

## Maciej Krzysztof Kluk

I Klinika Kardiologii i Elektroterapii Świętokrzyskiego Centrum Kardiologii w Kielcach

### Wstęp

Kardiomiopatia rozstrzeniowa (DCM, *dilated cardiomyopathy*) stanowi jedną z głównych przyczyn przewlekłej niewydolności serca we współczesnej kardiologii. Choroba ta ma charakter polietiologiczny i polega na pierwotnym lub wtórnym do działania czynników kardiotoksycznych poszerzeniu światła komór z upośledzeniem funkcji skurczowej przy zachowanej prawidłowej grubości ścian komór. Do czynników kardiotoksycznych wtórnie prowadzących do rozwoju DCM należą leki z grupy antracyklin stosowane w onkologii. Obecnie autorzy badań nad podłożem rozwoju oraz metodami zapobiegania i leczenia DCM skupiają się na roli dysfunkcji mikrokrążenia wieńcowego prowadzącej do postępującego upośledzenia kurczliwości kardiomiocytów, rozstrzeni jam komór i w efekcie skurczowej niewydolności serca, jak również na próbie identyfikacji molekularnych patomechanizmów, takich jak białka mitochondrialne aktywnie uczestniczące w procesach energetycznych kardiomiocytów, stanowiących potencjalny punkt uchwytu dla leków. Nadal nie są znane przyczynowe metody leczenia DCM, choć możliwe jest zapobieganie chorobie poprzez ograniczenie ekspozycji na znane czynniki kardiotoksyczne.

### Kardiomiopatia rozstrzeniowa i *Tongxinluo* — czy chińska medycyna niekonwencjonalna wyleczy nieuleczalną chorobę?

*Tongxinluo* (TXL) stanowi mieszanę jedenastu substancji aktywnych pochodzenia naturalnego oraz jednej substancji syntetycznej — w większości ekstraktów z ziół wykazujących znane w chińskiej medycynie alternatywnej właściwości lecznicze, między innymi z korzeni żeńszenia, które zostały przygotowane w postaci doustnych kapsułek po oczyszczeniu i standaryzacji dawek. Lek ten wprowadzono do praktyki klinicznej po formalnej aprobacie chińskiej agencji państwowej zajmującej się oceną technologii medycznych jako bezpieczną metodę terapii o działaniu kardio- i neuroprotekcijnym (badania kliniczne przeprowadzone w chorobie niedokrwiennej serca oraz udarze niedokrwinnym mózgu), o potencjalnym działaniu hamującym niekorzystny

remodeling jam serca i poprawiającym funkcję mikrokrążenia wieńcowego.

Chińscy autorzy, Shen i wsp. [1], przeprowadzili badanie na modelu zwierzęcym DCM indukowanej doksorubicyną w celu oceny potencjalnego wpływu kardioprotekcyjnego TXL. Badanie odbyło się zgodnie z obowiązującymi międzynarodowymi regulacjami dotyczącymi etyki badań doświadczalnych nad zwierzętami.

W grupie 54 zdrowych szczurów hodowanych w jednokowych warunkach przez 7 dni fazy przedwstępnej badania 45 losowo wybranym zwierzętom podano dootrzewnowo łączną dawkę 15 mg/kg mc. doksorubicyny w okresie 2 tygodni, zaś pozostałym 9 szczurom — taką samą łączną objętość soli fizjologicznej. Czternaście dni po ostatniej iniekcji w obu grupach przeprowadzono przezklatkowe badania echokardiograficzne służące ocenie skuteczności indukcji DCM. W okresie 2 tygodni po ocenie echokardiograficznej zdechło 16 z 45 zwierząt poddanych działaniu doksorubicyny (35,6%). Pozostałe 29 szczurów, u których skutecznie wywołano indukcję DCM, podzielono losowo na trzy grupy zależnie od podawanej dawką w ciągu 4 tygodni dawki łącznej TXL. W grupie 1. (duża dawka TXL — TXL-H, n = 9) dawka TXL wynosiła 1,5 g/kg mc./dobę, w grupie 2. (mała dawka TXL — TXL-L, n = 10) — 0,15 g/kg mc./dobę, w grupie 3. (grupa kontrolna, placebo, DCM-C, n = 10) zaś podawano sól fizjologiczną w łącznej objętości odpowiadającej objętości podawanej substancji badanej w każdej z pozostałych grup. Ponadto utworzono grupę kontrolną złożoną ze zdrowych dobranej pod względem wieku szczurów (NOR-C, n = 9), którym również podawano sól fizjologiczną w takich samych ilościach, jak w grupie DCM-C. Po okresie leczenia wykonywano kontrolne badania echokardiograficzne, oceniając cztery parametry w standaryzowanych porównywalnych projekcjach (M-mode, projekcja dwuwymiarowa w osi krótkiej): frakcję wyrzutową lewej komory (LVEF, *left ventricular ejection fraction*), wymiar końcoworozkurczowy lewej komory (LVEDD, *left ventricular end-diastolic dimension*), wymiar końcowoskurczowy lewej komory (LVESD, *left ventricular end-systolic dimension*), frakcję skracania lewej komory (LVFS, *left ventricular fractional shortening*), w trzech kolejnych cyklach pracy serca. Po ocenie echo-

