic; un pacient a decedat în timpul studiului. 17 pacienți (80,95%) erau încă în viață la 24 de luni de la ieșirea din studiu.

Dintre parametrii de stres oxidativ inițiali (la intrarea în studiu), grupările SH au avut valori semnificativ mai crescute la supraviețuitorii față de bolnavii decedați ( $0,22 \pm 0,06$  vs.  $0,16 \pm 0,04$  mmol/l,  $p=0,05$ ).



După 3 luni de tratament cu acid alfa-lipoic, singurul parametru modificat semnificativ la nivelul întregului lot de bolnavi au fost grupările SH, constatându-se o creștere în dinamică a nivelului acestui marker ( $0,25 \pm 0,06$  mmol/l final vs.  $0,21 \pm 0,06$  mmol/l inițial,  $p=0,007$ ).

La analiza răspunsului la tratament în funcție de factorii de risc cardiovascular, creșterea nivelului grupărilor SH a fost semnificativă la nefumători ( $0,21 \pm 0,06$  mmol/l inițial vs.  $0,25 \pm 0,07$  mmol/l final,  $p=0,02$ ), hipertensivi ( $0,20 \pm 0,05$  mmol/l inițial vs.  $0,25 \pm 0,07$  mmol/l final,  $p=0,01$ ), diabetici ( $0,18 \pm 0,04$  mmol/l inițial vs.  $0,24 \pm 0,08$  mmol/l final,  $p=0,03$ ) și pacienții cu colesterol normal ( $0,22 \pm 0,06$  mmol/l inițial vs.  $0,26 \pm 0,07$  mmol/l final,  $p=0,05$ ). De asemenea, a existat o scădere semnificativă a nivelului glutatationului la diabetici ( $21,59 \pm 13,69$   $\mu$ mol/l inițial vs.  $12,82 \pm 9,45$   $\mu$ mol/l final,  $p=0,05$ ).

La analiza răspunsului la tratament în funcție de sex, vârstă și medicația de fond, creșterea nivelului grupărilor SH a fost semnificativă la bărbați ( $0,20 \pm 0,06$  mmol/l inițial vs.  $0,26 \pm 0,06$  mmol/l final,  $p=0,004$ ), la pacienții sub 65 de ani ( $0,22 \pm 0,06$  mmol/l inițial vs.  $0,27 \pm 0,06$  mmol/l final,  $p=0,02$ ) și la cei care urmau tratament atât cu IECA cât și cu statină ( $0,22 \pm 0,06$  mmol/l inițial vs.  $0,26 \pm 0,06$  mmol/l final,  $p=0,05$ ).

La analiza pe quartile, creșterea nivelului grupărilor SH a fost semnificativă doar la pacienții din quartila cu cele mai scăzute niveluri inițiale ( $0,22 \pm 0,03$  mmol/l final vs.  $0,14 \pm 0,02$  mmol/l inițial,  $p=0,01$ ) și s-a constatat de asemenea o scădere semnificativă în dinamică a nivelului malondialdehidei ( $1,90 \pm 0,29$  nmol/ml final vs.  $7,32 \pm 4,42$  nmol/ml inițial,  $p=0,05$ ) și proteinelor carbonilate ( $1,58 \pm 0,54$  nmol/mg proteine final vs.  $2,81 \pm 0,66$  nmol/mg proteine inițial,  $p=0,02$ ) doar la pacienții din quartilele cu cele mai crescute niveluri inițiale.

Dintre parametrii de stres oxidativ/apărare antioxidantă de la finalul terapiei cu acid alfa-lipoic, supraviețuitorii au avut niveluri semnificativ mai înalte ale malondialdehidei ( $3,13 \pm 2,76$  vs.  $1,23 \pm 0,27$  nmol/ml,  $p=0,01$ ) și glutatationului ( $16,94 \pm 11,77$  vs.  $6,05 \pm 1,36$   $\mu$ mol/l,  $p=0,002$ ) față de pacienții care au decedat pe parcursul urmăririi.

## Discuții generale

Cercetarea actuală a fost compusă din două studii, efectuate pe același lot de pacienți cu boală coronariană stabilă. În cadrul primului studiu am căutat identificarea parametrilor care exprimă cel mai bine stresul oxidativ crescut și apărarea antioxidantă scăzută a acestor bolnavi, prin comparație cu un lot martor, și am verificat relația dintre acești parametri și principalii factori de risc cardiovascular, severitatea afectării coronariene și medicamentele cu efecte antioxidante din schema terapeutică de fond (IECA și statine). În cadrul celui de-al doilea studiu am urmărit evoluția parametrilor de stres oxidativ/apărare antioxidantă sub tratament antioxidant cu acid alfa-lipoic timp de 3 luni și am verificat dacă există diferențe semnificative între nivelul acestor parametri la bolnavii care au supraviețuit versus cei care au decedat la 2 ani după încheierea terapiei.

