



Oficjalny organ
Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego

Polish Cardiac Society
the Official Peer Review Journal
since **1957**

Indexed in:
ISI Journal Master List, ISI Science Citation
Index Expanded (by Thomson Reuters Scientific),
Index Medicus/MEDLINE, EMBASE, Excerpta Medica,
Elsevier BIOBASE, Scopus, Index Copernicus (IC),
KBN/MNiSW, Directory of Open Access Journals (DOAJ)
and Polish Medical Library (GBL).

SUPLEMENT III

Październik 2008, tom 66, nr 10
October 2008, vol. 66, number 10

Sekcja Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego

Prace pogładowe

Wpływ okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej na funkcję naczyń

Nieprawidłowa odpowiedź na kwas acetylosalicylowy
– definicje i zasady postępowania w świetle poznanych czynników ryzyka

Remodeling mięśnia sercowego w przebiegu tachyarytmii nadkomorowych

Nikotynamid i jego metabolit – N-methylonikotynamid – tylko witamina
czy może nowy lek do walki z chorobami układu krążenia i hemostazy?

Znaczenie apoptozy w patogenezie miażdżycy

Aliskiren – doustny inhibitor reniny

Streszczenia

XIII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej
Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego
Komisji Krążenia i Oddychania Komitetu Nauk Fizjologicznych PAN
Komisji Kardiologii Komitetu Patofizjologii Klinicznej PAN
16–18 października 2008 r.
Białystok

KARDIOLOGIA POLSKA

Polish Heart Journal

miesięcznik Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego

Official Monthly Peer-Reviewed Journal of the Polish Cardiac Society, since 1957

Indexed in: ISI Journal Master List, ISI Science Citation Index Expanded (by Thomson Reuters Scientific),

Index Medicus/MEDLINE, EMBASE, Excerpta Medica, Elsevier BIOBASE, Scopus, Index Copernicus (IC),

KBN/MNiSW, Directory of Open Access Journals (DOAJ) and Polish Medical Library (GBL)

redaktor naczelny/*editor-in-chief*

Piotr Kutakowski

zastępca redaktora naczelnego/

deputy editor

Bronisław Bednarz

sekretarz redakcji/*managing editor*

Urszula Grochowicz

honorowy redaktor Kardiologii Polskiej/

honorary editor

of the Polish Heart Journal

Leszek Ceremużyński

biuro redakcji/*office manager*

Sylvia Skibińska

adres redakcji/*address*

Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

ul. Stawki 3a, lok. 3

00-193 Warszawa

tel./faks +48 22 887 20 56-7

<http://www.kardiologiapolska.pl>

e-mail: kardiologiapolska@ptkardio.pl

międzynarodowa rada naukowa/

international scientific board

Eugene Braunwald (US)

Michel Bertrand (FR)

Günter Breithardt (DE)

John Camm (GB)

William McKenna (GB)

Lionel H. Opie (ZA)

Philip A. Poole-Wilson (GB)

Eric Prystowsky (US)

Borys Surawicz (US)

Patric Serruys (NL)

John Taylor (GB)

Frans Van de Werf (BE)

Salim Yusuf (CND)

krajowa rada naukowa/

national scientific board

redaktorzy działów/*section editors*

Andrzej Bochenek

Barbara Dąbrowska

Robert J. Gil

Piotr Hoffman

Tomasz Pasierski

Ryszard Piotrowicz

Piotr Podolec

Franciszek Walczak

Krzysztof Wrabec

Marian Zembala

redaktorzy-konsultanci/

consulting editors

Andrzej Beręsewicz

Robert J. Gil

Jarostaw Kasprzak

Krzysztof Narkiewicz

Tomasz Pasierski

członkowie rady naukowej/

scientific board members

Grażyna Brzezińska-Rajszyz

Andrzej Budaj

Stefan Chtopicki

Andrzej Cieśliński

Barbara Cybulska

Jarostaw Drożdż

Jacek Dubiel

Ryszard Gryglewski

Włodzisław Januszewicz

Zdzisława Kornacewicz-Jach

Jerzy Korewicki

Maria Krzemińska-Pakuła

Jerzy Kuch

Bogdan Lewartowski

Andrzej Lubiński

Bohdan Maruszewski

Grzegorz Opolski

Lech Poloński

Piotr Ponikowski

Witold Rużyło

Andrzej Rynkiewicz

Stefan Rywik

Tomasz Siminiak

Janina Stępińska

Andrzej Szczeklik

Marek Sznajderman

Michał Tendera

Adam Torbicki

Wiesława Tracz

Maria Trusz-Gluza

Adam Witkowski

Henryk Wysocki

Tomasz Zdrojewski

wydawca/*publisher*

TERMEDIA Wydawnictwo

ul. Wenedów 9/1,

61-614 Poznań, Poland

tel./faks +48 61 822 77 81

e-mail: termedia@termedia.pl

<http://www.termedia.pl>

biuro w Warszawie/*Warsaw office*

tel./faks +48 22 827 75 14

e-mail: biuro.warszawa@termedia.pl

dział dystrybucji i prenumeraty/*distribution and subscriptions*

Wiesława Powierża

tel. +48 61 656 22 00

e-mail: w.powierza@termedia.pl

Nakład: 5000 egz./*Circulation of 5,000 copies*

Za treść reklam umieszczonych w *Kardiologii Polskiej* odpowiadają reklamodawcy. Reklamy leków wydawanych na receptę skierowane są tylko do lekarzy, którzy posiadają niezbędne uprawnienia do ich przepisywania.

prezes Zarządu/*president of the Management Board*

redaktor naczelny Wydawnictwa/

editor-in-chief of the Publishing House

Janusz Michalak

e-mail: j.michalak@termedia.pl

dyrektor Wydawnictwa/*director of the Publishing House*

Andrzej Kordas

e-mail: a.kordas@termedia.pl

dział marketingu i reklamy/*marketing and advertising*

Anita Jóźwiak

tel. +48 61 822 77 81 w. 14

e-mail: a.jozwiak@termedia.pl

instrukcja dla autorów: www.kardiologiapolska.pl

przysyłanie prac drogą elektroniczną:

www.kardiologiapolska.pl/panel

instruction for authors: www.kardiologiapolska.pl/en

electronic submission:

www.kardiologiapolska.pl/editorialsystem

Wydano dzięki grantowi edukacyjnemu Firmy Servier



Firma Servier nie miała żadnego wpływu na zawartość merytoryczną suplementu



**XIII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej
Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego
Komisji Krążenia i Oddychania Komitetu Nauk Fizjologicznych PAN
Komisji Kardiologii Komitetu Patofizjologii Klinicznej PAN**

16–18 października 2008 r.
Białystok

Komitet Naukowy

**Zarząd Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej
Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego**

Przewodniczący:

dr hab. n. med. Krzysztof S. Golba

Członkowie:

prof. dr hab. Zbigniew Baj

prof. dr hab. Ewa Chabielska

prof. dr hab. Stefan Chłopicki

dr hab. n. med. Marek A. Deja

dr n. med. Urszula Mackiewicz

dr n. med. Michał Mączewski

dr hab. n. med. Ryszard Smoleński

dr n. med. Tomasz Wierzb

**Komisja Krążenia i Oddychania
Komitetu Nauk Fizjologicznych PAN**

Przewodniczący:

prof. dr hab. Bohdan Lewartowski

Komisja Kardiologii Komitetu Patofizjologii Klinicznej PAN

Przewodniczący:

prof. dr hab. Waldemar Banasiak

Samodzielna Pracownia Biofarmacji

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

prof. dr hab. Ewa Chabielska

Katedra i Klinika Kardiologii

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

prof. dr hab. Włodzimierz Musiał

dr hab. n. med. Bożena Sobkowicz

dr n. med. Elżbieta Skibińska

dr n. med. Karol Kamiński

Zakład Fizjologii Doświadczalnej

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

prof. dr hab. Barbara Malinowska

dr n. med. Hanna Kozłowska

Komitet Organizacyjny Sympozjum

Samodzielna Pracownia Biofarmacji

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

prof. dr hab. Ewa Chabielska

mgr farm. Adrian Stankiewicz

mgr farm. Anna Gromotowicz

Dorota Kondratowicz

Urszula Osmólska

ul. Mickiewicza 2c, 15-089 Białystok

tel.: +48 85 748 56 07, e-mail: biofarm@umwb.edu.pl

Katedra i Klinika Kardiologii

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

prof. dr hab. Włodzimierz Musiał

dr hab. Bożena Sobkowicz

dr n. med. Elżbieta Skibińska

dr n. med. Karol Kamiński

ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-276 Białystok

tel.: +48 85 746 86 56, e-mail: musialwj@poczta.onet.pl

Stowarzyszenie Przyjaciół Serca

ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a, 15-276 Białystok

tel./faks: +48 85 746 86 56/746 86 04

Redakcja Suplementu

dr hab. n. med. Krzysztof S. Golba

prof. dr hab. Ewa Chabielska

lek. med. Tomasz Roleder

Spis treści

Prace poglądowe

- _S 317 Wpływ okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej na funkcję naczyń
- _S 326 Nieprawidłowa odpowiedź na kwas acetylosalicylowy – definicje i zasady postępowania w świetle poznanych czynników ryzyka
- _S 332 Remodeling mięśnia sercowego w przebiegu tachyarytmii nadkomorowych
- _S 341 Nikotynamid i jego metabolit – N-metylonikotynamid – tylko witamina czy może nowy lek do walki z chorobami układu krążenia i hemostazy?
- _S 347 Znaczenie apoptozy w patogenezie miażdżycy
- _S 358 Aliskiren – doustny inhibitor reniny

Streszczenia

- _S 363–S 386

Indeks autorów streszczeń

- _S 387

Wpływ okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej na funkcję naczyń

The influence of perivascular adipose tissue on the vascular tone and function

Marcin Malinowski¹, Marek A. Deja¹, Krzysztof S. Gołba², Piotr Janusiewicz¹, Tomasz Roleder², Stanisław Woś¹

¹ II Klinika Kardiochirurgii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

² Klinika Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Streszczenie

Ostatnie badania sugerują parakrynną rolę okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej w regulacji napięcia i funkcji naczyń. Udowodniono wydzielanie przez adipocyty tkanki okołonaczyniowej szeregu substancji określanych łącznie jako adipokiny. Ich działanie zarówno lokalne, jak i ogólnoustrojowe wpływa na homeostazę masy ciała i liczne procesy metaboliczne. Adipokinom przypisuje się główną rolę w procesach zapalenia, insulinooporności, cukrzycy i tworzenia zmian miażdżycowych. Szczegółowe komórkowe mechanizmy łączące otyłość i nadciśnienie nie są do końca poznane, jednak uważa się, że ważną funkcję pełnią różne mediatory pochodzenia tłuszczowego. W pracy opisano aktywność okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej i jej wpływ na czynność naczyń krwionośnych. Przedstawiono wazoaktywne adipokiny, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w procesie aterogenezy. Opiszano także znane mechanizmy działania tłuszczopochodnego czynnika rozkurczowego (ADRF) – nowej adipokiny wpływającej na utrzymanie właściwego napięcia ściany naczyniowej.

Słowa kluczowe: adipokiny, tkanka tłuszczowa, ADRF, tkanka okołonaczyniowa, naczynia krwionośne

Abstract

Recent studies suggest paracrine role of perivascular adipose tissue in the regulation of vascular tone and function. It was proved that adipocytes of perivascular tissue release several substances named adipokines. Their both local and systemic action influence body mass homeostasis and many metabolic processes. Adipokines play the crucial role in inflammation, insulin resistance, diabetes and atherogenesis. The precise mechanisms linking obesity and hypertension are not fully understood however adipocyte derived mediators may significantly contribute to the development of these diseases. The authors present the activity of perivascular adipose tissue and its influence on blood vessels function. The vasoactive adipokines are described with the emphasis on their role in the process of atherogenesis. The up to date known mechanisms of action of adipocyte derived relaxing factor (ADRF) – new adipokine influencing vascular tone are described as well.

Keywords: adipokines, adipose tissue, ADRF, perivascular tissue, blood vessels

Kardiologia Polska 2008; 66: 10 (supl. 3): 317–325

Ściana naczynia krwionośnego składa się z trzech warstw: 1 – błony wewnętrznej (*intima*), 2 – warstwy środkowej (*media*) oraz 3 – przydanki (*adventitia*). Błona środkowa to warstwa złożona głównie z okrężnie rozmieszczonej mięśniówki gładkiej naczyń oraz macierzy zewnątrzkomórkowej. W skład przydanki wchodzi przede wszystkim liczne fibroblasty zatopione w kolagenowej macierzy zewnątrzkomórkowej, a ponadto zakończenia nerwowe i naczynia naczyni (*vasa vasorum*).

Powszechnie wiadomo, że za utrzymanie odpowiedniej reakcji naczynioruchowej odpowiada mięśniowa błona środkowa naczynia reagująca odpowiednio skurczem lub rozkurczem na substancje wydzielane z najbardziej wewnętrznej warstwy błony wewnętrznej – śródłonka. Długo uważano, że rola błony zewnętrznej ogranicza się do funkcji strukturalnych i mechanicznych, z niewielkim udziałem w reakcji naczyń poprzez bodźce pochodzące z ułożonych w niej zakończeń nerwowych [1]. Wiado-

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Marek A. Deja, II Katedra i Klinika Kardiochirurgii, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Ziołowa 47, 40-635 Katowice, tel.: +48 32 252 60 93, e-mail: mdeja@slam.katowice.pl

mo jednak, że przydanka jest źródłem aktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), które zmniejszają dostępność tlenku azotu (NO) pochodzenia śródbłonkowego. Tlenek azotu może być także produkowany w samej przydancie poprzez neuronalną syntazę NO [2] lub pochodzić z śródbłonka *vasa vasorum*. Na zewnątrz od przydanki, nie będąc morfologicznie jej częścią, rozlokowana jest okołonacyniowa tkanka tłuszczowa (ang. *perivascular adipose tissue*, PVAT). Okołonacyniowe adipocyty są komórkami pozostającymi w ścisłym kontakcie z warstwą zewnętrzną naczyń (odległość mniejsza niż 100 µm od naczynia) [3]. Z wyjątkiem aorty, gdzie występuje mieszanina brązowej i białej tkanki tłuszczowej, tkanka okołonacyniowa w większości naczyń składa się z białej tkanki tłuszczowej. Współczesne badania jasno pokazują niezaprzeczalną rolę adipocytów w regulacji napięcia i przebudowy naczyń, co w sposób bezpośredni może przekładać się na ich rolę w patofizjologii takich chorób, jak nadciśnienie tętnicze czy miażdżyca.

Endokrynną funkcją tkanki tłuszczowej

Tradycyjny obraz tkanki tłuszczowej jako biernego magazynu energii odchodzi pomatu do lamusa. Tkanka tłuszczowa nie jest tylko magazynem triacylogliceroli i źródłem wolnych kwasów tłuszczowych. W trakcie rozwoju komórkowego preadipocyty zyskują możliwość syntezy różnych produktów białkowych, z których wiele jest wydzielanych jako: enzymy, cytokiny, chemokiny, czynniki wzrostu i hormony działające zarówno na drodze endo-, jak i parakrynej [4]. Po odkryciu leptyny w 1994 r. [5] bardzo szybko wzrosła liczba odkrywanych substancji białkowych wydzielanych przez tkankę tłuszczową. Obecnie wiadomo, że adipocyty wydzielają prawie 50 różnych substancji zwanych wspólnie adipokinami (nazwa preferowana w stosunku do wcześniej zaproponowanej – adipocytokiny) – Tabela I. Do chwili obecnej wykazano, że adipocyty tkanki okołonacyniowej wydzielają szereg cytokin, takich jak: czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), interleukina 1 (IL-1), antagonist interleukiny 1 (IL-1Ra), interleukina 6 (IL-6), oraz chemokin: białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1), interleukina 8 (IL-8), białko wydzielane pod wpływem interferonu γ (IP-10) oraz chemokina CCL5 (ang. *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*, RANTES). W związku z tym, że PVAT dopiero „wchodzi na salony nauki” z pewnością wkrótce lista ta znacznie się wydłuży.

W opisie działania poszczególnych adipokin skoncentrowano się na ich wpływie na układ naczyniowy, pomijając szereg wielokierunkowych działań metabolicznych.

