

ARTICOLE ORIGINALE

CZU: 616.12-009.72-092-07:[616.34-008.87+616-018.74]
<https://doi.org/10.52692/1857-0011.2023.1-75.01>

ROLUL DISBIOZEI INTESTINALE ÎN DISFUNȚIA ENDOTELIALĂ LA PACIENȚII CU ANGINĂ MICROVASCULARĂ

¹Mihail POPOVICI, dr. hab. șt. medicale, prof. universitar, academician al AȘM.

³Loffredo LORENZO, Doctor of Medical Sciences,

¹Victoria IVANOV, doctor habilitat în științe medicale, prof. cercetător,

¹Ion POPOVICI, doctor habilitat în științe medicale, prof. cercetător,

¹Lucia CIOBANU, doctor habilitat în științe medicale, conf. cercetător,

¹Mihaela MUNTEANU, doctor în științe medicale, cercetător științific

¹Ion POPOVICI, student medicinist, anul VI

²Valeriu COBET, doctor habilitat în științe medicale, prof. universitar

¹IMSP Institutul de Cardiologie, Republica Moldova, Chișinău

²IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău

³Department of Clinical, Internistic, Anaesthetic and Cardiovascular Sciences,
Sapienza University of Rome, Rome, Italy

e-mail: popovicim@gmail.com

Rezumat.

Scop. Evaluarea nivelurilor circulante ale lipopolizaharidei și zonulinei în contiguitate cu markerii disfuncției endoteliale, inflamației și stresului oxidativ la pacienții cu angină microvasculară (AM).

Material și metode. Studiul s-a realizat pe un lot de 58 de pacienți cu AM spitalizați în Institutul de Cardiologie. Determinarea nivelurilor circulante ale 20 de biomarkeri s-a realizat în cooperare cu centrul de investigare de laborator din Universitatea Sapienza (Italia). Toți markerii funcționali și biochimici menționați au fost determinați și la 48 de persoane aparent sănătoase (lotul control) cu valorile cărora s-au comparat markerii pacienților cu AM.

Rezultate. Disfuncția endotelială la pacienții cu AM a excelat prin creșterea grosimii complexului intimă-medie a a.carotide cu 41%, precum și reducerea valorii dilatării arterei brahiale mediate de flux (FMD) cu 31,6%. Prezența disbiozei s-a manifestat prin creșterea cu 80% a conținutului seric al lipopolizaharidelor și prin dublarea zonulinei ($1,8 \pm 0,3$ vs $3,6 \pm 0,7$ ng/ml). Disfuncția endotelială și disbioza au evoluat pe fundalul activării stresului oxidativ estimat prin intermediul a 6 markeri și majorarea conținutului seric al 6 importanți markeri proinflamatori (hsCRP, IL-6, TNF- α , etc.)

Concluzii. 1. La pacienții cu AM s-au constatat niveluri circulante elevate mai mult ca dublu ale LPZ și zonulinei față de valoarea control, fapt ce indică asupra prezenței disbiozei intestinale. 2. LPZ și zonulina se corelează robust cu markerii morfofuncționali și biochimici ai disfuncției endoteliale, precum și cu markerii factorilor patogenetici principali ai acesteia, - inflamației și stresului oxidativ.

Cuvinte cheie: Disbioză, angina microvasculară, lipopolizaharide, zonulina.

Резюме. Роль кишечного дисбиоза в развитии эндотелиальной дисфункции у больных с микрососудистой стенокардией.

Цель. Определение циркулирующих уровней липополисахарида и зонулина в сочетании с маркерами эндотелиальной дисфункции, воспаления и оксидативного стресса у больных микрососудистой стенокардией (МС).

Материал и методы. Исследование было проведено на 58 больных с МС, госпитализированных в Институте кардиологии. Определение циркулирующих уровней 20 биомаркеров было проведено совместно с лабораторным исследовательским центром Университета Сапиенца (Италия). Все функциональные и биохимические маркеры также определяли у 48 практически здоровых людей (контрольная группа), с величинами которых сравнивали маркеры больных МС.

Результаты. Эндотелиальная дисфункция у больных с МС проявлялась увеличением толщины комплекса интима-медиа сонной артерии на 41%, а также снижением величины реактивной дилатации плечевой артерии (FMD) на 31,6%. О наличии дисбиоза свидетельствовало увеличение содержания липополисахаридов (ЛПС) в сыворотке крови на 80%, а также удвоение сывороточного содержания зонулина ($1,8 \pm 0,3$ vs $3,6 \pm 0,7$ нг/мл). Эндотелиальная дисфункция и дисбактериоз развивались на фоне активации оксидативного стресса, оцениваемого по характеру изменения 6-и маркеров, а также повышения сывороточного содержания 6-и значимых провоспалительных маркеров (hsCRP, IL-6, TNF- α и др.).

Выводы. 1. У больных МС выявлено повышение циркулирующих уровней ЛПС на 81% и зонулина более чем в 2 раза по сравнению с контролем, что свидетельствует о наличии дисбактериоза кишечника. 2. ЛПС и зонулин тесно коррелируют с морфофункциональными и биохимическими маркерами эндотелиальной дисфункции, а также с маркерами её основных патогенетических факторов - воспаления и оксидативного стресса.

Ключевые слова: дисбиоз, микрососудистая стенокардия, липополисахариды, зонулин.

Summary. The role of intestinal dysbiosis in endothelial dysfunction evolution in patients with microvascular angina.

Purpose. Evaluation of circulating levels of lipopolysaccharide and zonulin in conjunction with markers of endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in patients with microvascular angina (MA).

Material and methods. The study was carried out in a group of 58 patients with MA hospitalized in the Institute of Cardiology. The determination of circulating levels of 20 biomarkers was carried out in cooperation with the laboratory investigation center of Sapienza University (Italy). All functional and biochemical markers were also determined in 48 apparently healthy people (control group) with the values of which the markers of MA patients were compared.

Results. Endothelial dysfunction in patients with MA excelled by increasing the thickness of the intima-media complex of the carotid artery by 41%, as well as by reducing of flow-mediated brachial artery dilatation (FMD) by 31,6%. The presence of dysbiosis was manifested by an 80% increase in the serum content of lipopolysaccharides (LPS) and by doubling of zonulin ($1,8 \pm 0,3$ vs $3,6 \pm 0,7$ ng/ml). Endothelial dysfunction and dysbiosis evolved in association with oxidative stress activation estimated by means of 6 markers and increased serum content of 6 important pro-inflammatory markers (hsCRP, IL-6, TNF- α , etc.)