În concordanță cu datele din literatură, am găsit un nivel crescut al malondialdehidei plasmatică și un nivel scăzut al grupărilor SH la bolnavii coronarieni comparativ cu lotul martor. În plus, am identificat la acești bolnavi o activitate scăzută a donatorilor de protoni, un parametru mai puțin studiat, confirmând observațiile (fără semnificație statistică însă) ale unui studiu recent desfășurat în cadrul UMF Cluj.

Grupările SH au fost singurul parametru asociat semnificativ cu numărul factorilor de risc cardiovascular majori și cu numărul arterelor coronare stenozate, reflectând reducerea apărării antioxidante pe măsura acumulării factorilor de risc și creșterii severității bolii

coronariene. Trebuie însă menționat și comportamentul malondialdehidei plasmatică, care a avut valorile cele mai înalte la pacienții cu cei mai mulți factori de risc și la cei cu afectarea coronariană cea mai severă, dar aceste observații nu au atins semnificația statistică, posibil datorită lotului redus de pacienți.

Nu e astfel deloc surprinzătoare constatarea că bolnavii care au decedat pe parcursul urmăririi au avut un nivel semnificativ mai scăzut al grupărilor SH la intrarea în studiu, ceea ce sugerează valoarea prognostică a acestui marker. Creșterea nivelului grupărilor SH obținută după 3 luni de tratament cu acid alfa-lipoic deschide de aceea noi perspective terapeutice. Am reușit în plus identificarea unor grupe de bolnavi care au beneficiu maxim de pe urma acestei terapii (bolnavii cu cele mai scăzute niveluri inițiale ale grupărilor SH, bărbații, pacienții sub 65 ani, cei cu numărul cel mai mare de factori risc și bolnavii aflați deja sub tratament cu IECA și statină).

De menționat și faptul că, deși nivelurile malondialdehidei și proteinelor carbonilate nu s-au modificat sub tratament la nivelul întregului lot de pacienți, ele au scăzut semnificativ la bolnavii din quartilele cu cele mai crescute niveluri inițiale, adică tocmai bolnavii cu riscul cel mai înalt, sugerând posibilitatea individualizării tratamentului.

Identificarea unor niveluri finale mai înalte ale malondialdehidei și glutatationului la supraviețuitori față de bolnavii care ulterior au decedat este dificil de interpretat. Putem specula că apărarea antioxidantă mai eficientă a protejat supraviețuitorii de efectele detrimentală ale stresului oxidativ, însă în realitate este foarte posibil ca nivelul parametrilor de stres oxidativ/apărare antioxidantă atins după 3 luni de tratament cu acid alfa-lipoic să nu se fi menținut pe termen lung. În acest sens, probabil că relațiile găsite între markerii de stres oxidativ/apărare antioxidantă dinaintea începerii tratamentului și mortalitate sunt mai relevante pentru semnificația prognostică a acestor markeri.

Cercetarea actuală nu a urmărit beneficiile prognostice ale tratamentului cu acid alfa-lipoic. Pentru aceasta ar fi fost necesar un lot mult mai mare de pacienți și un lot placebo pentru comparație, precum și o durată mai lungă a tratamentului. Este de asemenea corect de precizat că, în absența unui lot placebo, nu se pot măsura cu acuratețe efectele suplimentare ale acidului alfa-lipoic față de cele ale medicamentelor cu acțiune antioxidantă deja existente în schema de tratament (IECA, statine). Cercetarea noastră a identificat însă un marker cu posibilă semnificație prognostică (grupările SH) și a demonstrat posibilitatea influențării lui terapeutice, sugerând efectele pozitive ale tratamentului cu acid alfa-lipoic pe termen lung. Cercetarea noastră a delimitat de asemenea grupele de pacienți care au beneficiu maxim de pe urma acestei terapii, creând premisele unui studiu mai amplu care să se adreseze ținut acestor bolnavi.

## **Concluzii generale**

1. Pacienții cu cardiopatie ischemică stabilă au un nivel crescut al stresului oxidativ, exprimat prin valori crescute ale malondialdehidei plasmatică, și o apărare antioxidantă scăzută, exprimată prin niveluri scăzute ale grupărilor SH și capacității de donor de protoni.
2. La pacienții cu boală coronariană stabilă, nivelul grupărilor SH este mai scăzut la diabetici față de nondiabetici, și scade pe măsura creșterii numărului factorilor de risc cardiovascular.
3. La pacienții cu boală coronariană stabilă, nivelul grupărilor SH scade pe măsura creșterii numărului arterelor coronare cu stenoze semnificative.