Układ renina-angiotensyna

Wszystkie składniki układu renina-angiotensyna-aldosteron zostały zidentyfikowane w tkance tłuszczowej [6]. Angiotensynogen jest prekursorem angiotensyny II uznawanej za najbardziej proaterogenny peptyd skurczowy. Angiotensyna II, obok skurczu naczyń, powoduje ich przebu-

downę oraz wpływa na pęknięcie blaszki miażdżycowej, stymuluje molekuly adhezyjne: międzykomórkową (ICAM-1) i naczyniową (VCAM-1), białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1) oraz ekspresję czynnika pobudzającego tworzenie koloni makrofagów (M-CSF) w komórkach naczyń [7]. Powoduje to większą adhezję monocytów/makrofagów oraz aktywację płytek krwi w ścianie naczyniowej. Angiotensyna II stymuluje także tworzenie wolnych rodników tlenkowo-azotowych. Zmniejsza to dostępność NO oraz powoduje niszczenie ściany naczyniowej [8]. Z drugiej strony angiotensyna II pobudza produkcję i wydzielanie prostacykliny, która z kolei jest czynnikiem powodującym przekształcanie preadipocytów w dojrzałe komórki tłuszczowe [9]. Wzmoczoną produkcję angiotensynogenu przez tkankę tłuszczową w otyłości powiązano też z angiogenezą [10] oraz rozwojem nadciśnienia tętniczego [4].

Leptyna

Leptyna to produkt genu *ob* o ciężarze cząsteczkowym 16 kDa, który działając ośrodkowo, wpływa głównie na kontrolę zaspokajania głodu, wydatkowania energii oraz funkcje neuroendokrynną. Leptyna wywiera zarówno ochronny, jak i szkodliwy wpływ na układ sercowo-naczyniowy [11]. Myszy pozbawione genu leptyny, gdy są otyłe, są odporne na nadciśnienie i zakrzepicę; podaż leptyny w tej grupie stymuluje rozrost neointymy, podczas gdy zahamowanie działania leptyny przy pomocy przeciwciał chroni myszy szczepu dzikiego przed zakrzepicą – sugeruje to prozakrzepowe działanie leptyny [12]. Właściwości naczynioruchowe leptyny są wyjątkowe. Reguluje ona ciśnienie krwi, angażując dwa przeciwstawne mechanizmy: rozkurcz naczyń poprzez wydzielanie NO i czynnika hiperpolaryzującego pochodzenia śródbłonkowego (EDHF) [13] oraz z drugiej strony skurcz naczyń poprzez ośrodkowe działanie na układ współczulny [14].

Adiponektyna

Adiponektyna (Acrp30) jest białkiem produkowanym prawie wyłącznie przez białą tkankę tłuszczową. Jej stężenie stanowi 0,01% całkowitego stężenia białek krwi [15]. Adiponektyna ma właściwości przeciwmiażdżycowe, odgrywa główną rolę w zapobieganiu rozwojowi chorób naczyń (w tym miażdżycy) w otyłości. Takie działanie jest efektem zmniejszenia zależnej od TNF- α adhezji monocytów do śródbłonka, hamowania przekształcania makrofagów w komórki piankowate oraz zmniejszenia aktywacji komórek śródbłonka [16]. Adiponektyna hamuje ekspresję IL-8 w komórkach śródbłonka oraz zwiększa produkcję przeciwwzpalnej IL-10 i tkankowego inhibitora metaloproteiny-1 w makrofagach [17]. Działa ona także antyapoptotycznie na komórki śródbłonka. Istnieją dowody na jej wpływ na wzrost nowych naczyń. Rola adiponektyny w przebudowie naczyń krwionośnych to przede wszystkim hamowanie proliferacji komórek mięśniówki gładkiej naczyń [hamowanie kinazy regulowanej sygna-

Tabela I. Adipokiny i ich główne kierunki działania

Adipokina	Główny wpływ
LPL	metabolizm lipidów
HSL	metabolizm lipidów
CETP	metabolizm lipidów
Perilipina	metabolizm lipidów
apoE	metabolizm lipidów
aP2	metabolizm lipidów
RBP-4	metabolizm lipidów
Leptyna	mechanizmy głodu – sytości, reprodukcja, angiogeneza, odporność
Agouti	metabolizm
Aromataza P450	metabolizm lipidów
Hormony sterydowe	metabolizm lipidów, insulinooporność
TNF- α	zapalenie, insulinooporność, miażdżycy
IL-6	zapalenie, insulinooporność, miażdżycy
Adiponektyna	zapalenie, insulinooporność, miażdżycy
Angiotensynogen	homeostaza naczyniowa
PAI-1	homeostaza naczyniowa
TGF- β	adhezja i migracja komórek, wzrost, różnicowanie
IL-1/IL-Ra	zapalenie, miażdżycy
FIAF	mechanizmy głodu – sytości, insulinooporność
MCP-1	miażdżycy
Rezystyna	zapalenie, insulinooporność, miażdżycy
Visfatyna	insulinooporność
PPAR- γ	metabolizm lipidów, zapalenie, homeostaza naczyniowa
IL-8	zapalenie, miażdżycy
IL-10	zapalenie
IGF-1	metabolizm lipidów, insulinooporność
CCL5	zapalenie
VEGF	angiogeneza
Chemeryna	odporność, homeostaza metaboliczna
CRP	zapalenie, insulinooporność, miażdżycy
Apelina	insulinooporność
ZAG	insulinooporność
Adipsyna/ASP	odpowiedź immunologiczna
Monobutyryna	rozkurcz mikronaczyń, angiogeneza
Metalotioneina	odpowiedź immunologiczna

LPL – lipaza lipoproteinowa, HSL – lipaza hormonowrażliwa, CETP – białko transportujące estry cholesterolu, RBP – białko wiążące retinol, aP2 – adipocytowe białko wiążące lipidy, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu, FIAF – czynnik tłuszczowy indukowany głodem, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu, VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów, PPAR- γ – receptory aktywowane przez proliferatory peroksyosomów, IGF-1 – insulinowy czynnik wzrostu, CCL5 – chemokina 5, CRP – białko C-reaktywne, ZAG – cynkowa α 2-glikoproteina

łem zewnątrzkomórkowym (ERK)]. Ponadto udowodniono bezpośredni wpływ rozkurczowy adiponektyny poprzez aktywację kanałów potasowych zależnych od potencjału (Kv) [18]. Stężenie adiponektyny jest zmniejszone w otyłości i insulinooporności. Jej stężenia odwrotnie korelują z czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, jak hiperlipidemia, stężenie CRP czy nadciśnienie. Zaobserwowano, że jej zwiększone stężenie jest związane z redukcją ryzyka zawału serca u mężczyzn [19]. Jednak są także badania, w których nie zaobserwowano tego związku [20].

Interleukina 1

Okołonaczyniowe adipocyty produkują zarówno interleukinę 1 (IL-1 α , IL-1 β), jak i jej naturalnego antagonistę IL-1Ra [21]. IL-1 α i IL-1 β wykazują działanie prozapalne, pirogenne oraz stymulujące wydzielanie innych cytokin. IL-1 ma także właściwości proangiogenne. IL-1Ra jako antagonistą działa przeciwzapalnie, wpływa stymulująco na różnicowanie adipocytów oraz proliferację fibroblastów i komórek mięśni gładkich [3]. Produkcja IL-1/IL-1Ra poprzez PVAT może więc odgrywać rolę modulującą w tworzeniu lokalnych zmian miażdżycowych poprzez regulację stanu zapalnego i proliferacji komórek mięśni gładkich.

Interleukina 6

Interleukina 6 charakteryzuje się plejotropowym działaniem na wiele tkanek. Powoduje m.in. wzrost aktywności lipolitycznej, wzrost produkcji białek ostrej fazy, aktywację osi podwzgórze-prysadka oraz regulację termogenezy. W związku z tematem niniejszego artykułu interesująca jest rola IL-6 jako mediatora reakcji zapalnej oraz jako cytokiny, której wydzielanie jest indukowane reakcją stresową. Prozapalna rola IL-6 i jej zaangażowanie w rozwój chorób układu sercowo-naczyniowego oparte są na jej zdolności od indukcji reakcji ostrej fazy [22]. Działanie to wyzwalane jest bezpośrednio, jak i poprzez wzrost wydzielania IL-1 i TNF- α . Wszystkie te 3 cytokiny biorą udział w procesie aterogenezy w naczyniach krwionośnych [22]. Ponadto wpływ IL-6 na proliferację komórek mięśniówki gładkiej naczyń oraz stymulację płytek krwi i makrofagów powoduje stan prozakrzepowy oraz dysfunkcję śródbłonna [22]. Istnieją także doniesienia o rozkurczowym działaniu IL-6 w warunkach *in vivo* na naczynia oporowe mięśni szkieletowych [23]. Udowodniono wzrost zarówno osoczowego, jak i lokalnego stężenia IL-6 w tkance tłuszczowej u otyłości i insulinooporności.

Interleukina 8

Interleukina 8 (IL-8) odgrywa główną rolę w ostrej reakcji zapalnej poprzez rekrutację i aktywację neutrofilii. Powoduje także proliferację i migrację komórek mięśniówki gładkiej naczyń, spełnia istotną rolę w chemotaksji oraz adhezji monocytów do komórek śródbłonna – najważniejszym etapie zapoczątkowującym miażdżycę [24]. Rola

IL-8 nie ogranicza się do udziału w reakcji zapalnej – powoduje ona także proliferację komórek śródbłonna oraz ma silne właściwości angiogenne. Udowodniono, że PVAT wydziela istotne ilości IL-8 [21]. Może to świadczyć o udziale tej cytokiny w procesie lokalnego tworzenia blaszek miażdżycowych. Osoczowe stężenie IL-8 jest wyraźnie podniesione nie tylko u osób otyłych [25], ale także w trakcie ostrego zawału mięśnia sercowego i w niestabilnej postaci choroby wieńcowej [26].

Czynnik martwicy nowotworów alfa

Pierwszą cytokiną, której wydzielanie z adipocytów odkryto w 1993 r., był czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α). Jest to cytokina zapalna wydzielana w dużych ilościach u osób otyłych z insulinoopornością, która nie tylko inicjuje, ale także stymuluje przebieg tworzenia zmian miażdżycowych. Dzieje się to poprzez jej wpływ na wzrost ekspresji molekuł adhezyjnych i E-selektyny na komórkach śródbłonna i mięśni gładkich naczyń. TNF- α zmniejsza biodostępność NO w śródbłonnku, osłabiając rozkurcz naczyń zależny od śródbłonna oraz powodując upośledzenie funkcji śródbłonna [27]. Może on także powodować apoptozę komórek śródbłonna, pogłębiając przez to jego dysfunkcję [28]. Część z negatywnych działań TNF- α na naczynia krwionośne może wynikać z jego udziału w rozwoju insulinoopornej cukrzycy wraz z następczą znaczną hiperglikemią [29].

Białko C-reaktywne

Białko C-reaktywne (CRP) jest białkiem ostrej fazy syntetyzowanym głównie w wątrobie i tkance tłuszczowej, którego stężenie jest regulowane przez inne cytokiny: IL-6, IL-1 i TNF- α [30]. CRP bezpośrednio uczestniczy w procesie aterogenezy poprzez wpływ na funkcję śródbłonna. Stymuluje ekspresję molekuł adhezyjnych, MCP-1 oraz IL-6. CRP hamuje podstawową i stymulowaną produkcję NO poprzez hamowanie tworzenia śródbłonkowej syntazy NO (eNOS) [31]. Zmniejszenie produkcji NO osłabia rozkurcz naczyń oraz hamuje angiogenezę. Niekorzystny wpływ CRP na funkcję śródbłonna jest wzmacniany w przypadku hiperglikemii. W komórkach mięśni gładkich naczyń CRP wzmacnia ekspresję receptorów dla angiotensyny II (AT II), wzmacniając tym siłę skurczu naczyń. Przy udziale CRP zaburzona jest więc relacja skurczu/rozkurczu, co zaobserwowano w nadciśnieniu tętniczym. CRP pełni także rolę modulującą, wzmagając aktywność prozapalną innych adipokin, np. prozakrzepowego białka ostrej fazy (ang. *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1) [30]. Poziom CRP ewidentnie koreluje z zespołem metabolicznym oraz jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju cukrzycy i zapadalności na choroby układu sercowo-naczyniowego [32, 33].

Białko chemotaktyczne monocytów

Białko chemotaktyczne monocytów – MCP-1 (CCL2) – jest chemokiną będącą głównym mediatorem procesu

rekrutacji makrofagów w trakcie aterogenezy. Receptor dla MCP-1 zlokalizowany jest na krążących monocytach oraz komórkach mięśniówki naczyń, co pokazuje także rolę MCP-1 w proliferacji mięśniówki. MCP-1 pobudza syntezę leptyny i wraz z nią uczestniczy w procesie neoangiogenezy. W badaniach immunohistochemicznych wyraźnie wykazano wydzielanie tej chemokiny przez PVAT [21]. Stężenie osoczowe MCP-1 koreluje ze wzrostem masy ciała. MCP-1 kontroluje adipogenezę oraz odróżnicowanie adipocytów poprzez mechanizmy para- i autokrynne.

Chemokina CCL5

Chemokina CCL5 (RANTES) to kolejna chemokina wydzielana przez adipocyty, która wpływa na rozwój zmian miażdżycowych w naczyniach. Jej produkcja przez PVAT jest regulowana przez interferon beta i IL-1 [3]. CCL5 działa chemotaktycznie w stosunku do limfocytów T i makrofagów. Wykazano, że antagonizm receptorów dla tej chemokiny wyraźnie zmniejsza tworzenie blaszek miażdżycowych [34].

Rezystyna

Rezystyna to stosunkowo nowo odkryty hormon specyficzny dla tkanki tłuszczowej, którego poziom rośnie w otyłości spowodowanej dietą lub genetycznie [35]. Udowodniono, że rezystyna wywiera swoje bezpośrednie skurczowe działanie wazoaktywne poprzez wpływ na komórki śródbłonna i wzrost wydzielania endoteliny (ET-1) [36] oraz poprzez hamowanie aktywności enzymatycznej syntazy eNOS [37]. Prawdopodobnie rezystyna uczestniczy w procesach zapalenia i aterogenezy, jako że zwiększa ona ekspresję molekuł adhezyjnych na komórkach śródbłonna [36]. Powiązано też rozwój nadciśnienia tętniczego w cukrzycy typu 2 z hiperrezystynemią [38]. Rezystyna może służyć także jako marker zapadalności na zawał serca [39].

Monobutyryna

Monobutyryna (1-butyryl-glicerol) to pochodna lipidowa produkowana przez adipocyty w trakcie procesu lipolizy. Jest ona silnym czynnikiem proangiogennym, który może brać udział w procesie nowotworzenia naczyń w trakcie rozrostu tkanki tłuszczowej [40]. Udowodniono także silne działanie naczyniorozkurczowe monobutyryny na tętnicę śródkiową siatkówki u szczurów [41].

Parakrynną regulacją napięcia naczyniowego – ADRF

W 1991 r. Soltis i Cassis jako pierwsi porównali funkcję skurczową fragmentów aorty z zachowaną przydanką z fragmentami pozbawionymi przydanki. Pierwszym ważnym odkryciem było utrzymanie właściwości mechanicznych naczyń niezależnie od obecności przydanki. Po drugie wykazali oni, że okotonaczyniowa tkanka tłuszczowa odgrywa istotną rolę w odpowiedzi skurczowej aorty na norepinefrynę [42]. Idąc tym śladem, Lohn i wsp. w 2002 r.