Conclusions. 1. In patients with MA, elevated circulating levels of LPS and zonulin more than twice compared to the control value were found, which indicates the presence of intestinal dysbiosis. 2. LPS and zonulin correlate robustly with morphofunctional and biochemical markers of endothelial dysfunction, as well as with markers of its main pathogenetic factors, - inflammation and oxidative stress.

Key words: Dysbiosis, microvascular angina, lipopolysaccharides, zonulin.

Introducere

Angina microvasculară (AM) reprezintă un simptom clinic manifestat prin episodul algic retrosternal cu o durată de la 10 min până la 1 oră în stresul fizic, mental sau chiar repaos, care fiziopatologic este cauzat de disfuncția endotelială și periclitarea reactivității sistemului microcirculator coronarian (1, 2, 3). Deși prezența ischemiei miocardului este atestată în examenul electrofiziologic, angiocoronarografia nu demonstrează obturația arterelor coronariene epicardice, or aceasta <50% în asociere cu rezerva fluxului fracțional >0,80), criteriul diagnostic principal fiind reducerea rezervei funcționale coronariene (RFC) în testul invaziv cu efort farmacologic (4, 5). Disfuncția coronariană microcirculatorie se anunță prezență în cel puțin 30% din cazurile de angină, influențând notabil indicii morbidității și mortalității, riscul evenimentelor cardiovasculare majore și al evoluției insuficienței cardiace (1, 6, 7).

Termenul de ACM a fost consolidat în cardiologie în ultima decadă a sec. XX, entitatea căruia a fost decelată ca un „răspuns vasodilatator neadekvat al microcirculației coronariene sau un răspuns patologic vasoconstrictor la diferite manevre de stres farmacologic fiziologic” (8). Testul farmacologic cu adenzină în vederea aprecierii valorii RFC, drept incrementul procentual al fluxului coronarian în vârful hiperemiei metabolice, este recunoscut actualmente, ca cel mai relevant și precis test diagnostic al AM.

În sistemul coronarian arterele coronariene epicardice (diametrul >400 μ m), vizualizate în cadrul angiocoronarografiei, ocupă o cotă de până la 10%, astfel, că componenta vasculară de bază este reprezentată de sistemul coronarian microcirculator, care cuprinde pre-arteriole (100–400 μ m), arteriole (<100 μ m) și capilare (<10 μ m). Pre-arteriolele se caracterizează prin declinul presiunii sângelui pe itinerarul lor, iar arteriolele excelează prin tonusul vascular bazal ridicat, precum și rezistența coronariană inerentă, dar, totodată, dispun de cea mai mare capacitate cumulativă de dilatare sau constricție la acțiunea factorilor vasotropi naturali. În acest context este de menționat, că endoteliul coronarian controlează abilitatea de dilatare a arteriolelor la acțiunea oxidului nitric (NO) și adenzinei sau gradul de contracție a acestora la acțiunea endotelinei-1 (ET-1), cel mai potent agent vasoconstrictor natural, nivelul căruia elevează în sânge odată cu disfuncția endotelială (9). Stresul hemodinamic iminent pre-arteriolelor stimulează nitric oxid sintaza endotelială (eNOS) din arteriole conducând la eliberarea NO și, respectiv, la dilatarea mediei musculare prin intermediul GMP ciclic (GMPc).

Totodată, NO este implicat și în promovarea efectului de dilatare a arteriolelor propriu adenzinei, dată fiind stimularea de către GMPc a fosfatazei lanțurilor ușoare de miozină, fapt ce rezultă în defosforilarea acestora, dezbinarea legăturilor actin-miozinice și declanșarea relaxării (10). NO de asemenea contra-

carează și efectul coronaroconstrictor al ET-1 mediat de receptorii ET-1, care prin intermediul Rho-kinazei inhibă fosfataza lanțurilor ușoare de miozină și conduce la contracția miocitelor netede vasculare (11). Expresia crescută a Rho-kinazei pe fondalul carenței de NO se estimează și drept un mecanism patogenic al anginei vasospastice cauzată de spasmul arterei epicardice neobturată sau chiar de spasmul segmentar al acesteia, iar capacitatea Rho-kinazei de a susține răspunsul inflamator al peretelui vascular justifică aportul ei plauzibil în leziunea endotelială (12).

Evaluarea factorilor ce cauzează disfuncția endotelială la pacienții cu AM este importantă la conotația evidențierii markerilor de diagnostic și prognostic, precum și a reperelor de optimizare a tratamentului patogenic. Opinia conceptuală coroborată aduce la apel rolul factorilor de risc cardiovascular clasici (ie, diabetul zaharat, hipertensiunea arterială, dislipidemiile, tabagismul, etc.) care sunt implicați în procesul de leziune aterosclerotică, care prin patenul stenoizant se manifestă detrimental asupra perfuziei coronariene. Disfuncția endotelială este în acest context premergătoare și la nivelul microcirculației coronariene rezultă primar în deficiență de NO, care devine ulterior un mecanism patogenic al injuriei aterosclerotice. În plan fiziopatologic inflamația și stresul oxidativ se consideră componentele cheie ale interfeței patogenetice ale disfuncției endoteliale și carenței de NO, iar markerii respectivi sunt incluși în algoritmul diagnostic al disfuncției microcirculatorii coronariene (13). Este inteligibil, că dovada implicării și altor factori, în afara celor clasici de risc cardiovascular, în exercițiul disfuncției endoteliale la pacienții cu AM va facilita completarea conceptului, optimizarea diagnosticului și prognosticului, precum și va oferi repere de tratament patogenic personalizat.

Un factor endogen capabil să declanșeze un răspuns inflamator și o formare exagerată de specii reactive de oxigen (SRO) este endotoxina derivată din membrana bacteriilor gram-negative, care biochimic reprezintă o lipopolizaharidă (LPZ). Elevarea ei în sânge are loc în cadrul translocării intestinale în cadrul afectării probiotice (sau disbiozei intestinale) pe fondalul creșterii permeabilității barierei intestinale. Dishomeostazia cauzată de LPZ este cunoscută în contextul activării receptorilor Toll-like (în special tipul 4) expesați pe membrana diferitor celule și activarea enzimei membranare NOX₂ (14, 15, 16, 17). Stimularea receptorilor Toll-like 4 conduce prin intermediul factorului nuclear kappaB (NF-kB) la activarea programului proinflamator al celulei și sinteza citokinelor proinflamatoare. Niveluri circulante medii ale LPZ condiționează o inflamație cronică sau inflamație sistemică sau inflamație subclinică („low

grade inflammation”) care se manifestă prin declinul expresiei eNOS și al oxidului nitric. Activarea NOX₂ rezultă în formarea excesivă a anionului superoxid (O₂⁻), un radical agresiv al familiei ROS.