4. Dintre medicamentele cu efecte antioxidante dovedite folosite în mod uzual în terapia pacienților cu cardiopatie ischemică (IECA și statine), utilizarea statinelor, în combinație sau nu cu IECA, se asociază cu un nivel mai crescut al grupărilor SH față de monoterapia antioxidantă cu IECA.

5. Pacienții cu boală coronariană stabilă care au decedat pe parcursul urmăririi de durată au avut un nivel inițial semnificativ mai scăzut al grupărilor SH plasmatică față de supraviețuitori.

6. La pacienții cu boală coronariană stabilă, nivelul grupărilor SH a crescut semnificativ sub tratament timp de 3 luni cu acid alfa-lipoic 600 mg/zi p.o. Creșterea a fost semnificativă statistic la pacienții din quartila cu cel mai scăzut nivel inițial, la bărbați, la bolnavii sub 65 de ani și la cei aflați sub tratament combinat cu IECA și statină. La stratificarea în funcție de factorii de risc cardiovascular, creșterea a fost semnificativă la nefumători, la hipertensivi, la diabetici și la bolnavii cu colesterol normal.

7. La pacienții cu boală coronariană stabilă din quartilele cu cele mai înalte niveluri inițiale ale malondialdehidei și proteinelor carbonilate, nivelul acestor markeri a scăzut sub tratament cu acid alfa-lipoic 600 mg/zi p.o. timp de 3 luni.

8. La pacienții cu boală coronariană stabilă diabetici, nivelul glutationului a scăzut sub tratament cu acid alfa-lipoic 600 mg/zi p.o. timp de 3 luni.



---

# PhD THESIS

## OXIDATIVE STRESS IN CORONARY ARTERY DISEASE: PROGNOSTIC VALUE AND THERAPY

ABSTRACT

---

**PhD Researcher**

Marius-Alin Iliescu

---

**Scientific coordinator**

Prof. dr. Remus Orăsan

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	15
<b>1. Oxidative stress</b>	17
1.1 Definition	17
1.2 Reactive oxygen species	17
1.2.1 Superoxide anion	17
1.2.2 Other reactive oxygen species	20
<b>2. Antioxidant defence</b>	22
2.1 Antioxidant enzymes	22
2.1.1 Superoxide dismutases (SOD)	22
2.1.2 Catalase	22
2.1.3 Glutathione peroxidases	23
2.1.4 Peroxiredoxins	23
2.1.5 Ceruloplasmin	23
2.2 Chain-breaking antioxidants	24
2.2.1 Vitamin E	24
2.2.2 Vitamin C (ascorbic acid)	25
2.2.3 Carotenoids and vitamin A	25
2.2.4 Flavonoids	26
2.2.5 Thiol containing antioxidants	26
2.2.6 Uric acid	27
2.2.7 Bilirubin	27
2.2.8 Ubiquinol-10	27
2.2.9 Hormones with antioxidant activity	27
2.2.10 Nitric oxide	28
2.3 Sequestration of redox-active metal ions	28
2.4 Cellular response to oxidative stress	28
<b>3. Oxidative stress in coronary artery disease</b>	29
3.1 Intervention of oxidative stress in atherosclerosis	29
3.2 Cardiovascular risk factors and oxidative stress	30
3.2.1 Smoking and oxidative stress	31
3.2.2 Arterial hypertension and oxidative stress	34
3.2.3 Diabetes and oxidative stress	36
3.2.4 Hypercholesterolemia and oxidative stress	41
3.3 Antioxidant therapy in coronary artery disease	43
3.3.1 Antioxidant vitamins	43
3.3.2 Polyphenols	43
3.3.3 Thiol containing antioxidants	44
3.3.4 Xanthine oxidase inhibitors	44
3.3.5 Coenzyme Q	44
3.3.6 Antioxidant minerals	45
3.3.7 Other synthetic antioxidants	45
3.3.8 Drugs currently used in coronary artery disease patients with antioxidant effects	46
<b>PERSONAL RESEARCH</b>	48
<b>1. Research objectives</b>	49
<b>2. General methods</b>	50