kardiograficznej pobierano serca zwierząt po zatrzymaniu pracy w rozkurczu (kardioplegia) oraz izolowano bloki tkankowe do dalszej oceny histopatologicznej (pomiar morfologiczne: średni maksymalny wymiar poprzeczny 10 kardiomiocytów, hipertrofia kardiomiocytów, nacieki komórek zapalnych, stopień wakuolizacji kardiomiocytów, stopień hiperemii naczyniowej, gęstość i jakość włókien kolagenu) oraz immunohistochemicznej (stopień ekspresji cząstek CD31 na powierzchni śródbłonna – identyfikacja naczyń mikrokrążenia, pomiar gęstości mikrokrążenia miokardium [MVD, *microvessel density*]).

Po zakończonej 4-tygodniowej fazie podawania badanej substancji oceniano przeżywalność szczurów w poszczególnych grupach: 88,9% (8/9), 90,0% (9/10), 80,0% (8/10), 100,0% (9/9) odpowiednio dla TXL-H, TXL-L, DCM-C i NOR-C. Wykazano większą przeżywalność w grupie DCM leczonej TXL w stosunku do DCM-C, jednak różnice nie były istotne statystycznie. Głównymi przyczynami sekcyjnymi zgonu były zastoinowa niewydolność serca, złośliwe arytmie i odporne wodobrzusze.

Szczegółowa analiza statystyczna poszczególnych celów badania dowiodła, że w grupie szczurów z DCM leczonych dużą dawką TXL istotnie statystycznie poprawie uległo wiele ważnych morfologicznie i funkcjonalnie parametrów mięśnia sercowego. W stosunku do grup TXL-L i DCM-C istotnie zmniejszyły się bezwzględna masa mięśnia sercowego oraz stosunek masy mięśnia sercowego do masy ciała zwierząt, istotnie poprawiły się parametry funkcji mięśnia sercowego (LVESD, LVEF i LVFS, ale nie LVEDD) w stosunku do grupy DCM-C (przy braku efektu w grupie TXL-L), istotnie zmniejszył się stopień zwłóknienia i remodelingu lewej komory w stosunku do grupy DCM-C, istotnej stymulacji uległa angiogeneza w grupie TXL-H w stosunku do DCM-C przy braku efektu w grupie TXL-L (przy czym gęstość mikrokrążenia wieńcowego istotnie dodatnio korelowała z poprawą LVEF;  $r = 0,895$ ;  $p < 0,05$ ).

Ograniczeniami badania są stosunkowo krótki czas leczenia, który mógł wpłynąć na niewykazanie korzystnego wpływu dużej dawki TXL na poprawę w zakresie LVEDD, oraz brak możliwości identyfikacji, który ze składników aktywnych tworzących TXL ma największy wpływ na efekty terapeutyczne w DCM. Podobnie nie zidentyfikowano mechanizmu molekularnego korzystnego wpływu dużych dawek TXL w DCM. Ponadto DCM w modelu ludzkim jest chorobą niejednorodną, powstającą na podłożu wielu różnych patomechanizmów, co może utrudnić jednoznaczną ocenę uniwersalnego efektu TXL w leczeniu i zapobieganiu DCM u ludzi.