Astfel, perturbarea barierei intestinale este o precondiționare importantă a elevării nivelului circulant al LPZ și riscului iminent al inflamației și stresului oxidativ, iar zonulina, markerul afectării joncțiunilor intercelulare în epitelul intestinal ce facilitează translocarea rezidurilor alimentare și bacteriene impune un rol diagnostic deosebit.

Sunt solitare relatări privind legătura între nivelul LPZ inerent disbiozei intestinale și afecțiunile hepatice și neurogenerative ale creierului (18, 19). Este de asemenea tratată plauzibil legătura disbiozei intestinale cu ateroscleroza, hipertensiunea arterială și efectele cardiovasculare adverse ale fibrilației atriale (17, 20, 21, 22), dar nu sunt evidențe analoage vizavi de caracterul modificării LPZ și a markerului afectării barierei intestinale (zonulinei) în AM.

Astfel, **scopul** studiului a constat în:

Evaluarea nivelurilor circulante ale LPZ și zonulinei în contiguitate cu markerii disfuncției endoteliale, inflamației și stresului oxidativ la pacienții cu AM.

Material și metode

Studiul s-a realizat pe un lot de 58 de pacienți cu AM spitalizați în IMSP Institutul de Cardiologie, diagnosticul căreia a fost consolidat conform prevederilor grupului internațional de evaluare a tulburărilor vasomotorii (Vasomotion Disorders International Study Group): simptome iminente ischemiei miocardului (subiective, obiective și ECG), absența unei obturații notabile a arterei coronariene epicardice (diametrul <50% și rezerva fluxului fracționat >0,80), precum și reducerea rezervei funcționalei coronariene (RFC) în testul invaziv farmacologic (24). În studiu n-au fost incluși pacienții cu insuficiență hepatică și renală (creatinina serică >2.8 mg/dL), infarct miocardic acut, accident vascular cerebral acut, chimioterapie, maladii inflamatorii, inclusiv intestinale, administrarea antibioticelor.

Indicii demografici, clinici și paraclinici explorați ai pacienților cu AM au fost incluși într-un Chestionar special cu un cumulativ de 130 de nominalizări. Cei mai importanți sunt prezentați în tabelul 1.

Determinarea nivelurilor circulante ale biomarkerilor s-a realizat în cooperare cu centrul de investigație de laborator din Universitatea Sapienza (Italia).

Panoul multi-marker a inclus:

- Markerii morfo-funcționali ai disfuncției endoteliale determinați prin ecografie cu Doppler efect:
 - Rata dilatării arterei brahiale mediate de flux (FMD).

Tabelul 1

Caracteristica clinică și paraclinică a pacienților cu AM

| Indici | n | % | M±SD |
|---|-------|-------|----------|
| Bărbați/femei | 14/44 | 25/75 | |
| Vârsta | | | 63,4±9,5 |
| Indicele masei corporale, kg/m ² | | | 28,2±3,9 |
| Diabet zaharat | 11 | 19 | |
| Dislipidemie | 53 | 92 | |
| Hipertensiune arterială (HTA) | 55 | 95 | |
| Tabagism în ultimii 5 ani | 6 | 11 | |
| NSTEMI în anamneză | 5 | 9 | |
| AVC ischemic în anamneză | 2 | 4 | |
| Insuficiența cardiacă: | | | |
| NYHA I | 3 | 6 | |
| NYHA II | 48 | 83 | |
| NYHA III | 7 | 12 | |
| Tratament: | | | |
| Statine | 7 | 12 | |
| Antiplateletare | 52 | 90 | |
| Beta-adrenoblocante | 52 | 90 | |
| Antagoniștii canalelor de calciu | 41 | 71 | |
| Nitrați | 7 | 12 | |
| Inhibitorii ECA | 37 | 64 | |
| Blocantele receptorului AT ₁ | 13 | 23 | |
| Diuretice | 19 | 33 | |
| Remedii metabolice (eg, Trimetazidin) | 6 | 11 | |
| Date de laborator: | | | |
| LDL-colesterol (mM/L) | | | 3,5±0,4 |
| HDL-colesterol (mM/L) | | | 1,3±0,1 |
| Trigliceride (mM/L) | | | 2,8±0,2 |
| VSH (mm/oră) | | | 17,4±2,1 |
| Scorul clinic DUKE: | | | |
| Angină tipică | 53 | 92 | |
| Angină atipică | 5 | 8 | |

Notă: M±SD – media ± devierea standard.

- Grosimea complexului intimă-medie a arterei carotide comune (acİM).

• Markerii circulanți ai disfuncției endoteliale determinați prin metoda ELISA și kit-uri speciale de calorimetrie:

- NO.
- ET-1.
- S-nitrozotiolii.

• Markerii disbiozei intestinale determinați prin metoda ELISA:

- Lipopolizaharidele (LP).
- Zonulina.

• Markerii inflamației determinați prin metoda ELISA:

- Proteina C reactivă înalt sensibilă (hsCRP).
- Interleukina 6 (IL-6).

- Factorul de necroză a tumorii alpha (TNF-α)
- Proteina chemoattractantă a monocitelor (MCP-1).
- sCD-140 (markerul CD solubil).
- Produsele finale ale glicării (AGEs).

• Markerii stresului oxidativ determinați prin metoda ELISA:

- NOX₂.
- Peroxidul de hidrogen (H₂O₂).
- Rata de degradare a peroxidului de hidrogen (RD-H₂O₂).
- Superoxiddismutaza (SOD).
- Catalaza.
- Dialdehida malonică (DAM).

Toți markerii funcționali și biochimici menționați au fost determinați și la 48 de persoane aparent sănătoase (lotul control) cu valorile cărora s-au comparat markerii pacienților cu AM.

Procesare statistică a materialului cifric a inclus determinarea mediei (M), devierii standard (SD), valorii p (<0,05 discrepanța era considerată semnificativă), precum și a indicelui de corelare Spearman, r.

Rezultate

Aprecierea markerilor remodelării vasculare periferice a stabilit prezența disfuncției endoteliale la pacienții cu AM (tabelul 2).

Tabelul 2

Markerii morfo-funcționali ai disfuncției endoteliale

| Indice | Lot AM | Lot control | p |
|-----------|----------|-------------|--------|
| FMD (%) | 9,3±1,7 | 13,6±1,9 | <0,001 |
| acIM (mm) | 1,32±0,2 | 0,94±0,1 | <0,001 |

Rata dilatării arterei brahiale dependente de flux este cu 31,6% mai mică comparativ cu FMD stabilită în lotul control. Totodată, grosimea complexului intimă-medie a arterei carotide comune depășește cu 41% markerul control.