2.1 Inclusion criteria and definitions of the cardiovascular risk factors studied	50
2.2 Methods for determining the parameters of oxidative stress studied	51
2.2.1 Fluorometric determination of plasma malondialdehyde	51
2.2.2 Assessment of protein carbonylation	51
2.2.3 Assessment of proton donor capacity	52
2.2.4 Measurement of SH groups	52
2.2.5 Measurement of glutathione	52
2.3 Statistical analysis	53
<b>3. Study 1. Oxidative stress in patients with coronary artery disease and its relationship with cardiovascular risk factors, coronary disease severity and background therapy</b>	<b>54</b>
3.1 Introduction	54
3.2 Working hypothesis	54
3.3 Materials and methods	55
3.4 Results	55
3.4.1 Characteristics of patients	55
3.4.2 Oxidative stress parameters in coronary artery disease patients vs. controls	57
3.4.3 Relationship of oxidative stress parameters with cardiovascular risk factors in patients with coronary artery disease	59
3.4.4 Relationship of oxidative stress parameters with gender and age in patients with coronary artery disease	72
3.4.5 Relationship of oxidative stress parameters with the number of significantly diseased coronary arteries	77
3.4.6 Relationship of oxidative stress parameters with background therapy	79
3.5 Discussion	82
3.6 Conclusions	84
<b>4. Study 2. Prognostic value of oxidative stress parameters in coronary artery disease and their modification on treatment with alpha-lipoic acid</b>	<b>86</b>
4.1 Introduction	86
4.2 Working hypothesis	86
4.3 Materials and methods	86
4.4 Results	87
4.4.1 Evolution of patients during follow-up	87
4.4.2 Relationship of baseline oxidative stress parameters with mortality	88
4.4.3 Modification of oxidative stress parameters on treatment with alpha-lipoic acid	90
4.4.4 Influence of cardiovascular risk factors on the response to treatment with alpha-lipoic acid	95
4.4.5 Influence of gender and age on the response to treatment with alpha-lipoic acid	108
4.4.6 Influence of baseline therapy on the response to treatment with alpha-lipoic acid	114
4.4.7 Relationship between oxidative stress parameters at the end of treatment with alpha-lipoic acid and mortality	117
4.5 Discussion	119
4.6 Conclusions	121
<b>5. General discussions</b>	<b>123</b>
<b>6. General conclusions</b>	<b>125</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>127</b>

**Keywords:** oxidative stress, antioxidant defence, coronary artery disease, prognosis, alpha-lipoic acid

## INTRODUCTION

Coronary artery disease is a major public health concern. Although coronary atheromatosis occurs from the first decades of life, it usually becomes symptomatic much later, after a long quiet development. Major cardiac events often occur suddenly, with devastating consequences.

Coronary artery disease patients have increased oxidative stress and low antioxidant defence. It has been proven that oxidative stress is involved in all stages of atheromatosis, from the first fatty streaks to the complications of the atherosclerotic plaque.

Based on these assumptions, different antioxidant therapies were tested in a hope to improve these patients' often guarded prognosis. The results were generally disappointing, none of the drugs tested entering the standard treatment regimen of coronary patients.

The reasons for these negative results are not clear; a lack of penetration of the antioxidant substances used inside the atherosclerotic plaques or a possible cardioprotective effect of the reactive oxygen species, mediated by ischemic preconditioning, were suggested. It must however be noted that the oxidative stress/antioxidant defence parameters evaluated in studies were very varied, their clinical relevance being in many cases uncertain.

In the current research we aimed to determine the parameters that best identify the coronary patient at high risk and that could have prognostic value. Next we tried to influence those parameters on antioxidant therapy, using alpha-lipoic acid, the only antioxidant currently used in clinical practice, in the treatment of diabetic polyneuropathy, but less studied in coronary artery disease patients. We also tried to identify groups of patients who derive maximum benefit from this treatment, on the assumption that individualization of therapy, a concept increasingly spread in modern medicine, may increase the response rate.

It was not our objective to demonstrate in this study the *clinical* efficacy of antioxidant treatment in coronary artery disease patients. This would be an unattainable goal at this scale, as suggested by the failure of trials on much larger groups of patients, with long-term follow-up. We believe nonetheless that the identification of oxidative stress/antioxidant defence parameters with true clinical significance and of a particular antioxidant therapy able to influence those parameters may serve as a starting point for larger trials which to obtain the expected clinical benefits for these patients.

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

### **Oxidative stress**

Oxidative stress represents an imbalance between the production of reactive oxygen species and the mechanisms of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence, resulting in excess reactive species generation, that induces oxidative damage to the cellular and molecular level.

Reactive oxygen species are molecules characterized by high chemical reactivity, able to act as oxidants. They include free radicals, such as superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) and hydroxyl ( $OH\cdot$ ), as well as other molecules which, although not radicals, have oxidizing properties, such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and peroxynitrite ( $ONOO\cdot$ ).



Cellular metabolism of aerobic organisms continuously generates reactive oxygen species. In small amounts, they play important physiological functions, intervening in cell-mediated immune response (hypochlorous acid HOCl) or as intra- and extracellular signal systems. In pathological conditions, excess reactive oxygen species generation or ineffective antioxidant defence cause amplification of oxidative stress, with detrimental effects in the whole body.

### **Antioxidant defence**

Human organisms possess many antioxidant mechanisms to defend against the deleterious effects of reactive oxygen species. These mechanisms work by preventing the generation of, or neutralizing the reactive oxygen species, or by repairing the cellular/tissue oxidative injuries.