Warto nadmienić, że zastosowana w badaniu duża dawka TXL – 1,5 g/kg mc./dobę – jest maksymalną dawką TXL wykazującą efekt kliniczny w modelach zwierzęcych w dotychczas opublikowanych badaniach, przy czym jest to dawka około 4-krotnie większa od dawki dobowej rutynowo stosowanej w praktyce klinicznej (60 mg/kg mc./d.). Na-

tomiast dawka stosowana w grupie TXL-L (0,15 g/kg mc./d.) jest około 3-krotnie mniejsza od wspomnianej dawki klinicznej [1].

**Stosowany dotychczas w chorobie niedokrwiennej serca i udarze niedokrwinnym mózgu, w celu ograniczenia strefy niedokrwienia, chiński preparat ziołowy *Tongxinluo* może mieć również korzystny wpływ na przebieg kardiomiopatii rozstrzeniowej indukowanej antracyklina-  
mi poprzez zahamowanie niekorzystnego remodelingu i włóknienia lewej komory oraz stymulację angiogenezy w obrębie mikrokrążenia wieńcowego.**

### **Kardiomiopatia rozstrzeniowa – czy białko mitochondrialne PRDX3 może stanowić potencjalny punkt uchwytu w leczeniu przyczynowym?**

Zaburzenia energetyczne kardiomiocytów pojawiają się jako efekt dysfunkcji mitochondriów w schyłkowej fazie niewydolności serca, co udowodniono zarówno w badaniach u ludzi, jak i w badaniach eksperymentalnych na modelach zwierzęcych. Pośredniczą one w procesach metabolicznych kardiomiocytów, utrzymywaniu homeostazy gospodarki wapniowej, stresie oksydacyjnym oraz apoptozie i nekrozie komórek mięśnia sercowego. Na podstawie dotychczasowych dowodów naukowych mitochondria są traktowane jako możliwe epicentrum dysfunkcji mięśnia sercowego na podłożu komórkowym w przebiegu postępującej niewydolności serca. W piśmiennictwie skupiano się dotychczas na roli konkretnych białek mitochondrialnych w fizjologii zdrowego mięśnia sercowego, nie analizowano zaś do tej pory całego proteomu mitochondrialnego w warunkach patologicznych, w tym w niewydolności serca. Metody izolacji i analizy proteomu mitochondrialnego są bardzo złożone technicznie i czasochłonne, jednak dynamiczne procesy biochemiczne zachodzące w obrębie „fabryk energii komórkowej” w jednostce czasu stanowią funkcjonalną całość, powodując, że analizy znaczenia poszczególnych izolowanych białek mogą być nieefektywne.

Roselló-Lletí i wsp. [2] przeprowadzili badanie, w którym porównywali ekspresję białek proteomu mitochondrialnego w kardiomiocytach mięśnia sercowego pobranego od chorych z DCM w fazie niewydolności serca (LVEF < 40%) zakwalifikowanych do przeszczepienia serca i kardiomiocytach izolowanych z mięśnia sercowego od dawców umierających w mechanizmie śmierci mózgowej lub w wyniku wypadków komunikacyjnych, z wykluczoną kardiomiopatią na podłożu niedokrwinnym, przerostowym lub zastawkowym, przy czym pobranego serca ostatecznie nie przeszczepiono z przyczyn medycznych (niezgodność tkankowa lub nieprawidłowe wymiary). Do badania włączono materiał tkankowy pobrany z 17 serc chorych z DCM oraz 8 serc pobranych od zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną. Próbkę kardiomiocytów pobierano z okolicy koniuszka

lewej komory i przechowywano w temperaturze 4°C przez maksymalnie 6 godzin po ustaniu krążenia wieńcowego, następnie zamrażano w temperaturze -80°C do czasu wykonywania izolacji proteomu mitochondrialnego. Do izolacji proteomu mitochondrialnego używano standardowych technik ekstrakcji i lizy mitochondriów, zaś w celu rozdzielenia poszczególnych białek – technik elektroforezy i spektrofotometrii masowej. W celu identyfikacji poszczególnych znanych białek mitochondrialnych korzystano z nowoczesnej technologii SRM (*selected reaction monitoring*), ponadto izolowano również transkryptom mitochondrialny (RNA) w celu sekwencjonowania materiału genetycznego mitochondriów i oceny poziomu ekspresji genów w odniesieniu do poszczególnych białek. Szczegółową metodologię laboratoryjną i molekularną opisano w pracy w części poświęconej metodologii. Ostatecznie proteom mitochondrialny udało się wyizolować z materiału tkankowego 8 chorych z DCM.

Zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej przeważali mężczyźni (odpowiednio 82% i 63%) w średnim wieku 55 lat. W chwili włączenia do badania chorzy z DCM byli w III–IV klasie czynnościowej według *New York Heart Association* (NYHA), przy średniej LVEF wynoszącej  $24 \pm 7\%$ .

W prezentowanym materiale tkankowym pochodzącym od chorych z DCM zidentyfikowano łącznie 17 białek mitochondrialnych. Większość białek zidentyfikowanych w tej grupie chorych była zaangażowana w procesy energetyczne kardiomiocytów, takie jak wykorzystanie substratów energetycznych (białka ETFD, DLDH) i produkcja energii (ATPA). Pozostałe białka należały do grupy białek strukturalnych lub pośredniczących w syntezie innych białek i odpowiedzi na stres oksydacyjny, takich jak EFTU i PRDX3. Większość białek pochodziła z macierzy mitochondrialnej lub błony wewnętrznej mitochondrium.

Analiza statystyczna różnic w ekspresji białek mitochondrialnych między chorymi z dysfunkcją skurczową lewej komory w przebiegu DCM a osobami zdrowymi wykazała, że białka zaangażowane w procesy wykorzystania substratów energetycznych (12 z 17 białek, w tym ODP, ETFD i DLDH) i produkcji energii (ATPA, EFTU) ulegają istotnej nadekspresji w kardiomiocytach chorych z DCM, podobnie jak białka uczestniczące w procesach inaktywacji wolnych rodników tlenowych, takie jak PRDX3. Białko antyoksydacyjne PRDX3 było jedynym białkiem, w przypadku którego udało się zidentyfikować istotną statystycznie zależność między poziomem

nadekspresji a upośledzeniem funkcji skurczowej lewej komory mierzonej zarówno LVEF ( $r = -0,62$ ;  $p < 0,05$ ), jak i LVESD ( $r = 0,73$ ;  $p < 0,01$ ), LVEDD ( $r = 0,71$ ;  $p < 0,01$ ) i LVFS ( $r = -0,61$ ;  $p < 0,05$ ). W odniesieniu do białka PRDX3 już wcześniej udowodniono istotną rolę kardioprotekcyjną w modelach hamowania pozawałowego remodelingu lewej komory, rozwoju rozstrzeni, dysfunkcji skurczowej, włóknienia i apoptozy, co pokazuje, jak ważne są niekorzystne efekty stresu oksydacyjnego w patofizjologii niewydolności serca niezależnie od etiologii.

Ograniczeniami badania są niejednorodność grupy chorych z DCM w zakresie podłoża i efektywności stosowanego dotychczas leczenia (mimo wykluczenia chorych z wywiadem rodzinnym kardiomiopatii, etiologii niedokrwiennej, zastawkowej, przerostowej uszkodzenia mięśnia sercowego) oraz pobieranie materiału tkankowego z jednego miejsca w mięśniu sercowym, co ogranicza ocenę ekspresji białek w pozostałych miejscach i warstwach tego mięśnia [2].

**Prezentowane badanie jest pierwszym przykładem oceny całościowej ekspresji białek mitochondrialnych w tkance mięśnia serca chorych z kardiomiopatią rozstrzeniową. W uszkodzonym mięśniu serca istotnej nadekspresji ulegają białka zaangażowane w procesy przetwarzania energii oraz białka o funkcjach antyoksydacyjnych, w tym PRDX3, którego podwyższone stężenie koreluje z upośledzeniem funkcji skurczowej lewej komory, dowodząc aktywacji mechanizmów kardioprotekcyjnych opartych na redukcji poziomu stresu oksydacyjnego w tkance uszkodzonego mięśnia serca.**

## Konflikt interesów

Autor nie zgłasza konfliktu interesów.

## Piśmiennictwo

1. Shen F.F., Jiang T.H., Jiang J.Q. i wsp. Traditional Chinese medicine Tongxinluo improves cardiac function of rats with dilated cardiomyopathy. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014; 2014: 323870. doi:10.1155/2014/323870.
2. Roselló-Lletí E., Tarazón E., Barderas M.G. i wsp. Heart mitochondrial proteome study elucidates changes in cardiac energy metabolism and antioxidant PRDX3 in human dilated cardiomyopathy. *PLoS One* 2014; 9: e112971. doi:10.1371/journal.pone.0112971.