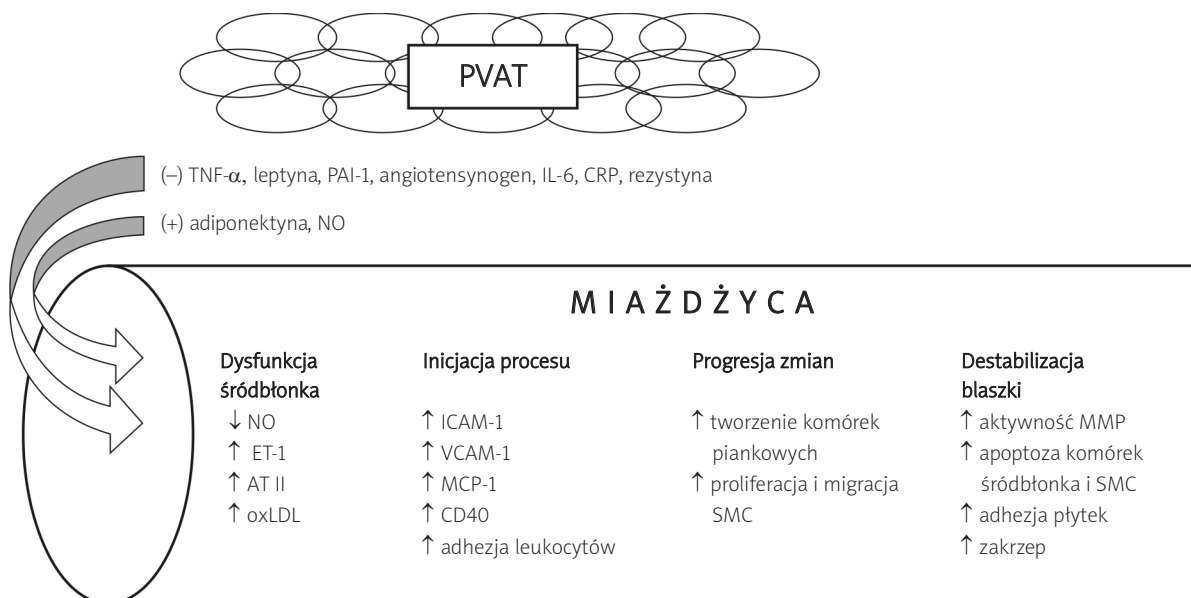
opisali działanie czynnika rozkurczowego pochodzenia przydankowo-tłuszczowego (ang. *adventitium-adipocyte-derived relaxing factor*, ADRF). Grupa ta wykazała, że substancja rozkurczowa jest wydzielana przez tkankę okotonaczyniową zależnie od stężenia jonów Ca^{2+} . Zasugerowali oni także, że czynnik ma naturę białkową, gdyż podczas podgrzania dochodzi do dezaktywacji funkcji rozkurczowej ADRF. Próbując ustalić dokładny mechanizm działania, sprawdzono, że synteza i działanie przeciwskurczowe nie zależy od szlaku powiązanego z cytochromem P450, tworzeniem NO czy aktywacją receptorów adenozytowych [43]. Kolejne badania ustaliły, że wydzielanie ADRF regulowane jest poprzez wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, w których bierze udział kinaza tyrozynowa i kinaza białkowa A [44]. Po weryfikacji, że działanie rozkurczowe ADRF zanika przy wysokim zewnątrzkomórkowym stężeniu jonów K^+ , zasugerowano kluczową rolę kanałów potasowych dla ujawnienia efektu przeciwskurczowego. Pierwotnie podejrzewano, że w aorcie szczura w działaniu ADRF uczestniczą kanały potasowe ATP-zależne (K_{ATP}) [43]. Verlohren i wsp. na szczurach szczepu Sprague-Dawley opisali rozkurczowy wpływ tkanki okotonaczyniowej tętnicy krezkowej. Działanie to w tym wypadku zależne było od kanałów potasowych regulowanych napięciem mięśniówki gładkiej naczyń (K_v) [45]. Kolejnym odkryciem tej grupy była dodatnia zależność działania rozkurczowego ADRF od ilości tłuszczu okotonaczyniowego [45]. We wspomnianej pracy pokazano ponadto większą hiperpolaryzację spoczynkowego potencjału błonowego tętnicy krezkowej z nienaruszoną przydanką w stosunku do naczyń pozbawionych tkanki okotonaczyniowej. Wynik ten dobitnie pokazuje rolę PVAT w utrzymaniu napięcia spoczynkowego tętnicy krezkowej u szczura. Fakt różnych mechanizmów działania ADRF w zależności od naczynia potwierdzili też Gao i wsp., wykazując, że w tętnicy piersiowej wewnętrznej ADRF ujawnia swoje właściwości poprzez aktywację kanałów potasowych zależnych od wapnia (K_{Ca}) [46]. Powód różnorodności kanałów K^+ aktywowanych przez ADRF pozostaje niejasny. Może ona być związana z różnym rozmieszczeniem tych kanałów w różnych naczyniach i u różnych gatunków, może jednak sugerować różnice w działaniu tkanki okotonaczyniowej w zależności od naczynia lub istnienie kilku różnych substancji w ramach grupy ADRF. Istotne rozbieżności istnieją w odniesieniu do udziału śródbłonna w wydzielaniu i działaniu ADRF. Pierwotnie z faktu, że naczynia otoczone tkanką okotonaczyniową kurczyły się słabiej nawet po mechanicznym usunięciu śródbłonna, wyciągnięto wniosek o niezależności działania ADRF od endotelium [43]. Blokada syntazy NO przy pomocy L-NMMA także nie miała wpływu na osłabiony skurcz w przypadku naczyń z PVAT [43]. Nasze badania również potwierdziły, że rozkurczowe właściwości rozpuszczalnego w wodzie czynnika przeciwskurczowego wydzielanego z okotonaczyniowej tkanki tłuszczowej tętnicy piersiowej wewnętrznej nie są zależne od dwóch naj-

Tabela II. Wazoaktywne adipokiny

Adipokina	Działanie naczyniowe
Adiponektyna	<ul style="list-style-type: none"> ↑ rozkurcz naczyń poprzez aktywację kanałów K_v ↓ ICAM-1, VCAM-1, selektyna E ↓ NF-κB ↓ przekształcanie makrofagów do komórek piankowych ↓ proliferacja komórek mięśni gładkich
Angiotensynogen Angiotensyna II	<ul style="list-style-type: none"> ↑ pobudzenie receptorów AT_1 – skurcz naczyń ↓ dostępność NO ↑ NF-κB ↑ ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, M-CSF ↓ angiogeneza
CRP	<ul style="list-style-type: none"> ↓ NO poprzez destabilizację eNOS mRNA i zmniejszenie ekspresji białek ↑ uwalnianie ET-1, IL-6 ↑ VCAM-1, ICAM-1, selektyna oraz MCP-1 w komórkach śródbłonka ↓ angiogeneza ↑ apoptoza komórek śródbłonka ↑ proliferacja komórek mięśni gładkich, restenoza ↑ AT_1-R na komórkach mięśni gładkich
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> ↑ ICAM-1, selektyna E, VCAM-1, MCP-1 ↑ proliferacja i migracja komórek mięśni gładkich ↑ rozkurcz naczyń
IL-8	<ul style="list-style-type: none"> ↑ proliferacja komórek śródbłonka ↑ angiogeneza
Leptyna	<ul style="list-style-type: none"> ↑ skurcz, rozkurcz naczyń ↑ NO poprzez wzrost produkcji eNOS ↑ ET-1 ↑ proliferacja i migracja komórek śródbłonka i mięśni gładkich ↑ akumulacja ROS, stres oksydacyjny ↑ angiogeneza ↑ uwalnianie M-CSF
PAI-1	<ul style="list-style-type: none"> ↑ tworzenie zakrzepu ↑ restenoza
Rezystyna	<ul style="list-style-type: none"> ↑ uwalnianie ET-1 – skurcz ↓ spadek aktywności eNOS ↑ ekspresja chemokin i molekuł adhezyjnych ↓ TRAF-3
TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> ↓ biodostępność NO ↓ rozkurcz naczyń ↑ NF-κB poprzez ROS ↑ VCAM-1, ICAM-1, selektyna E, MCP-1 w komórkach śródbłonka i mięśni gładkich ↑ apoptoza komórek śródbłonka
PGI ₂	<ul style="list-style-type: none"> ↑ rozkurcz naczyń
ADRF	<ul style="list-style-type: none"> ↑ rozkurcz naczyń poprzez aktywację kanałów K_{Ca}, K_V, K_{ATP}

silniejszych czynników rozkurczowych wydzielanych przez śródbłonek – NO i PGI₂ [47]. Gao i wsp. zasugerowali jednak, że mechanizm działania ADRF może być dwukierunkowy, w tym jeden z główną rolą śródbłonka [48]. Śródbłonkowe działanie relaksacyjne PVAT wg badania Gao i wsp. nie zależy od jego bezpośredniego wpływu na mięśniówkę naczynia, lecz na wcześniejszą stymulację wydzielania NO przez śródbłonek. Autorzy doszli do takiego wniosku po stwierdzeniu, że roztwór inkubacyjny z naczyń z obecną PVAT oraz zachowanym śródbłonkiem wywoływał rozkurcz w naczyniach bez PVAT i z obecnym śródbłonkiem, w przeciwieństwie do naczyń, z których mechanicz-

nie usunięto endotelium. Ponadto rozkurcz zanikał po blokadzie syntazy NO i zastosowaniu wymiatacza NO, a roztwór inkubacyjny PVAT zawierający potencjalnie ADRF zapoczątkowywał wydzielanie NO z komórek śródbłonka [48]. Wyniki prac Gao i wsp. potwierdziły jednak jednoznacznie, podobnie jak nasze badania, że ADRF nie jest substancją pochodzącą bezpośrednio ze śródbłonka. Z drugiej strony obecność tkanki okołonaczyniowej osłabiła odpowiedź skurczową także pierścieni naczyniowych pozabawionych śródbłonka. W mechanizmie działania ADRF niezależnym od śródbłonka zasugerowano udział wydzielanego przez PVAT H₂O₂. Badając mechanizm działania wa-



Rycina 1. Rola adipokiny w procesie aterogenezy. Tłuszczowa tkanka okotonaczyniowa (PVAT) jest źródłem licznych cytokin prozapalnych, które powodują dysfunkcję śródbłonna, insulinooporność i w konsekwencji kolejne etapy miażdżycy naczyń. Produkcja adiponektyny i tlenu azotu ma działanie protekcyjne, które zmniejsza się wraz z narastaniem otyłości

NO – tlenek azotu, ET-1 – endotelina, AT II – angiotensyna II, oxLDL – utlenione LDL, MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów, SMC – komórki mięśni gładkich, MMP – metaloproteinaza, ICAM-1, VCAM-1 – molekuly adhezyjne

zomodulującego H₂O₂, zaobserwowano aktywację rozpuszczalnej cykazy guanylowej (sGC), co skutkowało efektem przeciwskurczowym. Sam H₂O₂ ma jednak zarówno działanie skurczowe, jak i rozkurczowe, ujawniające się w różnych mechanizmach w zależności od jego stężenia, typu naczyń i gatunku [49]. Pomimo udowodnionej zdolności PVAT do produkcji nadtlenu [50] oraz znacznej zawartości SOD w tkance tłuszczowej [48] dokładny wpływ wydzielanego przez PVAT H₂O₂ na działanie ADRF i ich wzajemne powiązania wymagają dalszych badań. Wyniki badań Gao i wsp. skłaniają do uznania, że ADRF to być może co najmniej dwie różne substancje [48].

Wyniki dotychczas przedstawionych prac przybliżają nas stopniowo do chemicznej identyfikacji ADRF. Obecnie wiemy więc już, że mamy do czynienia z rozpuszczalną w wodzie substancją o działaniu rozkurczowym, wydzielaną najprawdopodobniej z adipocytów w zależności od zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia [44]. Ta białkowa substancja działa poprzez różne kanały potasowe, a blokada kinazy tyrozynowej i kinazy białkowej A hamuje jej wydzielanie przez tkankę tłuszczową [44]. Działanie rozkurczowe ADRF odbywa się bez udziału receptorów dla leptyny, adenozyiny [43], receptorów waniloidowych, kannabinoidowych, receptorów dla CGRP [44], szlaków cytochromu P450 czy cyklooksygenazy [43]. Niejasna pozostaje rola endotelium, wydzielanego przez komórki śródbłonna NO oraz wydzielanego przez PVAT H₂O₂ [43, 48]. Wiado-

mo, że pomimo wspólnego działania rozkurczowego poprzez kanały K_v ADRF nie jest adiponektyną [18]. Wydaje się, że w przeciwieństwie do opisywanych powyżej adipokiny, których mechanizm działania opiera się niejednokrotnie na drodze endokrynej (np. angiotensyna II, rezystyna, CRP), ADRF jest substancją głównie o charakterze lokalnym. Nie można wykluczyć, że także wiele innych adipokiny (nieopisanych szczegółowo, ale przedstawionych w Tabeli I), działa mniej lub bardziej bezpośrednio na układ naczyniowy. Mechanizmy działania wazoaktywnego głównych adipokiny przedstawiono w Tabeli II.

Okotonaczyniowa tkanka tłuszczowa a choroby sercowo-naczyniowe

W krajach rozwiniętych otyłość oraz związane z nią powikłania metaboliczne i sercowo-naczyniowe są ważnym problemem epidemiologicznym i jedną z głównych przyczyn przedwczesnych zgonów [51]. Według WHO w Europie częstość występowania otyłości potroiła się od roku 1980, a szacuje się, że ponad 4 mln osób staje się otyłymi (BMI >30) każdego roku. Wiadomo, że dieta wysokotłuszczowa i w konsekwencji otyłość wiąże się ze wzrostem ilości tkanki tłuszczowej, także tej otaczającej naczynia krwionośne [21, 52]. Stawia to PVAT w istotnym szlaku patofizjologicznym chorób powiązanych z otyłością, a więc nadciśnieniem i miażdżycą. Tkanka tłuszczowa jako bogate źródło mediatorów reakcji zapalnej może bez-

pośrednio brać udział w uszkodzeniu naczyń, insulinooporności i aterosogenezie. Te prozapalne adipokiny to przede wszystkim: TNF- α , IL-6, IL-8, leptyna, angiotensynogen, rezystyna i CRP. Poprzez swoje działanie prowadzą one do dysfunkcji śródbłonna, co jest pierwszym etapem procesu tworzenia zmian miażdżycowych (Rycina 1.). Wzrasta liczba dowodów potwierdzających jednoznaczny bezpośredni wpływ adipokina na proces aterosogenezy. PVAT to także źródło tlenu azotu [53] i adiponektyny, chroniących przed zapaleniem i związaną z otyłością insulinoopornością [54]. Zachwianie równowagi poprzez wzmożoną produkcję adipokina prozapalnych w otyłości powoduje inicjację zmian prowadzących do szybkiej przebudowy naczyń. Tkanka okołonaczyniowa ma także bezpośredni mechaniczny wpływ na naczynia. Wiadomo, że osoby otyłe mają większą sztywność naczyń, która zmniejsza się wraz ze spadkiem masy ciała [55]. Sztywność tętnic może być związana z akumulacją i rozrostem PVAT. Tkanka tłuszczowa to także istotne źródło angiotensyny II w otyłości. Ta z kolei powoduje skurcz naczyń, wzbudza produkcję śródbłonkowego MCP-1, molekuł adhezyjnych, oraz zaburza funkcję NO. Zmniejszenie elastyczności naczyń oraz działania endokrynne mogą wpływać na rozwój nadciśnienia tętniczego związanego z otyłością. Zaburzeniu ulega także sterowana insuliną, zależna od wapnia regulacja napięcia mięśniówki gładkiej naczyń. Tak więc okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa jest fragmentem całego systemu, którego zaburzenie poprzez jej rozrost w otyłości prowadzi do takich patologii, jak nadciśnienie i miażdżyca.

Podsumowanie

W ciągu kilku ostatnich lat zmieniły się kierunki prac badawczych oceniających rolę poszczególnych elementów naczyń krwionośnych w fizjologii i patologii. Po udowodnieniu niekwestionowanej para- i endokrynej roli śródbłonna i wydzielanych przez niego substancji wpływających na homeostazę całego układu naczyniowego uwaga coraz bardziej kierowana jest na zewnątrz naczynia. Tkanka tłuszczowa rozpatrywana jest już nie tylko jako bierny magazyn energii, ale jako jeden z ważniejszych elementów uczestniczących w regulacji napięcia naczyniowego. Po wykryciu wielu substancji wydzielanych przez adipocyty, okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa uznawana jest za jeden z elementów uczestniczących w szeregu procesów patofizjologicznych związanych z otyłością.

Piśmiennictwo

- Okamura T, Ayajiki K, Uchiyama M, et al. Mechanisms underlying constrictor and dilator responses to perivascular nerve stimulation in canine lingual arteries. *Eur J Pharmacol* 1998; 354: 43-50.
- Rey FE, Pagano PJ. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1962-71.
- Thalman S, Meier CA. Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 690-701.
- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-32.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.
- Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 807-25.
- Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX, et al. Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics* 2002; 11: 21-30.
- Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology* 2003; 144: 2195-200.
- Zorad S, Fickova M, Zelezna B, et al. The role of angiotensin II and its receptors in regulation of adipose tissue metabolism and cellularity. *Gen Physiol Biophys* 1995; 14: 383-91.
- Esposito K, Pontillo A, Di PC, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003; 289: 1799-804.
- Peelman F, Waelput W, Iserentant H, et al. Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 283-301.
- Schafer K, Halle M, Goeschen C, et al. Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 112-7.
- Lembo G, Vecchione C, Fratta L, et al. Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes* 2000; 49: 293-7.
- Fruhbeck G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes* 1999; 48: 903-8.
- Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 355-65.
- Hopkins TA, Ouchi N, Shibata R, et al. Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 11-8.
- Kumada M, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 2004; 109: 2046-9.
- Fesus G, Dubrovskaya G, Gorzelniak K, et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 719-27.
- Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, et al. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004; 291: 1730-7.
- Lindsay RS, Resnick HE, Zhu J, et al. Adiponectin and coronary heart disease: the Strong Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: e15-e16.
- Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2594-9.
- Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, et al. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000; 148: 209-14.
- Minghini A, Britt LD, Hill MA. Interleukin-1 and interleukin-6 mediated skeletal muscle arteriolar vasodilation: in vitro versus in vivo studies. *Shock* 1998; 9: 210-5.
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 559-64.
- Straczkowski M, Dzienis-Straczkowska S, Stepień A, et al. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-alpha system. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4602-6.

26. Frangogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res* 2004; 53: 585-95.
27. Yudkin JS, Eringa E, Stehouwer CD. 'Vasocrine' signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet* 2005; 365: 1817-20.
28. Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, et al. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1673-90.
29. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 Suppl 3: S53-S55.
30. Lau DC, Dhillon B, Yan H, et al. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2031-H2041.
31. Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002; 106: 913-9.
32. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 2003; 107: 363-9.
33. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327-34.
34. Veillard NR, Kwak B, Pelli G, et al. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res* 2004; 94: 253-61.
35. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-12.
36. Verma S, Li SH, Wang CH, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003; 108: 736-40.
37. Gentile MT, Vecchione C, Marino G, et al. Resistin impairs insulin-evoked vasodilation. *Diabetes* 2008; 57: 577-83.
38. Takata Y, Osawa H, Kurata M, et al. Hyperresistinemia is associated with coexistence of hypertension and type 2 diabetes. *Hypertension* 2008; 51: 534-9.
39. Weikert C, Westphal S, Berger K, et al. Plasma resistin levels and risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2647-53.
40. Wilkison WO, Choy L, Spiegelman BM. Biosynthetic regulation of monobutyrin, an adipocyte-secreted lipid with angiogenic activity. *J Biol Chem* 1991; 266: 16886-91.
41. Halvorsen YD, Bursell SE, Wilkison WO, et al. Vasodilation of rat retinal microvessels induced by monobutyrin. Dysregulation in diabetes. *J Clin Invest* 1993; 92: 2872-6.
42. Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A* 1991; 13: 277-96.
43. Löhn M, Dubrovská G, Lauterbach B, et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J* 2002; 16: 1057-63.
44. Dubrovská G, Verlohren S, Luft FC, et al. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1107-H1113.
45. Verlohren S, Dubrovská G, Tsang SY, et al. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension* 2004; 44: 271-6.
46. Gao YJ, Zeng ZH, Teoh K, et al. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1130-6.
47. Malinowski M, Deja MA, Golba KS, et al. Perivascular tissue of internal thoracic artery releases potent nitric oxide and prostacyclin-independent anticontractile factor. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008; 33: 225-31.
48. Gao YJ, Lu C, Su LY, et al. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 323-31.
49. Ardanaz N, Pagano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231: 237-51.
50. Gao YJ, Takemori K, Su LY, et al. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 363-73.
51. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006; 355: 763-78.
52. Barandier C, Montani JP, Yang Z. Mature adipocytes and perivascular adipose tissue stimulate vascular smooth muscle cell proliferation: effects of aging and obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1807-H1813.
53. Yan H, Aziz E, Shillabeer G, et al. Nitric oxide promotes differentiation of rat white preadipocytes in culture. *J Lipid Res* 2002; 43: 2123-9.
54. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 2002; 277: 25863-6.
55. Wildman RP, Farhat GN, Patel AS, et al. Weight change is associated with change in arterial stiffness among healthy young adults. *Hypertension* 2005; 45: 187-92.

Nieprawidłowa odpowiedź na kwas acetylosalicylowy – definicje i zasady postępowania w świetle poznanych czynników ryzyka

Irregular aspirin response – definitions, therapeutic approaches, and known risk factors

Marek Postuła^{1,2}, Agnieszka Kapłon-Cieślicka¹, Marek Rosiak¹, Krzysztof J. Filipiak¹

¹ I Katedra i Klinika Kardiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

² Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się zjawisku oporności na leki przeciwplateletkowe. Opornością na kwas acetylosalicylowy (ASA) nazywamy zaburzenia adhezji i agregacji wynikające z niepełnego zahamowania przez ASA syntezy tromboksanu A₂ (TXA₂). Potencjalne przyczyny aspirynooporności to: nieodpowiednia dawka, interakcje lekowe, różne polimorfizmy genetyczne, zwiększenie pozapłytkowej syntezy tromboksanu oraz zwiększony obrót płytek krwi. Laboratoryjne sposoby oceny odpowiedzi na ASA obejmują metody oparte na pomiarze stężenia TXA₂ oraz zależnej od niego funkcji płytek krwi. Obecnie nie ma jednak jednoznacznych wytycznych dotyczących oceny zjawiska oraz postępowania w celu poprawy rokowania, a osoby z chorobami układu sercowo-naczyniowego nie powinny mieć rutynowo wykonywanych testów oporności na ASA. Poniższy artykuł opisuje zjawisko oporności na ASA z uwzględnieniem definicji, częstości, diagnostyki oraz postępowania w razie jego wystąpienia.

Słowa kluczowe: kwas acetylosalicylowy, aspirynooporność

Abstract

The concept of antiplatelet drug 'resistance' or nonresponsiveness has received increasing attention over recent years. Aspirin resistance is defined as the inability of aspirin to reduce platelet production of thromboxane A₂ and thereby platelet activation and aggregation. Potential causes of aspirin resistance include inadequate dose, drug interactions, different genetic polymorphisms, upregulation of non-platelet sources of thromboxane biosynthesis, and increased platelet turnover. Laboratory methods used to detect aspirin resistance include those that measure thromboxane A₂ production and thromboxane A₂-dependent platelet function. However, since there is currently no standardised approach to the diagnosis and there are no proven effective treatments for aspirin resistance that improve outcome, patients with cardiovascular disease receiving aspirin should not be routinely tested for aspirin resistance. This review article provides a comprehensive overview of the aspirin resistance, discussing its definition, prevalence, diagnosis, and therapeutic approaches.

Key words: aspirin, aspirin resistance

Kardiologia Polska 2008; 66: 10 (supl. 3): 326–331

Wprowadzenie

Stosowanie kwasu acetylosalicylowego (ang. *acetylsalicylic acid*, ASA) jest podstawowym elementem farmakoterapii choroby niedokrwiennej serca. Do roku 1988 opublikowano wyniki 25 kontrolowanych badań naukowych, których celem była ocena skuteczności terapii przeciwplateletkowej, w szczególności zaś przyjmowania ASA, w ramach wtórnej prewencji lub leczenia zawału serca, udaru niedo-

krwiennego mózgu, przemijających ataków niedokrwienych ośrodkowego układu nerwowego (ang. *transient ischemic attack*, TIA) czy niestabilnej choroby niedokrwiennej serca. Kolejne lata przyniosły olbrzymi postęp w tej dziedzinie, co zaowocowało opublikowaniem do 2002 r. 287 badań z randomizacją na temat zastosowania ASA u ponad 135 tys. chorych. Otrzymane dane pozwoliły na rozszerzenie potencjalnych wskazań o grupę chorych ze sta-

Adres do korespondencji:

Marek Postuła, I Katedra i Klinika Kardiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1A, 02-097 Warszawa, tel.: +48 502 138 257, e-mail: mpostula@amwaw.edu.pl

bilną postacią choroby niedokrwiennej serca, po zabiegach angioplastyki wieńcowej, pomostowaniu aortalno-wieńcowym czy z migotaniem przedsionków [1].

Terapia przeciwplatekowa, której podstawą jest ASA, stanowi obecnie niezbędny element prewencji wtórnej ostrych incydentów zakrzepowych w przebiegu chorób układu sercowo-naczyniowego. Całkowite zahamowanie cyklooksygenazy typu 1 (COX-1) następuje przy przewlekłym przyjmowaniu leku w dawce ≥ 75 mg/dobę, natomiast dawka 75–160 mg/dobę wydaje się optymalna, ponieważ redukcja ryzyka względnego po ASA maleje przy zastosowaniu zarówno dawek mniejszych, jak i większych. Korzyści z terapii ASA są niezależne od wieku, płci, występowania nadciśnienia tętniczego oraz cukrzycy, a stosowanie leków przeciwplatekowych u chorych ze stabilną postacią choroby wieńcowej powoduje 25–30% redukcję ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych, obejmujących zgon z przyczyn sercowo-naczyniowych oraz zawał serca i udar mózgu niezakończone zgonem. W populacji chorych z niestabilną chorobą wieńcową redukcja ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych pod wpływem leczenia przeciwplatekowego sięga 46% [1]. Jednak u części chorych pomimo profilaktycznego przyjmowania ASA występują powikłania zakrzepowe. W piśmiennictwie dostępnym jest coraz więcej danych sugerujących związek pomiędzy zwiększoną częstością zdarzeń sercowo-naczyniowych a niedostatecznym zahamowaniem aktywności płytek krwi przez ASA, ocenianym w badaniach laboratoryjnych, a określanym mianem aspirynooporności [2].

Definicje zjawiska oporności na kwas acetylosalicylowy

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się zmienności osobniczej dotyczącej stopnia zahamowania aktywności płytek krwi pod wpływem ASA. Już w 1966 r. Armand J. Quick zaobserwował w grupie chorych różne wydłużenie czasu krwawienia po podaniu takiej samej dawki ASA. W 1978 r. Mehta i wsp. stwierdzili u 30% osób z chorobą niedokrwinną serca prawidłową agregację płytek krwi pomimo stosowania ASA [3]. Wzrost zainteresowania tym zagadnieniem rozpoczął się wraz z opublikowaniem pracy dotyczącej nieprawidłowej odpowiedzi na ASA, z której wynikało, że pomimo terapii ASA u 42% chorych zakwalifikowanych do operacji pomostowania aortalno-wieńcowego stwierdzono normalny czas krwawienia, w porównaniu z 40% osób w grupie kontrolnej [4]. Jak wynika z dotychczas przeprowadzonych badań, częstość braku odpowiedzi na ASA ocenianej różnymi metodami laboratoryjnymi w populacjach osób z chorobami układu sercowo-naczyniowego waha się od 0,4 do 83% [5–9].

Wieloletnie doświadczenia dotyczące zagadnienia oporności na ASA nadal nie przyniosły jednoznacznej i uniwersalnej definicji tego zjawiska. Próbę określenia oporności na przeciwplatekowe działanie ASA podjął w ostatnich latach Patrono [10]. Obecnie wyróżnia się kliniczną

aspirynooporność, która opiera się na badaniach epidemiologicznych dotyczących skuteczności przeciwplatekowego działania ASA. Terminem tym określa się sytuację, gdy przyjmowanie ASA nie przyczynia się do zmniejszenia ryzyka wystąpienia epizodu ostrego niedokrwienia spowodowanego powstaniem zakrzepu w świetle naczynia u osób z chorobą naczyniową. Ten typ nieprawidłowej odpowiedzi na ASA może być rozpatrywany wyłącznie retrospektywnie. Bardziej złożona definicja dotyczy tak zwanej biochemicznej aspirynooporności i związana jest z właściwościami farmakologicznymi oraz spodziewanym efektem biologicznym, w tym zahamowaniem agregacji płytek, po podaniu ASA. Z biochemiczną opornością na ASA mamy do czynienia wtedy, gdy przyjmowanie ASA nie powoduje spodziewanego efektu w jednym lub kilku testach laboratoryjnych określających funkcję płytek. Do oceny biologicznej aktywności ASA służy oszacowanie długości czasu krwawienia oraz stopnia zahamowania agregacji płytek krwi. Przetrwiała agregacja płytek krwi w obecności ASA może być wynikiem aktywacji płytek krwi niezależnej od tromboksanu A_2 (TXA₂). Na podstawie właściwości farmakologicznych z biochemiczną opornością mamy do czynienia w razie braku zahamowania syntezy TXA₂, co jest wyrazem prawidłowej aktywności COX-1 [11].

Weber i wsp. zaproponowali farmakologiczny podział nieprawidłowej odpowiedzi na ASA na trzy podtypy, które wyróżniono na podstawie jednoczesnych pomiarów syntezy TXA₂ oraz zależnej od kolagenu agregacji płytek krwi w tej samej próbce krwi po podaniu uczestnikom badania 100 mg ASA doustnie oraz ponownie po dodaniu do badanej próbki krwi 100 μ M ASA [12]. **Typem I** oporności nazywano brak skuteczności ASA ocenianej *in vivo* po doustnej dawce ASA, natomiast w testach *in vitro* obserwowano zahamowanie tych procesów. Ten typ aspirynooporności określono mianem oporności farmakokinetycznej. Wśród potencjalnych przyczyn wymienia się zmienność farmakokinetyki leku przyjmowanego w niskich dawkach lub też nieprzebranie zaleceń lekarskich [13]. Inną przyczyną tego typu oporności może być interakcja ASA z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, wśród których wymienia się te najczęściej stosowane z punktu widzenia farmakoepidemiologii: ibuprofen, indometacynę oraz naproksen [14]. Za **typ II** uznano oporność farmakodynamiczną, którą rozpoznawano w przypadku braku zahamowania syntezy TXA₂ oraz agregacji zależnej od kolagenu zarówno w badaniach *in vivo*, jak i *in vitro* po dodaniu ASA do próbki krwi. Za ten typ oporności może odpowiadać zwiększona ekspresja COX-2 w obrębie płytek, która jest mniej wrażliwa na ASA. Uważa się, że ten rodzaj nieprawidłowej odpowiedzi na ASA może występować w sytuacji zwiększonego obrotu płytek krwi, między innymi u chorych po operacji pomostowania aortalno-wieńcowego [6]. Kolejnym – **III typem** jest pseudoaspirynooporność. Określa się tak sytuację, gdy w badaniach *in vivo* obserwujemy zahamowanie produkcji TXA₂, natomiast dodanie ASA *in vitro* nie zwiększa stop-

nia zahamowania tej syntezy przy jednocześnie prawidłowej agregacji płytek zależnej od kolagenu. Przy prawidłowej farmakodynamicznej odpowiedzi na ASA, za ten typ oporności być może odpowiadają mechanizmy niezależne od działania ASA, takie jak zwiększona wrażliwość płytek na agonistów (kolagen, ADP) oraz występowanie alternatywnych szlaków aktywacji płytek [12].

Mechanizmy rozwoju upośledzonej odpowiedzi na kwas acetylosalicylowy i główne metody jej oznaczania

Podobnie jak w przypadku definicji samego zjawiska, wątpliwości dotyczą mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój oporności na przeciwplatekowe działanie ASA. Z pewnością mamy jednak do czynienia z całym łańcuchem zdarzeń, którego końcowym efektem jest wzmożona aktywacja płytek krwi oraz upośledzona odpowiedź na ASA

Tabela I. Potencjalne przyczyny i czynniki ryzyka nieprawidłowej odpowiedzi na ASA

Potencjalne przyczyny upośledzonej odpowiedzi na ASA
Zmniejszenie biodostępności:
1. nieprzestrzeganie zaleceń lekarskich
2. nieodpowiednia dawka
3. zaburzenia wchłaniania lub zwiększony metabolizm
Zaburzone wiązanie z COX-1:
1. jednoczesne przyjmowanie niektórych NLPZ (ibuprofen, indometacyna, naproksen)
Alternatywne szlaki syntezy TXA₂:
1. COX-2 obecny w makrofagach/monocytach oraz komórkach śródbłonka
Alternatywne szlaki aktywacji płytek krwi:
1. interakcja między erytrocytami, aktywacja płytek w odpowiedzi na kolagen, ADP, serotoninę, trombinę
2. zwiększona wrażliwość na kolagen i ADP
3. aktywacja płytek zależna od izoprostanoidów
Zwiększony obrót płytek krwi
Aktywacja płytek zależna od katecholamin (stres, wysiłek fizyczny)
Polimorfizmy genetyczne:
1. polimorfizmy COX-1, COX-2, syntetazy TXA ₂
2. polimorfizmy receptorów glikoproteinowych Ia/IIa, Ib/V/IX, IIb/IIIa, receptorów dla kolagenu i czynnika von Willebranda
3. polimorfizmy receptora GP IIb/IIIa (PIA2)
Oslabienie działania ASA w trakcie długotrwałej terapii
Czynniki ryzyka nieprawidłowej odpowiedzi na ASA
1. płeć żeńska
2. podeszły wiek
3. otyłość
4. nikotynizm
5. cukrzyca
6. nadciśnienie tętnicze
7. niewydolność serca
8. zaburzenia lipidowe – hipercholesterolemia
9. wysiłek fizyczny
10. ostry zespół wieńcowy
11. stan po operacji pomostowania aortalno-wieńcowego
12. stan po zabiegu angioplastyki wieńcowej

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne; pozostałe skróty w tekście

(Tabela I). Potencjalne przyczyny braku skuteczności działania ASA można podzielić ze względu na mechanizm na dwie grupy: farmakokinetyczne oraz farmakodynamiczne. Czynniki farmakokinetyczne nieprawidłowej odpowiedzi na ASA związane są z brakiem przestrzegania zaleceń lekarskich, niewłaściwą dawką, postacią leku oraz potencjalnymi interakcjami z innymi inhibitorami cyklooksygenazy. Przyczyny farmakodynamiczne powodują brak pełnego zahamowania aktywności cyklooksygenazy pomimo odpowiedniego stężenia ASA w osoczu. W tej grupie wymienia się głównie zwiększony obrót płytek krwi, międzykomórkowe przemiany prekursorów prostaglandyn, zmienności genetyczne oraz potencjalne interakcje z innymi inhibitorami cyklooksygenazy. Ten rodzaj oporności wynika zatem przede wszystkim ze zmian konformacyjnych w obrębie miejsca docelowego działania ASA, jakim jest COX-1 [10, 12, 15, 16].