*Antioxidant enzymes* inactivate the reactive oxygen species by catalysing their breakdown to less harmful compounds, usually in the intracellular environment. They are represented by superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidases, peroxiredoxins, ceruloplasmin.

*Chain-breaking antioxidants* are small molecules apt to receive an electron from a free radical or donate an electron to a free radical, forming a stable product. They encompass vitamins C, E, A and carotenoids, flavonoids, thiol containing antioxidants, uric acid, bilirubin, coenzyme Q10, nitric oxide and hormones with antioxidant activity (melatonin, 17 $\beta$ -oestradiol).

*"Sequestration" of redox-active metal ions*, such as iron and copper, which generate hydroxyl radicals through the Fenton reaction, is another antioxidant mechanism, accomplished by proteins such as haemoglobin, myoglobin, ferritin, transferrin, lactoferrin, albumin and ceruloplasmin.

Exposure of cells to oxidative stress activates *transcription factors* that translocate into the nucleus, inducing the expression of genes involved in the synthesis of antioxidant enzymes and phase 2 detoxifying enzymes. In the case of very severe oxidative stress, that exceeds cellular antioxidant defence systems, *apoptosis* supervenes, protecting the surrounding tissues by limiting the inflammatory response.

### **Oxidative stress in coronary artery disease**

Oxidative stress is closely correlated with the initiation and development of atherosclerosis, from the first appearance of fatty streaks to the complications of the atherosclerotic plaque.

There is abundant evidence on the role of oxidative stress as a common intermediate pathogenetic link for the main risk factors for coronary heart disease: smoking, diabetes, dyslipidemia and hypertension.

However, most studies that have tested the efficacy of antioxidant therapy in primary and secondary prevention of cardiovascular events failed to show a beneficial effect of antioxidants.

# PERSONAL RESEARCH

## Research objectives

We started from the assumption that, for finding an effective antioxidant treatment, it is first necessary to identify the parameters of oxidative stress/antioxidant defence with clear clinical impact, and subsequently the antioxidants able to significantly influence those parameters.

Therefore, the purpose of the present research was to identify the markers best associated with the presence of coronary artery disease and of cardiovascular risk factors and with the severity of coronary lesions. We then tried to establish which of these markers might have prognostic value and we tested the effect of antioxidant treatment on them.

We designed the current research as a pilot study to identify those markers of oxidative stress/antioxidant defence worth watching long-term and an antioxidant treatment able to influence these parameters, possibly serving as a starting point for larger trials able to also assess the clinical efficacy of antioxidant therapy.

## **Study 1. Oxidative stress in patients with coronary artery disease and its relationship with cardiovascular risk factors, coronary disease severity and background therapy**

### Working hypothesis

We sought to identify the markers of oxidative stress and antioxidant defence best correlated with the presence of coronary artery disease, by comparison of these markers between a group of patients with confirmed coronary artery disease and a group of healthy subjects. In the group of patients with coronary artery disease, we sought to identify the markers correlated with the presence of major cardiovascular risk factors (smoking, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia), gender and age of patients, number of epicardial coronary arteries with significant lesions and background medication.

### Materials and methods

We studied a group of 21 patients with stable coronary artery disease and a control group of 12 healthy subjects. In every subject we quantified oxidative stress by measuring the oxidative damage to plasma lipids (as the level of malondialdehyde) and proteins (as the level of carbonylated proteins), and we evaluated the antioxidant defence by determining the hydrogen donors, SH groups and glutathione. We compared the oxidative stress/antioxidant defence parameters between patients with coronary artery disease and subjects in the control group.

Plasma malondialdehyde was assayed by fluorescence, based on its reaction with thiobarbituric acid to form a fluorescent adduct. Determination of carbonylated proteins was performed by spectrophotometric measurement of 2,4-dinitrophenylhydrazone resulting from the reaction of carbonylated proteins with 2,4-dinitrophenyl hydrazine. Measurement of hydrogen donors was based on the reduction of the stable radical 1,1-diphenyl-picrilhydrazil (DPPH) by a series of nonenzymatic antioxidant serum components: glutathione, tocopherol,

ascorbic acid, reaction that can be assessed by the change of colour from purple to pale yellow, monitored by the modification of absorbance at 520 nm. Determination of SH groups was based on the colour reaction of these groups with 2,2-ditiobisnitrobenzoic acid (DTNB) (Ellman's reagent), and determination of glutathione was based on its reaction with o-phthalaldehyde to form a fluorescent product.