Aceste evidențe sunt în acord cu modificările biomarkerilor circulanți decelate la pacienții cu AM (tabelul 3).

Tabelul 3

Markerii biochimici ai disfuncției endoteliale

| Indice | Lot AM | Lot control | p |
|------------------------|----------|-------------|--------|
| NO (μM/L) | 26,6±9,1 | 38,5±10,3 | <0,001 |
| S-nitrozotiolii (μM/L) | 2,7±0,6 | 4,4±0,8 | <0,001 |
| ET-1 (pg/ml) | 16,5±5,9 | 10,7±5,2 | <0,001 |

Astfel, biomarkerul principal al fezabilității endoteliului vascular, oxidul nitric, este cantitativ depreciat cu 31%. Nivelul circulant redus de NO este asociat cu micșorarea conținutului seric al S-nitrozotiolilor cu 38,6%. Disfuncția și leziunea endotelială este estimată drept o cauză de elevare a ET-1 circulante. În studiul nostru această oligopeptidă este cu 55% peste valoarea control.

Prin urmare markerii morfo-funcționali, cât și markerii biochimici indică sigur asupra disfuncției endoteliale la pacienții cu ACM, care a evoluat pe fondalul disbiozei intestinale (tabelul 4).

Tabelul 4

Conținutul seric al markerilor disbiozei intestinale

| Indice | Lot ACM | Lot control | p |
|-----------------|-----------|-------------|--------|
| LP (pg/ml) | 38,1±10,4 | 21,2±9,6 | <0,001 |
| Zonulin (ng/ml) | 3,6±0,7 | 1,8±0,3 | <0,001 |

Important de menționat în acest context creșterea cu 80% a conținutului seric al lipopolizaharidelor. Elevare LP este în sintonie cu majorarea zonulinei, markerul afectării permeabilității barierei intestinale, nivelul căreia s-a decelat dublat față de control: 3,6±0,7 vs 1,8±0,3 ng/ml.

În contextul rolului LPZ în activarea programului genetic proinflamator al celulelor sunt remarcabile modificările markerilor inflamației (tabelul 5).

Tabelul 5

Nivelul circulant al markerilor inflamației

| Indice | Lot AM | Lot control | p |
|----------------|-----------|-------------|--------|
| hsCRP (mg/L) | 3,54±0,33 | 0,83±0,11 | <0,001 |
| IL-6 (pg/ml) | 6,27±0,68 | 4,38±0,45 | <0,001 |
| TNF-α (pg/ml) | 7,84±0,68 | 5,12±0,49 | <0,001 |
| MCP-1 (pg/ml) | 473±52 | 306±44 | <0,01 |
| AGEs (μg/L) | 457±53 | 312±44 | <0,01 |
| sCD140 (pg/ml) | 475±55 | 358±41 | <0,01 |

Conținutul seric al hsCRP, markerul cheie al inflamației, depășește valoarea de 3,0 mg/L care corespunde riscului cardiovascular înalt. În lotul control hsCRP se încadrează în limitele 0-1,0 mg/L, fapt ce indică asupra riscului cardiovascular mic. Citokinele proinflamatoare expresate primar de celulele cu programul genetic activat, IL-6 și TNF-α, care stimulează producția hepatică a proteinei C reactive, fibrinogenului și amiloidului A sunt cantitativ superioare nivelurilor circulante control cu 44% și, respectiv, 54%. Un efect important al citokinelor proinflamatoare în controlul sustenabil al inflamației constă în asigurarea pasajului transendotelial al celulelor proinflamatoare (neutrofilele și monocitele) prin stimularea selectinelor și integrinelor. La pacienții cu AM s-a stabilit elevarea cu 55% față de control a nivelului circulant al MCP-1. De asemenea conținutul seric al AGEs, care sunt implicate în stimularea activității migratoare a monocitelor, este majorat cu 47%.

Răspunsul inflamator este indispensabil de răspunsul imun, iar sistemul CD140-ligand – CD140-receptor realizează conexiunea dintre limfocitele T și limfocitele B. De menționat în acest context că nivelul circulant al markerului solubil (sCD140) este la pacienții cu AM și disbioza intestinală crescut cu 33%.

Unul din primele efecte ale LPZ urmărite în cercetările fundamentale a fost efectul de stimulare a producției SRO. Markerii determinați în studiul nostru denotă activarea stresului oxidativ (tabelul 6).

Tabelul 6

Conținutul seric al markerilor stresului oxidativ

| Indice | Lot AM | Lot control | p |
|--------------------------------------|-----------|-------------|--------|
| NOX2-s (pg/ml) | 58,8±12,6 | 25,5±10,3 | <0,001 |
| H ₂ O ₂ (μM/L) | 47,3±20,4 | 21,5±9,3 | <0,001 |
| RD-H ₂ O ₂ (%) | 28,2±10,5 | 55,6±20,8 | <0,001 |
| DAM (μM/L) | 8,1±1,3 | 4,5±0,7 | <0,001 |
| SOD (u.c.) | 721±88 | 969±113 | <0,01 |
| Catalaza (u.c.) | 817±122 | 1163±198 | <0,01 |

Nivelul seric al formei solubile a enzimei membranare (NOX2-s) implicate notabil în formarea radicalilor liberi de oxigen este elevat de 2,3 ori. Acest spor marcat s-a asociat cu un exces al peroxidului de hidrogen de 120% față de control, iar rata degradării markerului, dimpotrivă, este aproape dedublată. Enzima antioxidantă care neutralizează H_2O_2 , catalaza, s-a estimat semnificativ subiacentă valorii control cu 29,75%. O modificare similară este caracteristică și pentru SOD, reculul acesteia față de control constituind 25,6%.

Un marker important al statusului prooxidant este dialdehida malonică, care reflectă în proporție directă intensitatea procesului de peroxidare a lipidelor și proteinelor. Conținutul seric al DAM este cu 80% peste markerul control.

Conexiunea strânsă între markerii disbiozei intestinale, disfuncției endoteliale, inflamației și stresului oxidativ la pacienții cu AM este confirmată și prin co-

relațiile robuste decantate în cadrul regresiei liniare simple (tabelul 7).

Astfel, LPZ și zonulina s-au apreciat într-o relație corelativă de intensitate medie-înaltă (coeficientul r este mai reprezentativ decât $\pm 0,6$) cu markerii disfuncției endoteliale (FMD, NO și ET-1), inflamației (TNF- α) și stresului oxidativ (NOX2-s, H_2O_2 și DAM). Această evidență aduce o dovadă notabilă asupra rolului disbiozei intestinale în evoluția disfuncției endoteliale la pacienții cu angină coronariană microcirculatorie.