Z dotychczasowych obserwacji wynika, że brak lub też zmniejszenie skuteczności ASA w odniesieniu do zahamowania aktywności COX-1 oraz produkcji TXA₂ nie zawsze jest wynikiem prawdziwej oporności. Postuluje się, że w niektórych sytuacjach klinicznych mamy do czynienia z modyfikowalnymi czynnikami, które mogą mieć wpływ na właściwości farmakologiczne ASA. Wśród czynników odgrywających najważniejszą rolę w uzyskaniu spodziewanego stopnia zahamowania funkcji płytek krwi oraz efektu klinicznego wymienia się nieprzestrzeganie zaleceń lekarskich dotyczących regularnego i codziennego przyjmowania ASA, nieodpowiednią dawkę ASA oraz przyjmowanie leku co 2.–3. dzień. Według niektórych doniesień do 40% osób z chorobami układu sercowo-naczyniowego nie przestrzega zaleceń lekarskich dotyczących regularnego przyjmowania odpowiednich dawek ASA [10, 13, 16].

Istnieje wiele koncepcji dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za powstanie zjawiska aspirynooporności, dlatego też wydaje się, że pewną rolę w występowaniu nieprawidłowej odpowiedzi na ASA mogą mieć sytuacje kliniczne prowadzące do zwiększonej aktywacji płytek krwi. Wśród najczęściej wymienianych znajdują się: płeć żeńska, zaawansowany wiek, cukrzyca, hipercholesterolemia oraz otyłość [5, 10, 13, 16]. Wykazano też, że zwiększona aktywność płytek i nieprawidłowa ich odpowiedź na leczenie przeciwplatekowe występują u chorych w okresie pooperacyjnym po zabiegu pomostowania aortalno-wieńcowego, po zabiegu przezskórnej angioplastyki wieńcowej oraz w ostrej fazie zawału serca. Jest wiele dowodów przemawiających za związkiem między nadreaktywnością płytek krwi a występowaniem czynników ryzyka choroby niedokrwiennej, takich jak: nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, hipercholesterolemia czy nikotynizm. Zwiększoną częstość nieprawidłowej odpowiedzi na ASA wykazano także w populacji chorych z niewydolnością serca [6, 10, 11, 16].

Podstawowym pytaniem pozostaje sam sposób laboratoryjnej oceny odpowiedzi na ASA. W ostatnich latach zaobserwowano gwałtowny rozwój specjalistycznych me-

tod laboratoryjnych pozwalających na ocenę skuteczności przeciwplatekowego działania ASA. „Złotym standardem” oceny funkcji płytek nadal pozostaje agregometria optyczna, która została opisana w 1962 r. niezależnie przez Borna oraz O’Briena. Do monitorowania aktywacji płytek krwi wykorzystywany jest także pomiar stężenia białek, które uwalniane są z ziarnistości płytkowych w odpowiedzi na ich pobudzenie takie jak beta-tromboglobulina oraz platekowi czynnik 4 (PF 4). Do innych substancji uwalnianych w procesie aktywacji płytek krwi należy ADP, serotonina oraz P-selektyna [18].

Wśród metod zalecanych do oceny stopnia reaktywności płytek niedawno opublikowany konsensus Grupy Roboczej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego ds. aspirynooporności wymienia specyficzne testy oceniające efekt działania ASA, takie jak metody agregometryczne, w tym agregometrię impedancyjną, agregometrię optyczną oraz aparat przyłóżkowy VerifyNow. Zalecenie to sformułowano w sposób następujący: „Dla oceny efektu działania ASA zaleca się wykonanie agregacji wywołanej kwasem arachidonowym i oceny stężenia tromboksanu B₂ (TXB₂) w surowicy lub w supernatancie po agregacji z możliwością dodania ASA *in vitro*” [15].

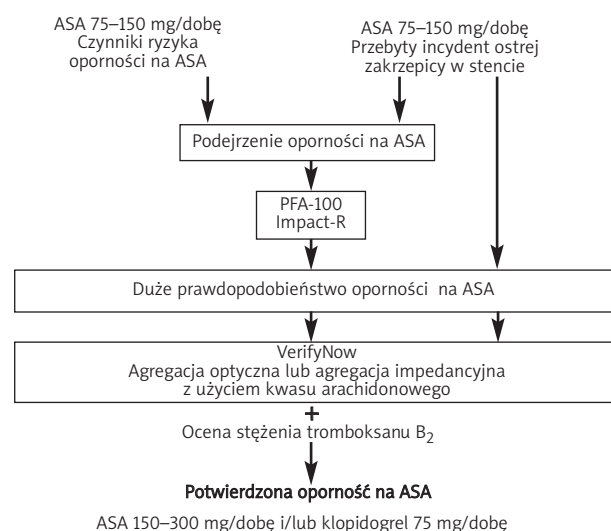
Do głównych ograniczeń przydatności agregometrii w codziennej praktyce klinicznej należą złożoność czynności przedanalizy, takich jak odpowiednie pobranie materiału, przygotowanie bogatopłytkowego osocza, jego inkubacja z agonistami w określonej temperaturze, oraz doświadczenie personelu. Warto również podkreślić, że warunki panujące w trakcie oznaczenia odbiegają od fizjologicznych: w agregometrze, w odróżnieniu od naczyń tętniczych, panują małe siły ścinające oraz brak przepływu, pominięty zostaje udział erytrocytów w hemostazie pierwotnej, a cytrynianu sodu użyty jako środek antykoagulacyjny chelatuje zjonizowany wapń, co obniża jego stężenie we krwi pobranej do badania i w konsekwencji zawyża pozytywny efekt działania ASA. Zaletą pozostaje dobra dostępność i przystępny koszt oznaczenia. Tromboksan B₂ jest głównym metabolitem platekowego TXA₂ w surowicy. Uważa się, że stężenie jego stabilnej pochodnej 11-dehydro-tromboksanu B₂ (11-dTXB₂) w moczu odzwierciedla poziom aktywacji płytek i maleje w wyniku skutecznego działania ASA. Pomiar tego metabolitu cechuje się wysoką skutecznością w diagnostyce upośledzonej odpowiedzi na ASA i zgodnością z najczęściej stosowaną metodą agregometrii optycznej. Wydaje się jednak, że w praktyce klinicznej najbardziej przydatne mogą okazać się metody „przyłóżkowe”, takie jak analizator PFA-100 czy VerifyNow. Wynika to przede wszystkim z łatwości obsługi tych urządzeń oraz szybkiego uzyskania wyniku oznaczeń. Należy również pamiętać o ograniczeniach wymienionych metod [17–19]. Na Rycinie 1. zaproponowano przykładowy schemat postępowania z chorymi, u których podejrzewa się nieprawidłową odpowiedź na ASA.

Zasady postępowania w razie podejrzenia nieprawidłowej odpowiedzi na kwas acetylosalicylowy

Zgodnie ze stanowiskiem Grupy Roboczej przy Sekcji Interwencji Sercowo-Naczyniowych Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego obecnie nie istnieją jednoznaczne wskazania do monitorowania terapii ASA za pomocą dostępnych metod oceny funkcji płytek. W razie zaistnienia podejrzenia braku skuteczności ASA chorzy powinni być kierowani do ośrodków, które mają doświadczenie w wykonywaniu oznaczeń oraz postępowaniu w takiej sytuacji [15].

Biorąc pod uwagę fakt, że upośledzenie odpowiedzi na ASA zależy najprawdopodobniej od wielu czynników, postępowanie w sytuacji podejrzenia tego zjawiska powinno być skierowane na wiele potencjalnie odwracalnych przyczyn. Jednym z podstawowych elementów takiej strategii powinna być oczywiście modyfikacja znanych czynników ryzyka rozwoju oporności na ASA (Tabela I). Zalecenia te powinny obejmować przede wszystkim osoby z cukrzycą, otyłością, niewydolnością serca, nadciśnieniem tętniczym oraz zaburzeniami gospodarki lipidowej czy palące papierosy. W świetle dotychczasowych doniesień prawidłowa kontrola glikemii, przebiegu niewydolności serca i odpowiednie leczenie współistniejących stanów zapalnych może istotnie poprawiać odpowiedź na ASA. Jednocześnie należy pamiętać, aby w każdym przypadku podejrzenia nieprawidłowej odpowiedzi na ASA ocenić stosowanie się do zaleceń lekarskich dotyczących regularnego przyjmowania zapisanej dawki ASA oraz informować chorych o korzyściach wynikających z przyjmowania odpowiedniego leczenia przeciwplatekowego.

Jak wynika z danych dotyczących oceny funkcji płytek za pomocą testów laboratoryjnych *ex vivo*, zmienność odpowiedzi na ASA może wynikać z szerokiego zakresu stosowanych dawek (75–325 mg), a częstość zjawiska może się



Rycina 1. Proponowany schemat postępowania u chorych z podejrzeniem oporności na ASA

zmniejszać wraz ze wzrostem dawki [9, 20]. Dotychczasowe badania wykazały, że podawanie ASA w dobowej dawce 80–325 mg skutecznie hamuje ok. 95% aktywności COX-1, natomiast nie stwierdzono dodatkowego efektu przeciwplatekowego podawania wyższych dawek [21]. W badaniach przeprowadzonych *ex vivo* zauważono jednak związek pomiędzy częstością występowania biochemicznej oporności na ASA a stosowaną dawką. Zwiększenie dobowej dawki z 325 mg do 1300 mg powodowało zmniejszenie szacowanej częstości zjawiska z 25 do 8% [22]. Postuluje się, że dodatkowy efekt przeciwplatekowy obserwowany podczas stosowania wyższych dawek może wynikać z zahamowania aktywności COX-2. Jak już wspomniano, zahamowanie powyżej 95% aktywności COX-1 występuje przy dawce ASA nieprzekraczającej 325 mg/dobę, natomiast do zahamowania aktywności COX-2 wymagane są dawki większe – od 500 mg/dobę [21]. Prostaglandyna H₂, która powstaje z kwasu arachidonowego pod wpływem aktywności enzymatycznej COX-2, może zostać „przetransportowana” do płytek i ulec przemianie do TXA₂ bez udziału COX-1. Prawdopodobnie wyższe dawki ASA powodują zahamowanie obydwu izoform cyklooksygenazy. Wykazano również, że podanie ASA w dawce powyżej 500 mg/dobę może zapobiegać interakcji pomiędzy erytrocytami oraz płytkami krwi i aktywacji tych ostatnich [23]. W badaniach dotyczących oporności na ASA przy użyciu agregometrii oraz oceny stężenia metabolitów TXA₂ również zauważono zmienność częstości zjawiska w zależności od dawki [24]. Nie ma jednak jednoznacznych danych wskazujących na zwiększone korzyści wynikające ze stosowania ASA w dawce przekraczającej 325 mg/dobę, a dawki wynoszące 75–150 mg/dobę wykazują podobną efektywność do wyższych dawek w grupie chorych otrzymujących ASA w ramach prewencji wtórnej [1]. Należy podkreślić, że do tej pory nie przeprowadzono dużego badania z randomizacją, którego celem byłoby bezpośrednie porównanie skuteczności różnych dawek ASA. Pojawiają się jednak doniesienia, że zwiększenie dobowej dawki ASA u chorych z niedostatecznie zahamowaną funkcją płytek ocenianą za pomocą analizatora PFA-100 może prowadzić do przewyższenia aspirynooporności [9, 25–28]. W grupie 212 chorych po zawale serca zwiększenie dawki ASA ze 100 do 300 mg/dobę powodowało zmniejszenie odsetka chorych z opornością na ASA z 18,4 do 1,4% [46]. W przeprowadzonym przez Hovens i wsp. przeglądzie systematycznym częstość występowania oporności na ASA w badaniach, w których dawka ASA wynosiła <100 mg/dobę, była istotnie większa niż w badaniach z dawką ASA >300 mg/dobę (36 vs 19%; *p* <0,0001) [9]. Istnieje zatem możliwość, że zwiększenie dawki ASA może – przynajmniej w części przypadków niedostatecznej odpowiedzi na lek, niezwiązanych z polimorfizmami genetycznymi – powodować przywrócenie prawidłowej odpowiedzi płytek krwi na przeciwagregacyjne działanie ASA.

Wydaje się jednak, że u chorych z zaawansowanym procesem miażdżycowym i powtarzającymi się pomimo przewlekłego leczenia przeciwplatekowego incydentami za-

krzepowymi wykonanie oznaczenia funkcji płytek krwi może być uzasadnione. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań klinicznych z zastosowaniem analizatorów „przyłóżkowych” budzą nadzieje na możliwość indywidualizacji leczenia przeciwplatekowego u osób z chorobą niedokrwinną serca. Jak już wspomniano, zwiększenie dawki ASA pozwala na „przewyciężenie” nieprawidłowej odpowiedzi na ASA, a dotyczy to w szczególności chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi lub współistniejącymi stanami zapalnymi czy infekcjami. Postuluje się, że w populacji osób z chorobą niedokrwinną serca, w której stwierdzono upośledzoną odpowiedź płytek krwi na ASA, może występować zwiększona wrażliwość na inne substancje o właściwościach pobudzających ich funkcję. Potwierdzeniem tej teorii mogą być prace, w których obserwowano wzrost aktywacji płytek w odpowiedzi na adenosynodifosforan (ADP). Z tego względu w przypadku upośledzonej odpowiedzi na ASA, poza zwiększaniem jego dawki, można w wybranych sytuacjach klinicznych rozważyć dołączenie leku przeciwplatekowego o odmiennym mechanizmie działania, do których należy pochodna tienopirydyny – klopidoogrel. Zasadność takiego postępowania potwierdzają wyniki dotychczas przeprowadzonych badań klinicznych [29–32]. Natomiast w grupie chorych poddawanych zabiegowi przeszłokrojnej angioplastyki wieńcowej korzystne może być dodanie do terapii inhibitora fosfodiesterazy typu 3 – cilostazolu [33]. Podobne wyniki pochodzą z badania przeprowadzonego w populacji chorych po przebyciu TIA lub niewielkim udarze niedokrwinnym mózgu, w którym wykazano dodatkowe korzyści z jednoczesnego stosowania dipirydamolu oraz ASA [34].

W ośrodku, w którym pracują autorzy, analizator PFA-100 wykorzystywany jest m.in. do przesiewowej oceny odpowiedzi na ASA w populacjach chorych z licznymi czynnikami ryzyka oporności na ASA oraz z wywiadem ostrej zakrzepicy w stencie lub wczesnej restenozycji. Ponadto do oceny reaktywności płytek krwi stosuje się analizator VerifyNow oraz Cone and Platelet Analyzer Impact-R. Stosowany w naszym ośrodku chemat postępowania w razie podejrzenia upośledzonej odpowiedzi na ASA, którego celem jest ocena funkcji płytek, zilustrowano na Rycinie 1.

Podsumowanie

Złożony problem, jakim niewątpliwie jest upośledzona odpowiedź na ASA, nadal niesie ze sobą wiele pytań. Przede wszystkim należałoby wypracować jednoznaczne stanowisko w sprawie definicji samego zjawiska. Warto zaznaczyć w tym miejscu, że najnowsze zalecenia Grupy Roboczej powołanej przy Sekcji Interwencji Sercowo-Naczyniowych Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego nie rekomendują używania terminu „aspirynooporność”. Podobnie jak powyżej, w dokumencie tym przywołane zostały dwa typy oporności na ASA: oporność farmakodynamiczna oraz oporność farmakokinetyczna. Ze względu na to rozgraniczenie, zdaniem Grupy Roboczej, w razie podejrzenia oporności farmakokinetycz-

nej zaleca się używać raczej określenia „niepełna odpowiedź na leczenie przeciwplateletowe” lub „podwyższona reaktywność płytek pomimo leczenia”. Termin „oporność na ASA” powinien zaś zostać zarezerwowany wyłącznie dla przypadków nieprawidłowej odpowiedzi na ASA potwierdzonej w badaniu czynnościowym (agregacji) lub badaniu biochemicznym (osoczowe stężenie TXB₂). Osobnym problemem pozostaje schemat postępowania z chorymi, u których podejrzewamy niepełną odpowiedź na leczenie przeciwplatetowe. Wydaje się, że poza samą oceną zjawiska, to zagadnienie odgrywa obecnie najważniejszą rolę.