In patients with coronary artery disease we checked for the presence of hypertension, diabetes, hypercholesterolemia and cigarette consumption. We verified the relationship of oxidative stress/antioxidant defence markers with each of these cardiovascular risk factors in univariate analysis, as well as with the total number of risk factors, with age and gender of patients. Also, in patients who had had coronary angiography at baseline we verified the relationship between the parameters of oxidative stress/antioxidant defence and the severity of angiographic coronary artery disease, expressed as the number of major epicardial coronary arteries (left anterior descending, circumflex and right coronary arteries) with >50 % stenosis.

In assessing the relationship of oxidative stress and antioxidant defence with background therapy in patients with coronary artery disease, we checked if the treatment regimen included angiotensin converting enzyme inhibitors and statins, classes of drugs with proven antioxidant effects.

## Results

The group of patients with coronary artery disease showed higher levels of plasma malondialdehyde ( $3.23 \pm 3.10$  vs.  $1.47 \pm 0.41$  nmol/ml,  $p=0.017$ ) and lower levels of SH groups ( $0.21 \pm 0.06$  vs.  $0.26 \pm 0.05$  mmol/l,  $p=0.025$ ) and proton donors ( $39.77 \pm 13.10$  vs.  $50.89 \pm 11.71$  % inhibition,  $p=0.02$ ) than the control group. There were no significant differences in carbonylated proteins ( $1.65 \pm 0.81$  vs.  $1.98 \pm 0.48$  nmol/mg protein,  $p=0.154$ ) and glutathione ( $21.24 \pm 19.34$  vs.  $16.76 \pm 3.88$   $\mu$ mol/l,  $p=0.315$ ) levels between the two groups.

Regarding the relationship between oxidative stress parameters and the cardiovascular risk factors in the group of patients with coronary artery disease, we found no significant associations of the markers studied with the various risk factors in univariate analysis, except for a lower level of SH groups in diabetics versus nondiabetics ( $0.18 \pm 0.04$  vs.  $0.24 \pm 0.06$  mmol/l,  $p=0.007$ ). SH groups were also the only parameter associated with the *total number* of risk factors, as we noticed a progressive decrease in the levels of this marker with accumulation of risk factors ( $0.18 \pm 0.03$  vs.  $0.27 \pm 0.03$  mmol/l for 3 vs. 0 risk factors,  $p=0.017$ ).

There were no significant relations of the markers of oxidative stress/antioxidant defence with gender and age in patients with coronary artery disease.

Levels of SH groups were associated inversely with the number of stenosed coronary arteries, progressively decreasing with increasing severity of coronary artery disease ( $0.18 \pm 0.04$  vs.  $0.25 \pm 0.04$  mmol/l for 3 vs. 1 stenosed coronary arteries,  $p=0.007$ ). There were no significant relations between other parameters studied and the severity of coronary artery disease.

Regarding background antioxidant therapy, patients treated with ACE inhibitors and statins and those treated only with statins had significantly higher levels of SH groups than patients treated only with ACE inhibitors ( $0.22 \pm 0.06$  mmol/l in patients with ACEI+statins vs.  $0.16 \pm 0.003$  mmol/l in patients with ACEI vs.  $0.21 \pm 0.06$  mmol/l in patients with statins,  $p=0.003$  for ACEI+statins vs. ACEI and  $p=0.05$  for statins vs. ACEI). For other parameters of oxidative stress/antioxidant defence we didn't find significant associations with background medication.

## Study 2. Prognostic value of oxidative stress parameters in coronary artery disease and their modification on treatment with alpha-lipoic acid

### Working hypothesis

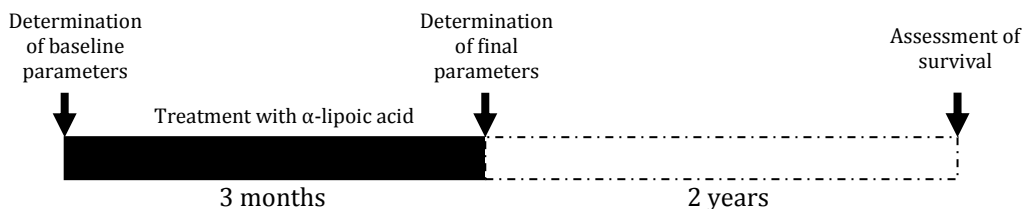
We aimed to identify the parameters of oxidative stress/antioxidant defence with potential prognostic value in patients with stable coronary artery disease, and assessed the evolution of parameters on antioxidant therapy. We opted for the treatment with alpha-lipoic acid, an easy to administer antioxidant with no significant adverse effects, with proven efficacy in the treatment of diabetic polyneuropathy but scarcely studied in coronary artery disease.