Discuții

Obiectivul de fond al studiului a constat în evaluarea rolului patogenetic al disbiozei intestinale în dezvoltarea AM prin prisma determinării markerilor acesteia în contiguitate cu markerii disfuncției endoteliale, mecanismul principal al AM, și markerii inflamației și stresului oxidativ, fenomene estimate

Tabelul 7

Valoarea coeficientul de corelare r apreciată între markeri principali

| LP | FMD | NO | TNF- α | NOX2-s | H_2O_2 | DAM | ET-1 |
|----------|--------|--------|---------------|--------|----------|--------|--------|
| | -0,673 | -0,692 | 0,632 | 0,725 | 0,715 | 0,683 | 0,607 |
| p | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Zonulina | -0,664 | -0,685 | 0,639 | 0,723 | 0,698 | 0,676 | 0,603 |
| p | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

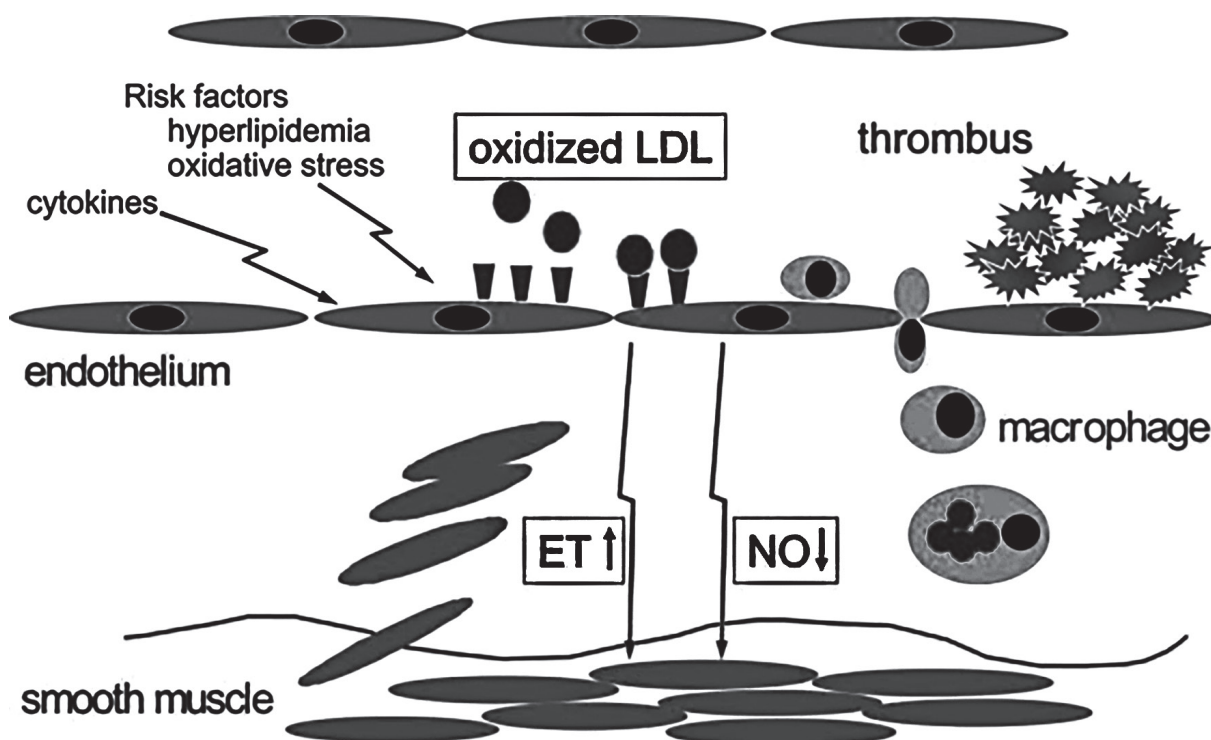


Figura 1. Dezechilibrul de NO și ET-1 în disfuncția endotelială și factorii de inducere (30)

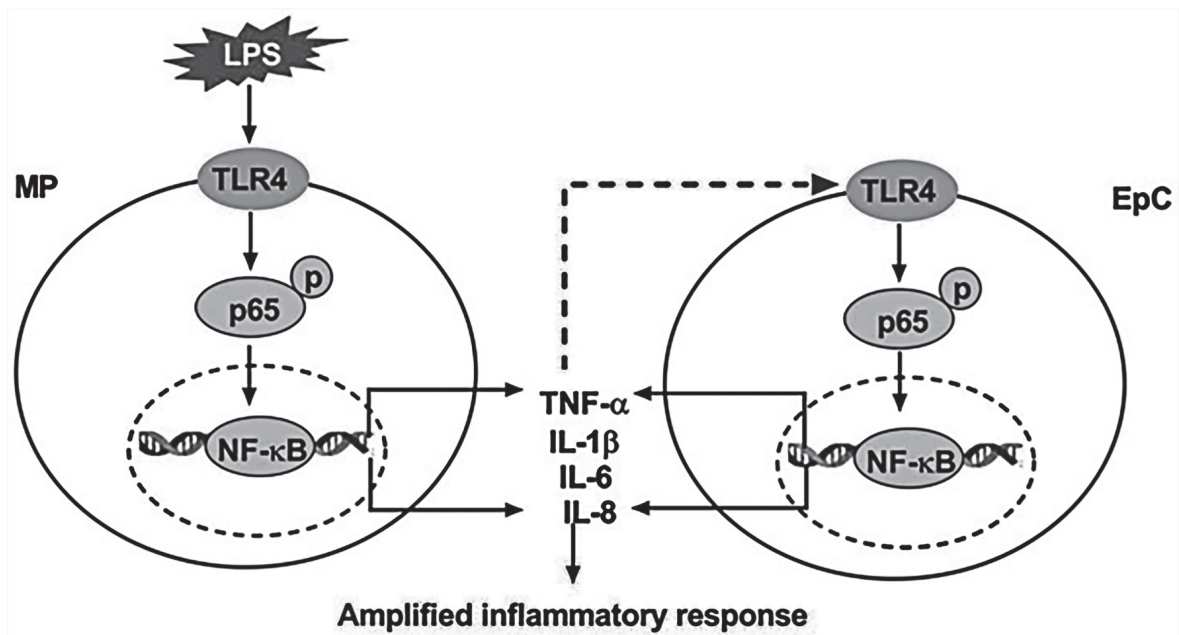


Figura 2. Mecanismul sinoptic proinflamator al LP (34).