Piśmiennictwo

1. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.
2. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, et al. Aspirin 'resistance' and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008; 336: 195-8.
3. Mehta J, Mehta P, Burger C, Pepine CJ. Platelet aggregation studies in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1978; 31: 169-75.
4. Buchanan MR, Brister SJ. Individual variation in the effects of ASA on platelet function: Implications for use of ASA clinically. *Can J Cardiol* 1995; 11: 221-7.
5. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio E, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2001; 88: 230-35.
6. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003; 108: 542-7.
7. Borna C, Lazarowski E, van Heusden C, et al. Resistance to aspirin is increased by ST-elevation myocardial infarction and correlates with adenosine diphosphate levels. *Thromb J* 2005; 3: 10-9.
8. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1705-9.
9. Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, et al. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J* 2007; 153: 175-81.
10. Patrono C. Aspirin resistance: definition, mechanism and clinical read-outs. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1710-3.
11. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, et al. Aspirin resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105: 1650-5.
12. Weber AA, Przytulski B, Schanz A, et al. Towards a definition of aspirin resistance: a typological approach. *Platelets* 2002; 13: 37-40.
13. Schwartz KA, Schwartz DE, Ghosheh K, et al. Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2005; 95: 973-5.
14. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 2001; 345: 1809-17.
15. Kulickowski W, Witkowski A, Watala C, et al. Resistance to oral antiplatelet drugs – a Position Paper of the Working Group on antiplatelet drug resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society. *Kardiologia Pol* 2008; 66: 470-6.
16. Lordkipanidzé M, Pharand C, Palisaitis DA, et al. Aspirin resistance: truth or dare. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 733-43.
17. Harisson P. Platelet function analysis. *Blood Reviews* 2005; 19: 111-23.
18. Jilma B, Fuchs I. Aspirin. Methods to assess aspirin resistance. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 337-8.
19. Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, et al. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1822-34.
20. Lee PY, Chen WH, Ng W, et al. Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease. *Am J Med* 2005; 118: 723-7.
21. Patrono C, Collier B, Dalen JE, et al. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* 2001; 119: 39-63.
22. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, et al. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 2331-6.
23. Santos MT, Valles J, Aznar J, et al. Prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. Reduction by aspirin. *Circulation* 1997; 95: 63-8.
24. Hart RG, Leonard AD, Talbert RL, et al. Aspirin dosage and thromboxane synthesis in patients with vascular disease. *Pharmacotherapy* 2003; 23: 579-84.
25. Abaci A, Yilmaz Y, Caliskan M, et al. Effect of increasing doses of aspirin on platelet function as measured by PFA-100 in patients with diabetes. *Thromb Res* 2005; 116: 465-70.
26. Takahashi S, Ushida M, Komine R, et al. Increased basal platelet activity, plasma adiponectin levels, and diabetes mellitus are associated with poor platelet responsiveness to in vitro effect of aspirin. *Thromb Res* 2007; 119: 517-24.
27. Alberts MJ, Bergman DL, Molner E, et al. Antiplatelet effect of aspirin in patients with cerebrovascular disease. *Stroke* 2004; 35: 175-8.
28. von Pape KW, Strupp G, Bonzel T, et al. Effect of compliance and dosage adaptation of long term aspirin on platelet function with PFA-100 in patients after myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2005; 94: 889-91.
29. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, et al. COMMIT (CLOpidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) Collaborative Group. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005; 366: 1607-21.
30. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001; 345: 494-502.
31. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, et al. Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001; 358: 527-33.
32. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, et al. CREDO Investigators. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 2411-20.
33. Douglas JS Jr., Holmes DR Jr., Kereiakes DJ, et al. Cilostazol for Restenosis Trial (CREST) Investigators. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. *Circulation* 2005; 112: 2826-32.
34. Halkes PH, van Gijn J, Kappelle LJ, et al. Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischaemia of arterial origin (ESPRIT): randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367: 1665-73.

Remodeling mięśnia sercowego w przebiegu tachyarytmii nadkomorowych

Remodeling of the myocardium related to supraventricular tachyarrhythmias

Tomasz Bonda^{1,2}, Bożena Sobkowicz², Maria M. Winnicka¹

¹ Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

² Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie

Tachyarytmie wywołują przebudowę serca. W pracy opisano patomechanizm zaburzeń jonowych oraz strukturalnych w mięśniu sercowym w przebiegu tachyarytmii nadkomorowych, głównie migotania przedsionków.

Słowa kluczowe: tachyarytmia nadkomorowa, migotanie przedsionków, remodeling mięśnia sercowego, macierz zewnątrzkomórkowa, remodeling jonowy, wewnętrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnału

Abstract

Tachyarrhythmias induce cardiac remodeling. The present article discusses main aspects of ionic and structural remodeling of the heart related to supraventricular tachyarrhythmias, especially atrial fibrillation

Key words: supraventricular tachycardia, atrial fibrillation, myocardial remodeling, ionic remodeling, intracellular signaling pathways

Kardiologia Polska 2008; 66, 10 (supl. 3): 332–340

Tachyarytmie są to nadkomorowe i komorowe zaburzenia rytmu serca przebiegające z szybką czynnością przedsionków lub/i komór. Należą do grupy chorób elektrycznych serca, wpływają na mięsień sercowy bezpośrednio, ale także upośledzają hemodynamikę oraz modulują mechanizmy endo- i parakrynne. Krótkotrwałe zaburzenia rytmu pociągają za sobą głównie zmiany czynnościowe, które zazwyczaj ustępują w krótkim czasie. Utrwalone tachyarytmie powodują przeważnie upośledzenie funkcji i stopniową przebudowę jam serca, zarówno na poziomie narządowym, jak też na poziomie tkankowym, komórkowym i subkomórkowym. Wśród zaburzeń rytmu będących przyczyną przebudowy mięśnia sercowego na pierwszym miejscu należy wymienić migotanie przedsionków (ang. *atrial fibrillation*, AF), które jest najczęściej występującą utrwaloną tachyarytmią, powoduje przede wszystkim przebudowę przedsionków serca, a w niektórych sytuacjach wpływa także na mię-

sień komór. Do osiągnięć ostatnich lat należą badania dotyczące genetycznego podłoża AF, pełniejsze poznanie patomechanizmu arytmii, opracowanie nowych metod leczenia farmakologicznego i nefarmakologicznego. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie stanu wiedzy oraz wyników najnowszych badań eksperymentalnych i obserwacji klinicznych dotyczących wpływu tachyarytmii nadkomorowych, a szczególnie AF, na przebudowę serca.

Podstawy patofizjologiczne – mechanizmy elektrofizjologiczne sprzyjające tachyarytmii

Zaburzenia rytmu serca mogą być następstwem zaburzeń mechanizmów elektrofizjologicznych należących do jednej z dwóch grup: nieprawidłowego wytwarzania impulsu elektrycznego bądź nieprawidłowej propagacji fali pobudzenia. Najczęstszym mechanizmem tachyarytmii jest krążenie fali nawrotnej po wyodrębnionym anatomicznie

Adres do korespondencji:

lek. med. Tomasz Bonda, Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. A. Mickiewicza 2c, 15-222 Białystok, tel.: +48 85 748 55 93, e-mail: bondatom@wp.pl

Praca powstała dzięki wsparciu w postaci grantu MNiSW nr 2P05B 146 29 oraz grantu naukowego przyznanego przez Polskie Towarzystwo Kardiologiczne, ufundowanego przez firmę Servier.

bądź czynnościowo obwodzie (*re-entry*). Czynnikiem inicjującymi *re-entry* są zwykle pobudzenia przedwczesne, wynikające ze zwiększonego automatyzmu komórek roboczych lub komórek układu bódźcprzewodzącego [1]. Do zwiększonej aktywności bódźcotorwórczej predysponują takie czynniki, jak: niedokrwienie mięśnia sercowego powodujące częściową depolaryzację i automatyzm patologiczny, przetładowanie komórek wapniem sprzyjające aktywności wyzwalanej, a także nadmiar katecholamin i dyselektrolitemie oraz mechaniczne rozciąganie włókien mięśniowych [2]. Jeżeli powstały w takich warunkach bodziec trafi na odpowiedni moment niepodatności jednego z ramion obwodu przewodzącego (tzw. jednokierunkowego bloku przewodzenia), jest w stanie wywołać falę nawrotną. Pobudzenia przedwczesne występują nawet u zupełnie zdrowych osób, dlatego potencjalnie u wszystkich spełniony jest warunek obecności inicjatora *re-entry*. Należy podkreślić, że indukcja tachyarytmii w zdrowym anatomicznie i czynnościowo sercu należy do rzadkości, ponieważ oprócz inicjatora arytmii konieczna jest jeszcze obecność podatnego mięśnia sercowego, umożliwiającego samopodtrzymywanie się arytmii. Do czynników sprzyjających krążeniu fali nawrotnej należą: spowolnienie rozprzestrzeniania się fali depolaryzacji, skrócenie okresu refrakcji włókien mięśniowych oraz występowanie jednego bądź kilku odpowiednio długich obwodów, po których krąży pobudzenie. Szybkość przewodzenia pobudzenia zależy od natężenia szybkiego przezbłonowego prądu sodowego oraz od natężenia niespecyficznego prądu jonowego, przenoszonego z jednej komórki na drugą dzięki bezpośrednim połączeniom międzykomórkowym. Szybki prąd sodowy aktywowany jest po osiągnięciu potencjału progowego w fazie 0 potencjału czynnościowego, a dynamika jego narastania zależy od przezbłonowego gradientu elektrochemicznego dla jonów sodowych. Zmniejszenie stopnia spoczynkowej depolaryzacji kardiomiocytów (wywołujące „mniej ujemny” potencjał wewnątrzkomórkowy) – np. niedokrwienie mięśnia sercowego – zmniejsza natężenie szybkiego prądu sodowego i zmniejsza szybkość propagacji pobudzenia [3]. Pomiędzy komórkami mięśnia sercowego pobudzenie przenoszone jest dzięki bezpośrednim niskooporowym połączeniom międzykomórkowym typu ścisłego. Sprawne przewodzenie impulsu wzdłuż długiej osi kardiomiocytów zapewnia właściwa organizacja przestrzenna, liczba oraz lokalizacja połączeń ścisłych głównie na biegunach komórek [3].

Refrakcja jest drugim, oprócz szybkości przewodzenia, parametrem elektrofizjologicznym mającym wpływ na indukcję i podtrzymywanie arytmii w mechanizmie fali nawrotnej. Długość okresu refrakcji jest ściśle związana z czasem trwania potencjału czynnościowego. Repolaryzacja komórek miokardium jest możliwa dzięki współwystępowaniu dwóch mechanizmów jonowych: wolnego dokomórkowego prądu wapniowego oraz narastającego odkomórkowego prądu potasowego. Zaburzenie równowagi

pomiędzy tymi prądami na korzyść prądu potasowego może powodować wcześniejszą repolaryzację komórki i skrócenie okresu refrakcji [4].

Podsumowując, skrócenie fali pobudzenia, będące następstwem zwolnionego rozprzestrzeniania się depolaryzacji oraz skrócenia okresu refrakcji, przy jednoczesnym powiększeniu i niejednorodności elektrycznej obszaru pobudliwego mięśnia sercowego sprzyjają podtrzymywaniu fali nawrotnej (Rycina 1).

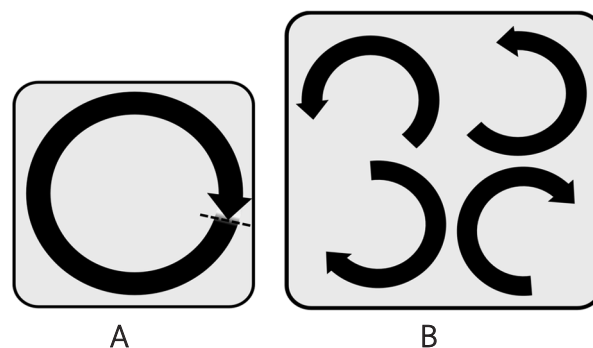
Zmiany właściwości mięśnia sercowego w odpowiedzi na tachyarytmię

Opisane wyżej zjawiska mogą przyczynić się do zapoczątkowania arytmii. Chociaż często arytmia ulega wytłumieniu z powodu niepodatności substratu anatomicznego, to okazuje się, że nawracające epizody szybkiego rytmu są w stanie spowodować takie zmiany właściwości mięśnia sercowego, które sprzyjają kolejnym nawrotom oraz podtrzymaniu zaburzeń rytmu [5].

Zaburzenia fizjologii mięśnia sercowego obserwowane w następstwie tachyarytmii dzieli się zazwyczaj na dwie grupy: remodeling elektryczny – obserwowany niemalże od początku tachykardii, oraz remodeling strukturalny – powodujący przebudowę anatomiczną serca i trwałe zmiany funkcjonalne.

Remodeling elektryczny

Koncepcja promujących arytmie zmian elektrofizjologicznych mięśnia sercowego w przebiegu tachyarytmii wywodzi się z obserwacji chorych z AF. Początkowo arytmia ma najczęściej charakter napadowy, a z biegiem czasu, poprzez coraz częstsze i dłużej trwające epizody, dochodzi do utrwalenia AF [6].



Rycina 1. Fala nawrotna jest najczęstszą przyczyną przewlekłych tachyarytmii. **A** – zdrowy mięsień sercowy nie stanowi dobrego podłoża dla podtrzymywania arytmii, gdyż długa fala depolaryzacji ulega łatwemu wytłumieniu; **B** – tachyarytmia skracca długość fali depolaryzacji, co przy jednoczesnym powiększeniu jamy serca umożliwia podtrzymywanie licznych fal pobudzenia

Najważniejszym zjawiskiem elektrofizjologicznym w przebiegu tachyarytmii nadkomorowych niezwiązanych z niewydolnością serca jest skrócenie czasu trwania potencjału czynnościowego oraz okresu efektywnej refrakcji kardiomiocytów przedsionkowych. Ponadto, opisywano obniżenie pobudliwości kardiomiocytów oraz zwolnienie przewodzenia bodźca w obrębie miokardium przedsionków [5, 7]. Mechanizmy jonowe odpowiedzialne za te zmiany określane są zbiorczym pojęciem „remodelingu jonowego” i obejmują obniżenie natężenia wolnego dokomórkowego prądu wapniowego zależnego od kanałów typu L oraz zmniejszenie przewodności kanałów sodowych, odpowiedzialnych za szybką depolaryzację. Zwiększeniu ulega również natężenie prądu tła niesionego przez jony potasowe, a zmniejsza się przejściowy dokomórkowy prąd potasowy I_{to} , odpowiedzialny za wstępną częściową repolaryzację komórki [3]. W remodelingu elektrycznym serca w przebiegu tachyarytmii główną rolę odgrywają mechanizmy wapniowe. Najważniejszy wydaje się spadek przewodności kanału wapniowego typu L (Ca-L), który powoduje zmniejszenie o około połowę dokomórkowego prądu wapniowego, czynnego w fazie *plateau* (faza 2) potencjału czynnościowego. Redukcja tego prądu jest przyczyną przyspieszenia procesu repolaryzacji, a co za tym idzie – skrócenia okresu efektywnej refrakcji [8]. Pierwotną przyczyną zahamowania czynności kanału Ca-L jest związane z tachykardią przeładowanie cytoplazmy kardiomiocytów przedsionkowych wapniem. Z tego powodu częściowa inaktywacja dokomórkowego prądu wapniowego może być rozpatrywana jako mechanizm obronny, zapobiegający nadmiernemu obciążeniu komórek jonami wapnia [9]. Zjawiska molekularne odpowiedzialne za obniżenie przewodności kanałów Ca-L nie zostały do końca poznane. W części badań wykazano, iż utrzymująca się dłużej tachykardia prowadzi do zmniejszenia zawartości białka oraz mRNA podjednostki $1\alpha c$ tworzącej por kanału, co sugeruje negatywną regulację na poziomie transkrypcji [10–13]. Z kolei w badaniach Schottena i wsp. [14] oraz Greisera i wsp. [15] nie stwierdzono zaburzeń ekspresji białek kanału, pomimo spadku przewodności dla jonów wapnia. Nasunęło to przypuszczenie występowania zaburzeń funkcji kanału, a ponieważ czynność kanału Ca-L jest uzależniona od stanu jego fosforylacji, ujemnych regulatorów jego funkcji poszukuje się obecnie wśród układów kinaz i fosfataz. U chorych z AF stwierdza się podwyższoną aktywność oraz wyższą ekspresję podjednostki katalitycznej fosfatazy białkowej typu 2A (PP2A), natomiast zaburzeniu ulegają prawdopodobnie funkcje kinaz – kinazy zależnej od kompleksu wapń-kalmodulina (CAMK II) oraz kinazy tyrozynowych z rodziny src [15, 16]. Do zwiększonej ekspresji PP2A może prowadzić pobudzenie receptora angiotensynowego typu 2 przez syntetyzowaną lokalnie w nadmiarze angiotensynę II [17]. Ponadto pewną rolę w częściowej inaktywacji prądu wapniowego zależnego od kanału Ca-L przypisuje się zwiększonej aktywności wewnątrzkomórkowych peptydaz – kalpain, któ-