### Materials and methods

The study included the same group of 21 patients with stable coronary artery disease in study 1, to whom we administered alpha-lipoic acid (Thiogamma ®) 600 mg/day orally for 3 months and we determined the parameters of oxidative stress/antioxidant defence at baseline and after 90 days of treatment. Oxidative stress was assessed by measuring the oxidative modifications of plasma lipids (as the level of malondialdehyde) and proteins (as the level of carbonylated proteins), and antioxidant defence was assessed by determining the hydrogen donors, SH groups and glutathione. We examined the effect of the treatment with alpha-lipoic acid on the mentioned markers and verified whether this effect was influenced by each of the major cardiovascular risk factors (smoking, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia) and by the total number of these risk factors, as well as by the presence in the treatment regimen of angiotensin converting enzyme inhibitors and statins, classes of drugs with proven antioxidant effects.

We verified by telephone patients' survival 2 years after they had ended the therapy with alpha-lipoic acid. We compared the parameters of oxidative stress/antioxidant defence, determined at baseline and after the 3 months of treatment, in patients who survived versus those who died during follow-up.

The study protocol is summarized below.



### Results

20 patients (95.24%) have completed the 3 months treatment with alpha-lipoic acid; one patient died during the study. 17 patients (80.95%) were still alive 24 months after the end of treatment.

Of the baseline oxidative stress parameters, SH groups had significantly higher levels in survivors compared to the patients that subsequently died ( $0.22 \pm 0.06$  vs.  $0.16 \pm 0.04$  mmol/l,  $p=0.05$ ).

After 3 months of treatment with alpha-lipoic acid, the only parameter that varied significantly in the whole group of patients were SH groups, with a dynamic increase in the

levels of this marker ( $0.25\pm 0.06$  mmol/l post-treatment vs.  $21\pm 0.06$  mmol/l at baseline,  $p=0.007$ ).

When analysing the influence of cardiovascular risk factors on the response to treatment, the increase in SH groups was significant in nonsmokers ( $0.21\pm 0.06$  mmol/l at baseline vs.  $0.25\pm 0.07$  mmol/l post-treatment,  $p=0.02$ ), hypertensives ( $0.20\pm 0.05$  mmol/l at baseline vs.  $0.25\pm 0.07$  mmol/l post-treatment,  $p=0.01$ ), diabetics ( $0.18\pm 0.04$  mmol/l at baseline vs.  $0.24\pm 0.08$  mmol/l post-treatment,  $p=0.03$ ) and patients with normal cholesterol levels ( $0.22\pm 0.06$  mmol/l at baseline vs.  $0.26\pm 0.07$  mmol/l post-treatment,  $p=0.05$ ). Also, there was a significant decrease in glutathione levels in diabetics ( $21.59\pm 13.69$   $\mu$ mol/l at baseline vs.  $12.82\pm 9.45$   $\mu$ mol/l post-treatment,  $p=0.05$ ).

When analysing the influence of gender, age and background medication on the response to treatment, the increase in SH groups was significant in men ( $0.20\pm 0.06$  mmol/l at baseline vs.  $0.26 \pm 0.06$  mmol/l post-treatment,  $p=0.004$ ), in patients under 65 years of age ( $0.22\pm 0.06$  mmol/l at baseline vs.  $0.27\pm 0.06$  mmol/l post-treatment,  $p=0.02$ ) and in those who were receiving combined therapy with ACE inhibitors and statins ( $0.22\pm 0.06$  mmol/l at baseline vs.  $0.26\pm 0.06$  mmol/l post-treatment,  $p=0.05$ ).

When performing the quartile analysis, the increase in SH groups was significant only in patients in the lowest quartile of baseline levels ( $0.22\pm 0.03$  mmol/l post-treatment vs.  $0.14\pm 0.02$  mmol/l at baseline,  $p=0.01$ ), and we also found a significant dynamic decrease in malondialdehyde ( $1.90\pm 0.29$  nmol/ml post-treatment vs.  $7.32\pm 4.42$  nmol/ml at baseline,  $p=0.05$ ) and carbonylated proteins ( $1.58\pm 0.54$  nmol/mg protein post-treatment vs.  $2.81\pm 0.66$  nmol/mg protein at baseline,  $p=0.02$ ) only in patients in the highest quartiles of baseline levels of these markers.

Of the parameters of oxidative stress/antioxidant defence at the end of therapy with alpha-lipoic acid, survivors had significantly higher levels of malondialdehyde ( $3.13\pm 2.76$  vs.  $1.23\pm 0.27$  nmol/ml,  $p=0.01$ ) and glutathione ( $16.94\pm 11.77$  vs.  $6.05\pm 1.36$   $\mu$ mol/l,  $p=0.002$ ) than patients who died during follow-up.