LPS – lipozaharadie; MP – macrofage; EpC – celulele epiteliale; TLR4 – receptorii Toll-like-4; P-p65 – fosforilarea proteinei p65; NF-κB – factorul nuclear kappaB;

ca pârghii însemnate de periclitate a funcționalității endotelului vascular.

Disfuncția endotelială la pacienții cu AM a fost cert dovedită prin intermediul a 2 markeri morfofuncționali acreditați în estimarea remodelării vasculare periferice (FMD și ac-IM), precum și a 3 markeri biochimici care reflectă fezabilitatea sistemului endotelial eNOS-NO (NO, S-nitrozotiolii și ET-1). Rata dilatării arterei brahiale dependente de flux s-a redus cu circa 32%, iar complexul intimă-medie a arterei carotide comune s-a majorat cu 41% față de markerii control. În lotul pacienților cu AM prezența HTA și a dislipidemiilor s-a notat la cote înalte, (95% și, respectiv, 93%), iar micșorarea valorii FMD este coroborată drept un predictor incipient și veritabil al disfuncției endoteliale și carenței de NO nu numai în aceste dishomeostazii, dar și în ateroscleroză, insuficiență cardiacă, diabet, etc. (24, 25, 26). Nivelul sanguin al oxidului nitric s-a constatat depreciat cu 31%, fapt ce se asociază inteligibil cu declinul cantitativ de circa 39% al S-nitrozotiolilor, carierilor de NO, care în afară de funcția de trafic asigură creșterea viabilității acestui gaz, care are un $T_{1/2}$ de 20-30 sec.

Majorarea valorii ac-IM semnifică nu numai remodelarea vasculară periferică, dar are și conotație predictivă asupra sistemului coronarian, întrucât contiguitatea fiziopatologică a disfuncției endoteliale carotide și coronariene este recunoscută infailibil (27, 28). Evoluția remodelării vasculare pe fondalul disfuncției endoteliale impune primar periclitate reactivității dependente de NO și potențarea răspunsului vasoconstrictor, fapt ce conduce la creșterea tonusului

vascular bazal proporțional odată cu hipertrofia mediei musculare estimată ca o componentă importantă a remodelării arterelor carotidă și coronariene (29). La pacienții cu AM disfuncția endotelială evoluează în contextul elevării nivelului circulant al ET-1, un potent agent vasoconstrictor și care este eliberat excesiv de celula endotelială în condițiile de penurie de NO, precum și sub acțiunea diferitor factori de leziune endotelială și declanșare a remodelării vasculare, cum ar fi citokinele proinflamatoare, SRO și produsele stresului oxidativ activat, hiperlipidemia, etc. (figura 1).

În plan patogenetic se consideră că receptorul celulei endoteliale LOX1 (lectin-like oxidized receptor-1) activat de LDL-oxi conectează acțiunea peiorativă a inflamației și a stresului oxidativ asupra endotelului, fiind responsabil, totodată, și de modificările cantitative opuse ale ET-1 și NO (30). Pe de altă parte, efectul vasoconstrictor al excesului de ET-1 este mediat nu numai prin deficiența de NO, dar și carența de sulfid de hidrogen (H_2S), un gaz eliberat de celula endotelială (produs la metabolismului L-cisteinei) cu acțiune vasodilatatoare similară NO (31). Mai mult deficiența de H_2S , cauzată de ET-1 este detrimentală asupra fenomenului de reendotelizare, un mecanism natural de ameliorare a disfuncției endoteliale în sistemul coronarian, dat fiind faptul că facilitează angrenarea celulelor progenitoare endoteliale circulante în sintonie cu NO (32). În studiul nostru nivelul circulant al ET-1 a depășit markerul control cu 55% și poate fi astfel apreciat drept un factor patogenetic al AM, iar mediatorii inflamației și stresului oxidativ

drept factori de declanșare și orchestrare sustenabilă a disfuncției endoteliale.

Sub calota celor menționate trebuie de accentuat că markerii disbiozei intestinale explorați, LPZ și zonulina, sunt capabili prin diferite mecanisme să declanșeze și să susțină răspunsul inflamator și stresul oxidativ, evidență dovedită prin estimarea markerilor iminenți principali.

Nivelul circulant al LPZ este la pacienții cu AM elevat cu 80%, iar zonulina trece dublu de valoarea control a markerilor.

LPZ, o endotoxină ce derivă din bacteriile gram-negativă elevează în sânge în cadrul translocării ei intestinale în condițiile de afectare a barierei intestinale și creștere a permeabilității epiteliale, despre ce indică conținutul seric majorat al zonulinei. Translocarea și creșterea permeabilității intestinale marchează entitatea fiziopatologică a disbiozei intestinale și a repercusiunilor acesteia. Zonulina, o proteină din familia haptoglobinelor, dezasmblează joncțiunile intercelulare la nivelul epitelului intestinal, un mecanism patogenetic al bolii celiace (33). Respectiv, între nivelul de expresie a zonulinei și gradul de afectare a barierei intestinale este o legătură directă.

Efectul proinflamator al LPZ este realizat la nivelul ADN al celulei (figura 2).

Acțiunea LPZ asupra oricărei celule, inclusiv endotelocit, demarează prin activarea receptorului transmembranar Toll-like4, rezultând în fosforilarea proteinei citozolice p65 și ulterior în activarea NF-kappaB, care este transferat în nucleu, unde activează genele proinflamatoare ale ADN-ului (34). Urmare activării programului genetic proinflamator este creșterea expresiei citokinelor, cele mai importante în vederea augmentării răspunsului inflamator fiind IL-1, IL-6, IL-8 și TNF- α . Remarcabil, că TNF- α se impune ca un catalizator al răspunsului inflamator al celulei, deoarece activează de sine stătător Toll-like-4 receptorii, inducând astfel fenomenul de reverberație și activare sustenabilă a inflamației.

La pacienții cu AM și IL-6 și TNF- α au avut niveluri circulante semnificativ elevate, iar regresia liniară simplă a arătat o corelare pozitivă robustă între LPZ și TNF- α ($r=0,753$; $p<0,001$). TNF- α inhibă expresia eNOS, reduce producția și viabilitatea (prin stimularea sintezei SRO) de NO și justificat se estimează drept un factor patogenetic al disfuncției endoteliale.