rych zwiększone stężenie stwierdza się w mięśniu przedsionków u chorych z niemiarynością całkowitą [18]. Enzymy te są aktywowane przez wapń i mogą degradować między innymi składniki aparatu kurczliwego oraz białka błony komórkowej. Zaobserwowano ujemny związek pomiędzy aktywnością kalpains I a poziomem białka kanału wapniowego typu L, co może sugerować bezpośrednią degradację składowych kanału przez tę proteazę [19]. Na podstawie tych badań można wysunąć przypuszczenie, że kalpains odgrywają pośrednią rolę w procesie inaktywacji kanału wapniowego, uniemożliwiając jego fosforylację przez kinazę CAMKII. Proces ten wymaga bowiem współdziałania kinazy z białkami cytoszkieletu, które mogą być degradowane przez kalpains [20]. Mechanizmy wapniowe, choć pierwszoplanowe w remodelingu elektrycznym serca, nie są odosobnione. Obserwacje kliniczne wyróżniające chorych z wago-tonicznym AF mają swoje odzwierciedlenie w przebudowie elektrycznej. Tachykardia indukuje zwiększenie natężenia dokomórkowych prądów niesionych przez jony potasowe. Odbywa się to między innymi dzięki nasileniu podstawowej przewodności kanału potasowego zależnego od białka G (Kir3), który w warunkach prawidłowych jest regulowany przez acetylocholinę [21]. Ponadto AF powoduje zwiększenie ekspresji białek tworzących kanał potasowy Kir2 [22]. Efektem powyższych zmian jest nasilenie dokomórkowego potasowego prądu prostowniczego I_{K1} . Wykazano też, że szybka stymulacja przedsionków u psów wywołuje zmniejszenie ekspresji podjednostki Kv4.3 kanału potasowego zależnego od potencjału, niosącego dokomórkowy prąd I_{to} , odpowiedzialny za wstępną częściową repolaryzację [23]. Wymienionym powyżej zaburzeniom przypisuje się rolę w skracaniu czasu trwania potencjału czynnościowego [24].

Istotne znaczenie w modyfikacji własności elektrycznych mięśnia sercowego towarzyszącej tachyarytmii ma remodeling niskooporowych połączeń typu ścisłego. Połączenia te umożliwiają przepływ jonów, wody oraz substancji o małej masie cząsteczkowej (poniżej 1 kDa) bezpośrednio z jednej komórki do drugiej. Dzięki dużej średnicy kanałów możliwe jest sprawne przemieszczanie jonów sodowych i wapniowych pomiędzy cytoplazmą sąsiadujących komórek, co warunkuje szybkie przemieszczanie fali depolaryzacji. Połączenia te zbudowane są z białek zwanych koneksynami (Cx). Kanał jonowy utworzony jest z dwóch leżących naprzeciw siebie części, wbudowanych w błony cytoplazmatyczne sąsiadujących komórek. Każda z tych części jest heksamerem koneksyn. Wyróżnia się kilka białek tej grupy, przy czym w komórkach roboczych przedsionków najliczniej reprezentowana jest Cx40, natomiast Cx43 występuje zarówno w mięśniu komór, jak też w mięśniu przedsionków. Stopień przewodności tych kanałów zależy od pH, zewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, stopnia fosforylacji oraz składu lipidów błony komórkowej. W zdrowym mięśniu przedsionków większa część Cx jest umiejscowiona na biegunach komórek, a stosunkowo niewiele

znajduje się na powierzchniach bocznych kardiomiocytów. Polaryzacja rozmieszczenia Cx w komórkach przedsionków jest większa niż w komórkach komór i decyduje o dużej anizotropii przewodzenia impulsu w obrębie przedsionków. Badania materiału pobranego od chorych z AF wykazały zaburzenia ilości Cx40 oraz Cx43 [25–27]. Stwierdzono redukcję ekspresji Cx43 oraz nierównomierną dystrybucję Cx40 w obrębie mięśnia przedsionków [25]. W modelu eksperymentalnym AF potwierdzono niejednorodność rozmieszczenia i zmniejszenie ekspresji Cx40 [28]. Redukcja ilości tych koneksyn nie wynikała z obniżonej transkrypcji ich genów, ponieważ poziom mRNA pozostawał niezmienny. Oprócz tego, stałym elementem przebudowy jest przemieszczenie tych białek w obrębie komórek. Obserwacje mikroskopowe ujawniły zwiększenie ekspresji koneksyn na powierzchniach bocznych komórek, a zmniejszenie na ich biegunach. Zjawisko to zostało nazwane lateralizacją kanałów. Nasilenie tego procesu jest różne w poszczególnych częściach przedsionków, przez co zwiększa się niejednorodność przewodzenia [25, 27, 29]. Wydaje się, że stopień przemodelowania tych kanałów jest powiązany z innymi zmianami morfologii komórek, szczególnie z nasileniem zmian miolitycznych [28]. Wypadkową powyższych zaburzeń jonowych jest skrócenie okresu efektywnej refrakcji mięśnia przedsionków oraz zwolnienie przewodzenia impulsu elektrycznego. Wydaje się, że nie wszystkie obszary przedsionków reagują w jednakowy sposób na tachyarytmię. Indukowane w trakcie badania elektrofizjologicznego AF trwające 15 min powoduje skrócenie czasu efektywnej refrakcji i zwolnienie przewodzenia szczególnie w obrębie ujścia żył płucnych [30]. Wcześniejsze badania przeprowadzone na zwierzętach doświadczalnych podanych tygodniowej szybkiej stymulacji przedsionków nie wykazały istotnych, wynikających z tachykardii, różnic elektrofizjologicznych pomiędzy ujściem żył płucnych a wolną ścianą lewego przedsionka [31]. Należy podkreślić, iż ujście żył płucnych ma szczególne znaczenie w generowaniu nadkomorowych tachyarytmii [32]. Izolacja żył płucnych u znacznej części chorych z AF likwiduje arytmie.

Przerwanie szybkiego rytmu przedsionków odwraca ich remodeling elektryczny. Już po tygodniu od przywrócenia rytmu zatokowego u chorych z AF trwającym 1–12 miesięcy dochodzi do istotnego skrócenia czasu trwania załamka P, co odzwierciedla zwiększenie szybkości przewodzenia bodźca oraz do wydłużenia czasu efektywnej refrakcji. Normalizacji ulega także czynność węzła zatokowo-predsionkowego [33].

Remodeling strukturalny

Remodeling komórkowy

W przebiegu tachyarytmii dochodzi do obniżenia kurczliwości mięśnia sercowego oraz do przebudowy strukturalnej jam serca. Zaburzenia te są podobne do nieprawidłowości towarzyszących zastoinowej niewydolności serca. W wyniku AF powiększają się jamy przedsionków oraz, jeżeli zachowane jest sprawne przewodzenie przez łącze

przedsionkowo-komorowe, komór [34–36]. Równolegle z rozstrzenią jam serca dochodzi do zmniejszenia odsetkowej objętości kardiomiocytów na rzecz innych składowych miokardium, głównie składników macierzy pozakomórkowej. Wykazano, że w tkance przedsionków pobranej od chorych z AF, jak też w modelu indukowanej tachykardią niewydolności serca u psów, tachyarytmia powoduje aktywację apoptozy [37, 38]. We wspomnianym wyżej badaniu eksperymentalnym stwierdzono, że częstoskurcz prowadzi do nasilenia apoptozy tylko w pierwszych kilku dniach arytmii, po czym następuje obniżenie odsetka komórek apoptotycznych do granic wyjściowych. W mięśniu komór natomiast zauważono stopniowe narastanie liczby komórek wykazujących cechy apoptozy w ciągu całego 5-tygodniowego okresu obserwacji [38].

Remodeling na poziomie subkomórkowym polega na przyjęciu przez kardiomiocyty fenotypu zbliżonego do płodowego, dochodzi do cofnięcia ich zróżnicowania, komórki ulegają wydłużeniu oraz powiększeniu [39]. Reakcja hipertroficzna ze strony kardiomiocytów może być efektem wpływów parakrynych, np. w wyniku zwiększonej syntezy angiotensyny II albo zaburzeń hemodynamicznych pobudzających szlaki mechanotransdukcji [24]. Wykazano także zależną od wapnia aktywację kalcyneuryny, która poprzez defosforylację i odblokowanie czynnika transkrypcyjnego NFATc3 umożliwia ekspresję genów odpowiedzialnych za przerost komórek [40]. Zablokowanie kalcyneuryny hamowało natomiast przerost kardiomiocytów indukowany szybką stymulacją w warunkach hodowli komórkowej. Ponadto wykazano, że przebudowie ulegają elementy cytoszkieletu oraz organella wewnątrzkomórkowe. Zmniejsza się zawartość elementów aparatu kurczliwego, zaburzeniu ulega układ miofibryli, dochodzi do reorganizacji cytoszkieletu, redukcji liczby cysterń siateczki sarkoplazmatycznej oraz do zwiększenia objętości jądra komórkowego [41]. Degradacja sarkomerów i reorganizacja cytoszkieletu mogą wynikać z aktywacji wymienionych wcześniej proteaz – kalpain, które degradują białka cytoplazmatyczne [19, 42, 43]. Badania ultrastruktury komórek mięśnia przedsionków pochodzących od chorych z niemiarynością całkowitą wykazały zaburzenia struktury mitochondriów oraz zwiększoną zawartość markerów stresu oksydacyjnego. Równolegle z nasileniem stresu oksydacyjnego wzrastała jądrowa akumulacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [44]. Dysfunkcja mitochondriów prawdopodobnie jest związana z przeładowaniem komórek wapniem, ponieważ udaje się jej zapobiec poprzez zablokowanie kanału wapniowego we-rapamilem [44].

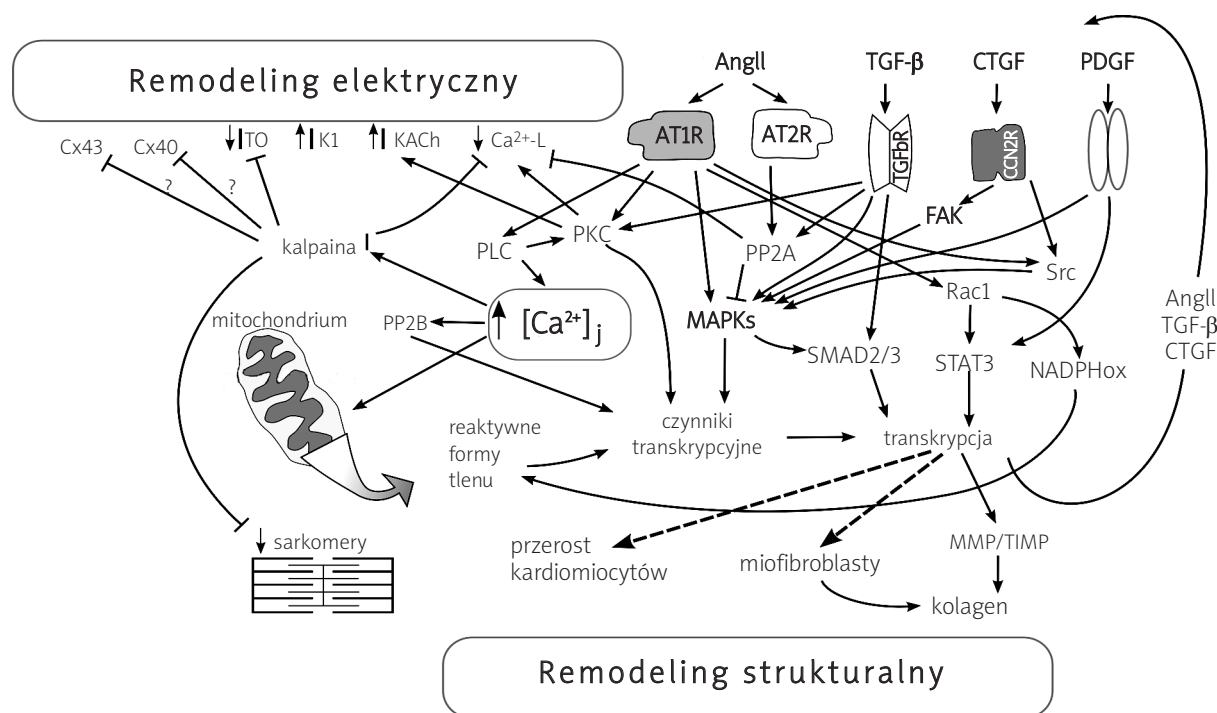
Remodeling macierzy zewnątrzkomórkowej

Zwiększenie ilości macierzy zewnątrzkomórkowej jest typowym elementem remodelingu strukturalnego w przebiegu AF. Włóknienie przedsionków ma miejsce zarówno w przebiegu niemiaryności całkowitej niezwiązanej z chorobami organicznymi serca, jak i w przebiegu niewydolno-

ści serca, szczególnie jeżeli towarzyszy jej wada zastawki dwudzielnej. Stwierdzono, że wysoka zawartość kolagenu w tkance przedsionków jest związana z częstszym występowaniem utrwalonego AF u chorych z zaawansowaną niewydolnością serca [45]. Uważa się, że nadekspresja kolagenu w obrębie przedsionków jest jednym z głównych czynników przyczyniających się do powstania substratu strukturalnego arytmii [46]. Ponadto, jak wykazały badania na zwierzętach transgenicznym, zwłóknienie przedsionków, bez współistniejących zaburzeń elektrofizjologicznych na poziomie komórkowym, jest wystarczające do podtrzymania AF [47]. Zaobserwowano, iż zwiększenie zawartości tkanki łącznej wywołuje spowolnienie przewodzenia impulsu w obrębie przedsionków, upośledzając sprawność ścisłych połączeń międzykomórkowych i nasilając niejednorodność elektryczną mięśnia [47, 48]. W mięśniu przedsionków występuje głównie kolagen typu I i typu III oraz stosunkowo niewielka ilość kolagenu typu VI. W przebiegu AF dochodzi do znacznego zwiększenia zawartości kolagenu typu I, natomiast wzrost ilości kolagenu typu III jest mniejszy i prawdopodobnie jest związany ze współistniejącymi chorobami serca, takimi jak zwężenie zastawki dwudzielnej [45, 49]. Ostatnio wykazano, iż w przebiegu AF dochodzi również do zwiększenia zawartości kolagenu typu VI, który jest zlokalizowany przede wszystkim śródmięśniowo. Nagromadzenie tego kolagenu może być odpowiedzialne za separację leżących obok siebie kardiomiocytów [50].

Komórki mięśnia sercowego same nie są źródłem kolagenu, ale poprzez uwalnianie mediatorów regulują czynność fibroblastów, które przyjmują tzw. fenotyp wydzielniczy i syntetyzują intensywnie składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Z uwagi na jednoczesną ekspresję białek kurczliwych (np. alfa-aktyny, α SMA) nazywane są one wówczas miofibroblastami [51]. Wykazano, iż inkubacja fibroblastów z podłożem uzyskanym z hodowli przedsionkowych kardiomiocytów poddanych szybkiej stymulacji hamuje wychwytywanie znakowanej radioizotopem tymidyny (hamuje proliferację fibroblastów) oraz zwiększa ekspresję α SMA, kolagenu typu I i fibronektyny-1 [52]. Badania fibroblastów wyizolowanych z przedsionków serca wykazały, że zachowują się one inaczej niż fibroblasty izolowane z komórek. Fibroblasty przedsionkowe łatwiej przyjmują fenotyp wydzielniczy w odpowiedzi na bodźce humoralne, a transkrypcja genów odpowiedzialnych za zwłóknienie zwiększa się w nich o wiele bardziej niż w fibroblastach izolowanych z komórek serca [53]. Mediatorami pobudzającymi fibroblasty do syntezy białek macierzy zewnątrzkomórkowej są angiotensyna II (Ang II) oraz transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β 1), a ponadto czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF) oraz, jak wynika z najnowszych doniesień, płytkowy czynnik wzrostu (PDGF). Syntezę kolagenu mogą nasilać również bodźce hemodynamiczne i zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu towarzyszące AF [46].