## **General discussions**

The current research consisted of two studies conducted on the same group of patients with stable coronary artery disease. In the first study we sought to identify the parameters that best express the increased oxidative stress and decreased antioxidant defence of these patients, by comparison with a control group, and verified the relationship between these parameters and major cardiovascular risk factors, the severity of coronary lesions and the presence of drugs with antioxidant effects in the background treatment regimen (ACE inhibitors and statins). In the second study we followed-up the parameters of oxidative stress/antioxidant defence on antioxidant treatment with alpha-lipoic acid for 3 months and verified whether there were significant differences in the levels of these parameters between patients who survived and those who died 2 years after therapy.

Consistent with the literature, we found increased levels of malondialdehyde and low levels of SH groups in coronary patients compared with controls. In addition, we identified in these patients low activity of proton donors, a less studied parameter, confirming the observations (in that case without statistical significance) of a recent study conducted in UMF Cluj.

SH groups were the only parameter significantly associated with the number of major cardiovascular risk factors and with the number of stenosed coronary arteries, reflecting

progressive decrease of antioxidant defence with accumulation of risk factors and with increasing severity of coronary artery disease. It should be also mentioned, however, the behaviour of plasma malondialdehyde, which had the highest levels in patients with the greatest number of risk factors and in those with the most severe coronary artery disease, but these observations did not reach statistical significance, possibly due to the small patient lot.

There is thus no surprise that patients who died during follow-up had significantly lower levels of SH groups at baseline, which suggests a prognostic value of this marker. The increase in SH groups attained after 3 months of treatment with alpha-lipoic acid opens therefore new therapeutic perspectives. We also identified groups of patients who derive maximum benefit from this therapy (patients with lowest baseline levels of SH groups, men, patients under 65 years of age, those with the highest number of risk factors and patients already on treatment with ACE inhibitors and statins).

It's also worth mentioning that, although the levels of malondialdehyde and carbonylated proteins were not altered under treatment for the entire group of patients, they were significantly lowered in patients in the highest quartiles of baseline levels, that are just the patients at the highest risk, which suggests a benefit of individualized therapy.

The higher post-treatment levels of malondialdehyde and glutathione in survivors compared to patients who subsequently died are difficult to interpret. We can speculate that the better antioxidant defence protected survivors against the detrimental effects of oxidative stress, but in fact it is quite possible that the parameters of oxidative stress/antioxidant defence attained after 3 months of treatment with alpha-lipoic acid were not maintained long-term. Accordingly, it's likely that the relationships found between the markers of oxidative stress/antioxidant defence pre-treatment and mortality are more relevant for the prognostic significance of these markers.

The current research has not sought to assess the prognostic benefits of treatment with alpha-lipoic acid. Such an approach would require a much larger group of patients and a control group for comparison, as well as a longer duration of treatment. We should also admit that, with no placebo group, one cannot accurately separate the additional effects of alpha-lipoic acid from the antioxidant effects of the drugs in the background treatment regimen (ACE inhibitors, statins). Nonetheless, our research has identified a marker with potential prognostic significance (SH groups) and proved the possibility of therapeutically influencing this marker, suggesting the positive effects of long-term treatment with alpha-lipoic acid. It has also identified groups of patients that derive maximum benefit from this therapy, creating the premises of a larger study specifically addressing those patients.

## **General conclusions**

1. Patients with stable coronary artery disease have increased oxidative stress, expressed by elevated plasma malondialdehyde levels, and decreased antioxidant defence, expressed by low levels of SH groups and proton donors.
2. In patients with stable coronary artery disease, levels of SH groups are lower in diabetics compared to nondiabetics, and decrease with increasing number of cardiovascular risk factors.
3. In patients with stable coronary artery disease, levels of SH groups decrease with increasing number of coronary arteries with significant stenoses.

4. Of drugs with proven antioxidant effects commonly used in the treatment of patients with coronary artery disease (ACE inhibitors and statins), the use of statins, whether or not in combination with ACE inhibitors, is associated with higher levels of SH groups compared to antioxidant monotherapy with ACE inhibitors.
5. Patients with stable coronary artery disease who died during follow-up had significantly lower baseline levels of plasma SH groups compared to survivors.
6. In patients with stable coronary artery disease, levels of SH groups increased on treatment with alpha-lipoic acid 600 mg/day orally for 3 months. The increase was statistically significant in patients in the lowest quartile of baseline levels, in men, in patients under 65 years of age and in those on combined background therapy with ACE inhibitors and statins. Stratification according to cardiovascular risk factors showed that the increase was significant in nonsmokers, in hypertensives, in diabetics and in patients with normal cholesterol levels.
7. In patients with stable coronary artery disease in the highest quartiles of baseline levels of malondialdehyde and carbonylated proteins, there was a decrease of those parameters on treatment with alpha-lipoic acid 600 mg/day orally for 3 months.
8. In diabetic patients with stable coronary artery disease, glutathione levels decreased on treatment with alpha-lipoic acid 600 mg/day orally for 3 months.