Un alt mecanism al acțiunii proinflamatorii a LPZ este activarea migratoare a monocitelor, pasajul transendotelial al acestora fiind asigurat pe o parte de expresia selectinelor-L (leucocitare) de către LPZ, iar pe de altă parte de expresia selectinelor-E (endoteliale) de către IL-6 și TNF- α . Pasajul monocitelor este stimulat și de chemokina CMP-1, nivelul

căreia fiind semnificativ crescut cu 55% la pacienții cu AM. În plus, produsele finale ale glicării prin intermediul receptorilor specifici exprasați pe diferite celule (RAGE), inclusiv endotelocite, stimulează de asemenea selectinele L și E contribuind la creșterea populației de macrofage, sursa principală de citokine proinflamatoare (35). Totodată, acțiunea AGEs se impune prin stimularea producției de radicali liberi de oxigen, care au acțiune cooperantă reciprocă cu mediatorii inflamației, determinând agravarea disfuncției endoteliale. Conținutul seric al AGEs este crescut cu 47% față de control la pacienții cu AM și merită să fie estimat la noima predicției și diagnosticului disfuncției endoteliale.

În contextul exegezei privind efectul prooxidant al LPZ și dovada rolului disbiozei intestinale în evoluția disfuncției endoteliale și AM trebuie de adus la apel caracterul modificării markerilor specifici stresului oxidativ. La acest capitol este remarcabilă creșterea de 2,3 ori a nivelului NOX₂ (paternul solubil al NADPH, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) și al peroxidului de hidrogen de 2,2 ori la pacienții cu AM. Creșterea expresiei endoteliale a NOX₂ conduce la formarea excesivă a anionului superoxid (O₂⁻), radicalul de oxigen metabolizat în H₂O₂ sub acțiunea SOD. Rolul O₂⁻ în patogenia disfuncției endoteliale este vizat prin prisma a mai multor fațete (36). În primul rând, anionul superoxid metabolizează prematur NO prin interacțiunea directă cu acesta, rezultând în formarea peroxinitritului (O₂⁻ + NO = ONOO⁻), care posedă un efect vasoconstrictor și protrombitoc notabil. În al doilea rând SRO cresc expresia RAGE și consecvent producția de citokine proinflamatoare și a factorilor de creștere de către macrofage. În al treilea rând, activarea RAGE sub acțiunea AGEs rezultă în creșterea *stiffness*-ului peretelui vascular datorită modificării structurii proteinelor matricei extracelulare din peretele vascular (ie, colagenul fibrilar de tip I și III), un mecanism redutabil al micșorării complianței arteriolelor coronariene.

Activarea stresului oxidativ sub acțiunea LPZ este determinată nu numai de formarea excesivă a SRO în contextul activării NOX₂, dar și de incompetența enzimelor sistemului antioxidant menite să metabolizeze radicalii liberi de oxigen. Astfel, în studiul nostru rata degradării peroxidului de hidrogen este diminuată aproape de 2 ori față de indicele control. Catalaza, este enzima antioxidantă responsabilă de degradarea radicalului, iar conținutul ei la pacienții cu AM a fost diminuat semnificativ cu circa 30%. Un recul similar s-a decelat și vizavi de SOD, enzima responsabilă de metabolizarea anionului superoxid.

Peroxidarea lipidelor și proteinelor sub acțiunea excesului de SRO se impune detrimentală asupra en-

doteliului vascular prin inhibiția eNOS și a altor enzime angrenate în exercițiul metabolic și funcțional al endoteliocitului, prin afectarea aparatului mitocondrial și riscul apoptozei intrinseci, prin progresarea procesului de ateroscleroză și activarea statusului protrombotic (37). Dialdehida malonică un produs final al peroxidării lipidelor s-a apreciat cantitativ majorată cu 80% comparativ cu markerul lotului control.

De menționat că între LPZ și markerii stresului oxidativ, cum ar fi NOX2-s, H₂O₂ și DAM, s-au determinat corelări robuste cuprinse în limitele 0,683-0,725.

Merită atenție faptul, că și nivelul circulant al zonulinei s-a corelat robust cu markerii disfuncției endoteliale, inflamației și stresului oxidativ la pacienții cu AM și în plan fiziopatologic această evidență este autentică, întrucât acesta influențează nemijlocit nivelul LPZ.

Așadar, nivelurile circulante elevate de LPZ și zonulină la pacienții cu AM, conexiunea corelativă strânsă a acestora cu markerii disfuncției endoteliale, entitatea fiziopatologică cheie a AM, precum și cu markerii ce reflectă relevanța mecanismelor principale, -inflamația și stresul oxidativ, sunt repere importante de justificare a rolului disbiozei intestinale în evoluția AM. Totodată, LPZ și zonulina pot fi nu numai markeri ai disbiozei intestinale, dar și predictorii ai riscului AM.

În contextul unor relații limitate privind legătura disbiozei intestinale cu dishomeostazia cardiovasculară, date studiului nostru aduc dovezi inedite vizavi de fiziopatologia, predicția diagnostică și tratamentul patogenetic al AM. Numărul mare de persoane cu probiotica intestinală afectată, precum și cu toleranța joasă la gluten, care se asociază cu niveluri elevate de zonulină, întemeiază abordarea disbiozei intestinale ca factor de risc al disfuncției endoteliale și, eventual, al AM, noi cercetări clinice fiind necesare sub acest aspect.

Concluzii

1. La pacienții cu AM s-au constatat niveluri circulante elevate mai mult ca dublu ale LPZ și zonulinei față de valoarea control, fapt ce indică asupra prezenței disbiozei intestinale.

2. LPZ și zonulina se corelează robust cu markerii morfofuncționali și biochimici ai disfuncției endoteliale, precum și cu markerii factorilor patogenetici principali ai acesteia, - inflamației și stresului oxidativ.

3. Luând în vedere efectul cunoscut al LPZ de a declanșa inflamația subclinică în contiguitate cu formarea excesivă de radicali liberi de oxigen, se poate sugera întemeiat aportul disbiozei intestinale în evoluția AM.

4. Elevarea LPZ și a zonulinei poate fi un predictor al disfuncției endoteliale și, respectiv, al riscului AM, marcând, totodată, un reper de justificare a necesității profilaxiei și tratamentului disbiozei intestinale.

Bibliografie

1. Sinha A, Rahman H, Perera D. *Coronary microvascular disease: current concepts of pathophysiology, diagnosis and management*. Cardiovasc Endocrinol Metabol, 2020, 10(1):22-30.

2. Villano A, Lanza GA, Crea F. Microvascular angina: prevalence, pathophysiology and therapy. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2018, 19 Suppl 1:e36-39.

3. Chen C, Wei J, AlBadri A et al. *Coronary Microvascular Dysfunction- Epidemiology, Pathogenesis, Prognosis, Diagnosis, Risk Factors and Therapy*. Circ J, 2016, 81:3-11.

4. Rahman H, Ryan M, Lumley M et al. *Coronary microvascular dysfunction is associated with myocardial ischemia and abnormal coronary perfusion during exercise*. Circulation, 2019, 140:1805-1816.

5. Rahman H, Demir OM, Khan F et al. *Physiological stratification of patients with angina due to coronary microvascular dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2020, 75:2538-2549.

6. Shah SJ, Lam CSP, Svedlund S, et al. *Prevalence and correlates of coronary microvascular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: PROMIS-HF-pEF*. Eur Heart J, 2018;39:3439-50.

7. Sara JD, Widmer RJ, Matsuzawa Y et al. *Prevalence of coronary microvascular dysfunction among patients with chest pain and nonobstructive coronary artery disease*. JACC Cardiovasc Interv, 2015, 8:1445-1453.

8. Cannon RO, III, Epstein SE. "Microvascular angina" as a cause of chest pain with angiographically normal coronary arteries. Am J Cardiol, 1988, 61:1338-1343.

9. Duncker DJ, Koller A, Merkus D et al. *Regulation of coronary blood flow in health and ischemic heart disease*. Prog Cardiovasc Dis, 2015, 57:409-422.

10. Taqueti VR, Di Carli MF. *Coronary microvascular disease pathogenic mechanisms and therapeutic options: JACC state-of-the-art review*. J Am Coll Cardiol, 2018, 72:2625-2641.

11. Lanza GA, Careri G, Crea F. *Mechanisms of coronary artery spasm*. Circulation, 2011, 124:1774-1782.

12. Widmer RJ, Lerman LO, Lerman A. *The Rho(ad)-kinase for individualized treatment of vasospastic angina*. Eur Heart J, 2018, 11:960-962.

13. Sucato V, Corrado E, Manno G et al. *Biomarkers of Coronary Microvascular Dysfunction in Patients With Microvascular Angina: A Narrative Review*. Angiology, 2022,73(5): 395-406.

14. Grylls A, Seidler K, Neil J. *Link between microbiota and hypertension: Focus on LPS/TLR4 pathway in endothelial dysfunction and vascular inflammation, and therapeutic implication of probiotics*. Biomed Pharmacother, 2021, 137:1113-34.

15. Stoll LL, Denning GM, Weintraub NL. *Potential role of endotoxin as a proinflammatory mediator of atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24:2227-36.

16. Loffredo L, Ettore E, Zicari AM et al. *Oxidative Stress and Gut-Derived Lipopolysaccharides in Neurodegenerative Disease: Role of NOX2*. Oxid Med Cell Longev. 2020, 86:30275.

17. Loffredo L, Ivanov V, Ciobanu N et al. *Is There an Association Between Atherosclerotic Burden, Oxidative Stress, and Gut-Derived Lipopolysaccharides?* Antioxid Redox Signal. 2020, 33(11): 8109.
18. Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, Picardi A. *The role of intestinal microbiota in the pathogenesis of NAFLD: starting points for intervention.* Arch Med Sci, 2018, 14(3): 701-706.
19. Spielman LJ, Gibson DL, Klegeris A. *Unhealthy gut, unhealthy brain: The role of the intestinal microbiota in neurodegenerative diseases.* Neurochem Int, 2018, S0197-0186(18): 30198-30190.
20. Jonsson AL, Backhed F. *Role of gut microbiota in atherosclerosis.* Nat Rev Cardiol. 2017;14: 79–87.
21. Britoalves JL, deSouza EL, deCamposCrus J et al. *Gut dysbiosis in arterial hypertension: a candidate therapeutic target for blood pressure management.* In: Microbiome and metabolome in diagnosis, therapy and other strategic applications, red. J.Faintuch and S.Faintuch, 2019, Copyright Elsevier, p.243-249.
22. Pastori D, Carnevale R, Nocella C et al. *Gut-Derived Serum Lipopolysaccharide is Associated With Enhanced Risk of Major Adverse Cardiovascular Events in Atrial Fibrillation: Effect of Adherence to Mediterranean Diet.* J Am Heart Assoc, 2017, 6(6):e005784.
23. Ong P, Camici PG, Beltrame JF et al. *International standardization of diagnostic criteria for microvascular angina.* Int J Cardiol, 2018;250:16-20.
24. Green DJ, Jones H, Thijssen D, Atkinson G. *Flow-Mediated Dilation and Cardiovascular Event Prediction Does Nitric Oxide Matter?* Hypertension, 2011, 57:363-369.
25. Thijssen D, Bruno R, van Mil A et al. *Expert consensus and evidence-based recommendations for the assessment of flow-mediated dilation in humans.* European Heart Journal, 2019, 40(30):534–2547.
26. McCully K. *Flow-mediated dilation and cardiovascular disease.* J Appl Physiol, 2012, 112: 1957–1958.
27. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, et al. *The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events.* Annals of Internal Medicine. 1998, 128(4):262–269.
28. Hulthe J, Wikstrand J, Emanuelsson H et al. *Atherosclerotic changes in the carotid artery bulb as measured by B-mode ultrasound are associated with the extent of coronary atherosclerosis.* Stroke, 1997, 28(6):1189–1194.
29. Liu D, Du C, Shao W, Ma G. *Diagnostic Role of Carotid Intima-Media Thickness for Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis.* Biomed Res Int. 2020: 9879463.
30. Masaki T, Sawamura T. *Endothelin and endothelial dysfunction.* Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2006, 82(1): 17–24.
31. Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, Bian JS. *Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide.* Front Pharmacol, 2020, 10:1568.
32. Hu Q, Ke X, Zhang T et al. *Hydrogen sulfide improves vascular repair by promoting endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of endothelial progenitor cells.* J Hypertens, 2019, 37(5):972-984.
33. Ajamian N. *Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems.* PLoS One, 2019, 14(1): e0210728.
34. Li J, Qin Y, Chem Y et al. *Mechanisms of the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in alveolar epithelial cell/macrophage co-culture.* Exp Ther Med, 2020, 20(5):76.
35. Senatus L, MacLean M, Arivazhaga L. *Inflammation Meets Metabolism: Roles for the Receptor for Advanced Glycation End Products Axis in Cardiovascular Disease.* Immunometabolism, 2021, 3(3):e210024.
36. Munzel T, Camici G, Maack C et al. *Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature Part 2 of a 3-Part Series.* J Am Coll Cardiol, 2017, 70(2):212-229.
37. Stanisavljevic N, Wilson W. *Lipid peroxidation as risk factor for endothelial dysfunction in antiphospholipid syndrome patients.* Clinical Rheumatology, 2016, 35(10):2485-2493.

Acest studiu face parte din Programul de Stat (2020-2023) „Evaluarea markerilor instrumentali și biochimici în managementul pacienților cu infarct miocardic acut fără elevare de segment ST, precum și în aprecierea gradului de afectare coronariană microcirculatorie” cu cifrul nr.20.80009.8007.10.