Stwierdzono, że AF wiąże się ze znacznym zwiększeniem lokalnej produkcji Ang II w przedsionkach serca [54]. Ang II działa na komórki docelowe w sercu za pośrednictwem dwóch typów receptorów – AT1 i AT2. Dane z literatury wskazują, iż tachyarytmia może powodować zmiany ekspresji tych receptorów [55, 56]. Nadmierne pobudzenie receptorów AT1 związane jest z niekorzystnymi efektami działania Ang II na serce. Za pośrednictwem receptora AT1 aktywacji ulegają wewnątrzkomórkowe kinazy białkowe oraz wzrasta poziom wapnia w komórkach. Wykazano, że AF u ludzi jest związane z wyższą ekspresją kinazy białkowej Erk2 oraz nasiloną aktywacją kinaz MAPK [54]. Efektem działania Ang II na kardiomiocyty jest nasilenie opisanych wyżej zjawisk remodelingu elektrycznego oraz przerostu komórek mięśniowych, natomiast głównym następstwem wpływu na fibroblasty jest przyjęcie przez nie fenotypu wydzielniczego i nasilenie syntezy kolagenu. Ang II moduluje ponadto aktywność innych mediatorów zaangażowanych w regulację procesu zwłóknienia mięśnia sercowego towarzyszącego AF. Hormon ten zwiększa ekspresję indukowanej przez mineralokortykoidy kinazy SGK1. Nastęstwem nadmiernej aktywacji kinazy SGK1 w sercu jest zwiększone odkładanie kolagenu, a pośrednikiem w tym procesie jest CTGF [57, 58]. Jak wykazano w badaniach klinicznych i eksperymentalnych, zahamowanie działania aldosteronu poprzez zastosowanie spironolaktonu jest skuteczną metodą zmniejszającą zwłóknienie mięśnia sercowego [59, 60]. Wielokierunkowy wpływ Ang II w przebiegu niemiaryowości całkowitej wyraża się także poprzez nadmierną ekspresję i aktywność enzymu Rac1. Białko to jest małocząsteczkową GTP-azą i reguluje aktywność NADPH oksydazy, enzymu błonowego odpowiedzialnego za syntezę reaktywnych form tlenu. Zwiększoną zawartość Rac1 stwierdzono u chorych z AF [61], a nadekspresja tego enzymu u myszy transgenicznym powoduje wybiórcze zwłóknienie przedsionków i sprzyja występowaniu migotania przedsionków [62]. Nadmierna produkcja wolnych rodników tlenowych może nasilać procesy zwłóknienia, między innymi za pośrednictwem czynnika NF- κ B [44, 63, 64]. Ponadto dowiedziono, że Ang II – za pośrednictwem Rac1 – prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT3 [65]. Wydaje się, że aktywność enzymów proteolitycznych – metaloproteinaz (MMP), których transkrypcja regulowana jest przez obydwa powyższe czynniki transkrypcyjne, ma istotne znaczenie w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej. Zarówno w modelach doświadczalnych, jak i w materiale ludzkim pochodzącym od chorych z niemiaryowością całkowitą stwierdzono zaburzenia równowagi pomiędzy metaloproteinazami, a ich inhibitorami (TIMP). Badania skrawków przedsionków pobranych podczas zabiegów kardiologicznych od chorych z AF wykazały zwiększone stężenie aktywnej postaci metaloproteinazy 9 (MMP-9), przy czym największą aktywność tego enzymu stwierdzano w tkance łącznej okołonacyniowej oraz pod epikardium [66]. W próbkach tkanek pobranych od chorych z utrzymującym się po-



Rycina 2. Najważniejsze mechanizmy molekularne odpowiedzialne za remodeling mięśnia przedsionków serca w przebiegu tachyarytmii nadkomorowych (szczegółowy opis w tekście)

wyżej roku AF wykazano ponadto zwiększoną ekspresję MMP-2 [50]. U tych samych chorych stwierdzono również zwiększoną ekspresję tkankowych inhibitorów MMP: TIMP-1 oraz TIMP-2 [50]. Wzrost aktywności metaloproteinaz oraz ich inhibitorów może prowadzić do niepełnej degradacji kolagenu i jego odkładania w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co zaburza organizację przestrzenną mięśnia sercowego. We krwi chorych z utrwalonym AF stwierdzono podwyższone stężenia markerów syntezy oraz degradacji kolagenu typu I, odpowiednio N-końcowego fragmentu prokolagenu typu I oraz C-końcowego telopeptydu kolagenu typu I, co potwierdza zwiększony obrót kolagenu [67]. Niewiele jest badań doświadczalnych na zwierzętach mających na celu określenie wpływu metaloproteinaz na włóknienie mięśnia przedsionków. Anne i wsp., wykorzystując model tachyarytmii nadkomorowej u owiec, wykazali, że zwiększona zawartość kolagenu w mięśniu przedsionków była związana z obniżeniem ekspresji MMP-2 oraz ze zwiększoną zawartością TIMP-2 [68]. Skojarzone leczenie tych zwierząt chinaprylem i losartanem zapobiegało włóknieniu przedsionków i rozwojowi przetrwałego AF, co świadczy o głównej roli angiotensyny w indukcji opisanych zmian.

Kolejnym istotnym stymulatorem syntezy macierzy zewnątrzkomórkowej i odkładania kolagenu w obrębie mięśnia sercowego jest TGF- β . Nadekspresja tej cytokiny u myszy transgenicznych prowadzi do nasilonego włóknienia mięśnia sercowego ograniczonego do przedsion-

ków [69]. Wykazano, że synteza TGF- β 1 jest zwiększona u chorych z AF, podobnie jak w przebiegu szybkiej stymulacji komorowej u psów, i dodatnio koreluje z zawartością kolagenu w mięśniówce przedsionków [38, 50]. TGF- β 1 oddziałuje na komórki docelowe poprzez swoiste receptory, a efektem związania liganda jest fosforylacja białek kaskady SMAD, które ostatecznie tworzą kompleks SMAD2/3/4, przemieszczają się do jądra komórkowego i pobudzają transkrypcję genów białek odpowiedzialnych za syntezę składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz czynnika wzrostu tkanki łącznej (CTGF), który także nasila syntezę kolagenu przez miofibroblasty. Oprócz powyższego działania, TGF- β 1 może regulować aktywność kinaz z rodziny MAPK za pośrednictwem kinazy białkowej FAK oraz fosfataz [70]. Tak więc efektem działania TGF- β 1 oraz CTGF, równoległego do wpływu Ang II, jest nasilenie produkcji kolagenu oraz zaburzenie dynamiki przemian macierzy zewnątrzkomórkowej z następczym włóknieniem [71].

Podsumowanie

Zrozumienie mechanizmów przebudowy mięśnia sercowego w czasie tachyarytmii jest kluczowym elementem dla poszukiwań skuteczniejszych metod terapeutycznych. Stosowane dotychczas leki antyarytmiczne wpływające na mechanizmy jonowe nie są skuteczne u wszystkich chorych, a dodatkowo ich przyjmowanie niesie ryzyko proarytmii. Możliwość modyfikacji głównych mechanizmów biorących

udział w wytwarzaniu substratu dla podtrzymywania zaburzeń rytmu może mieć podstawowe znaczenie w terapii AF. Obserwacje kliniczne wskazują, iż powszechnie stosowane w kardiologii leki, nienależące do klasycznych środków antyarytmicznych, mogą zapobiegać arytmii i ułatwiać ich opanowanie. Należą do nich przede wszystkim inhibitory konwertazy angiotensyny oraz antagoniści receptora AT1 [72]. Coraz liczniejsze dane kliniczne przemawiają za skutecznością tych leków w zapobieganiu i leczeniu AF [73]. Na przykład w jednym z ostatnich badań wykazano przewagę blokera receptora AT1, walsartanu, nad amlodypiną w zapobieganiu AF u osób z nadciśnieniem tętniczym bez wcześniejszego wywiadu arytmii [74]. Oprócz leków modyfikujących układ renina-angiotensyna-aldosteron, których rola w terapii AF wydaje się już ustalona, nadzieje związane z zahamowaniem niekorzystnego remodelingu i poprawą rokowania pokłada się w statynach [75]. Leki te, hamując izoprenylację białek, unieczynnijają białko Rac1, w wyniku czego powinny zmniejszać produkcję wolnych rodników i transkrypcję genów profibrotycznych. Statyny wykazują także działanie przeciwzapalne, co również może mieć znaczenie w leczeniu chorych z AF, u których stwierdza się podwyższone wartości markerów procesu zapalnego. Nieco mniej obiecujące są wyniki badań dotyczące farmakoterapii ukierunkowanej na mechanizmy jonowe remodelingu przedsionków. Chociaż podawanie szeroko stosowanego blokera kanału Ca-L, werapamilu, zapobiega remodelingowi elektrycznemu przedsionków indukowanemu krótkotrwałym epizodem arytmii, nie jest on skuteczny w modyfikacji remodelingu i prewencji utrwalenia AF [76]. Nowych danych na temat zahamowania wpływu wapnia powinny dostarczyć badania skuteczności blokerów szybkiego kanału wapniowego typu T. Ponadto wykazano korzystny efekt zapobiegania remodelingowi komórkowemu w wyniku redukcji aktywności kalpajny I i przywrócenia równowagi pomiędzy fosfatazami a kinazami regulującymi czynność kanałów jonowych w doświadczalnym modelu tachyarytmii [77]. Poszukiwania nowych leków, oparte na dynamicznie poszerzającej się wiedzy o patomechanizmach tachyarytmii nadkomorowych, stwarzają szansę znalezienia skuteczniejszych strategii terapeutycznych i poprawy wyników leczenia.

Piśmiennictwo

- Wellens HJ. Twenty-five years of insights into the mechanisms of supraventricular arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; 14: 1020-5.
- Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev* 1999; 79: 917-1017.
- Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, et al. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 2007; 87: 425-56.
- Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005; 85: 1205-53.
- Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995; 92: 1954-68.
- Waris E, Kreis K, Salokannel J. Factors influencing persistence of sinus rhythm after DC shock treatment of atrial fibrillation. *Acta Med Scand* 1971; 189: 161-6.
- Elvan A, Wylie K, Zipes DP. Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs. Electrophysiological remodeling. *Circulation* 1996; 94: 2953-60.
- Yue L, Feng J, Gaspo R, et al. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997; 81: 512-25.
- Brundel BJ, Henning RH, Kampinga HH, et al. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 315-24.
- Bosch RF, Scherer CR, Rub N, et al. Molecular mechanisms of early electrical remodeling: transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces I (Ca,L) and I (to) in rapid atrial pacing in rabbits. *J Am Coll Cardiol* 2003. 41: 858-69.
- Laszlo R, Winkler C, Wohrl S, et al. Effect of verapamil on tachycardia-induced early cellular electrical remodeling in rabbit atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 376: 231-40.
- Grammer JB, Zeng X, Bosch RF, et al. Atrial L-type Ca²⁺-channel, beta-adrenoreceptor, and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor mRNAs in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 82-90.
- Grammer JB, Bosch RF, Kuhlkamp V, et al. Molecular and electrophysiological evidence for 'remodeling' of the L-type Ca²⁺-channel in persistent atrial fibrillation in humans. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 4: IV23-9.
- Schotten U, Haase H, Frechen D, et al. The L-type Ca²⁺-channel subunits alpha1C and beta2 are not downregulated in atrial myocardium of patients with chronic atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 437-43.
- Greiser M, Halaszovich CR, Frechen D, et al. Pharmacological evidence for altered src kinase regulation of I (Ca,L) in patients with chronic atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 375: 383-92.
- Christ T, Boknik P, Wohrl S, et al. L-type Ca²⁺ current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation* 2004; 110: 2651-7.
- Fischer TA, Singh K, O'Hara DS, et al. Role of AT1 and AT2 receptors in regulation of MAPKs and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1998; 275 (3 Pt 2): H906-16.
- Goette A, Arndt M, Rocken C, et al. Calpains and cytokines in fibrillating human atria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H264-72.
- Brundel BJ, Ausma J, van Gelder IC, et al. Activation of proteolysis by calpains and structural changes in human paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 380-9.
- Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, et al. Cytoskeletal disrupting agents prevent calmodulin kinase, IQ domain and voltage-dependent facilitation of L-type Ca²⁺ channels. *J Physiol* 2002; 545: 399-406.
- Voigt N, Friedrich A, Bock M, et al. Differential phosphorylation-dependent regulation of constitutively active and muscarinic receptor-activated IK,ACh channels in patients with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 426-37.
- Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, et al. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005; 112: 471-81.
- Yue L, Melnyk P, Gaspo R, et al. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1999; 84: 776-84.

24. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation: Mechanisms and Implications. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 2008; 1: 62-73.
25. Kostin S, Klein G, Szalay Z, et al. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 361-79.
26. Kanagaratnam P, Cherian A, Stanbridge RD, et al. Relationship between connexins and atrial activation during human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; 15: 206-16.
27. Polontchouk L, Haefliger JA, Ebel B, et al. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 883-91.
28. van der Velden HM, Ausma J, Rook MB, et al. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 476-86.
29. Tribulova N, Knezl V, Okruhlicova L, et al. Myocardial gap junctions: targets for novel approaches in the prevention of life-threatening cardiac arrhythmias. *Physiol Res* 2008; 57: S1-S13.
30. Rostock T, Steven D, Lutomsky B, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation in the pulmonary veins on the impact of atrial fibrillation on the electrophysiological properties of the pulmonary veins in humans. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 2153-60.
31. Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, et al. Atrial tachycardia remodeling of pulmonary vein cardiomyocytes: comparison with left atrium and potential relation to arrhythmogenesis. *Circulation* 2005; 111: 728-35.
32. Dun W, Ozgen N, Hirose M, et al. Ionic mechanisms underlying region-specific remodeling of rabbit atrial action potentials caused by intermittent burst stimulation. *Heart Rhythm* 2007; 4: 499-507.
33. Raitt MH, Kusumoto W, Giraud G, et al. Reversal of electrical remodeling after cardioversion of persistent atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; 15: 507-12.
34. Spinale FG, Crawford FA, Hewett KW Jr, et al. Ventricular failure and cellular remodeling with chronic supraventricular tachycardia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 102: 874-82.
35. Spinale FG, Tomita M, Zellner JL, et al. Collagen remodeling and changes in LV function during development and recovery from supraventricular tachycardia. *Am J Physiol* 1991; 261 (2 Pt 2): H308-18.
36. Kajstura J, Zhang X, Liu Y, et al. The cellular basis of pacing-induced dilated cardiomyopathy. Myocyte cell loss and myocyte cellular reactive hypertrophy. *Circulation* 1995; 92: 2306-17.
37. Aime-Sempe C, Folliguet T, Rucker-Martin C, et al. Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1577-86.
38. Hanna N, Cardin S, Leung TK, et al. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2004; 63: 236-44.
39. Ausma J, Wijffels M, van Eys G, et al. Dedifferentiation of atrial cardiomyocytes as a result of chronic atrial fibrillation. *Am J Pathol* 1997; 151: 985-97.
40. Bukowska A, Lendeckel U, Hirte D, et al. Activation of the calcineurin signaling pathway induces atrial hypertrophy during atrial fibrillation. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 333-42.
41. Eble DM, Spinale FG. Contractile and cytoskeletal content, structure, and mRNA levels with tachycardia-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol* 1995; 268: H2426-39.
42. Xue HJ, Li WM, Li Y, et al. Calpain I inhibition prevents atrial structural remodeling in a canine model with atrial fibrillation. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 32-7.
43. Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ. Calpain-I induced alterations in the cytoskeletal structure and impaired mechanical properties of single myocytes of rat heart. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 981-93.
44. Bukowska A, Schild L, Keilhoff G, et al. Mitochondrial dysfunction and redox signaling in atrial tachyarrhythmia. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233: 558-74.
45. Xu J, Cui G, Esmailian F, et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation* 2004; 109: 363-8.
46. Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 802-9.
47. Verheule S, Sato T, Everett T 4th, et al. Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res* 2004; 94: 1458-65.
48. Li D, Fareh S, Leung TK, et al. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999; 100: 87-95.
49. Boldt A, Wetzel U, Lauschke J, et al. Fibrosis in left atrial tissue of patients with atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *Heart* 2004; 90: 400-5.
50. Polyakova V, Miyagawa S, Szalay Z, et al. Atrial extracellular matrix remodelling in patients with atrial fibrillation. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 189-208.
51. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension* 2002; 39: 258-63.
52. Burstein B, Qi XY, Yeh YH, et al. Atrial cardiomyocyte tachycardia alters cardiac fibroblast function: A novel consideration in atrial remodeling. *Cardiovasc Res* 2007; 76: 442-52.
53. Burstein B, Libby E, Calderone A, et al. Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences. *Circulation* 2008; 117: 1630-41.
54. Goette A, Staack T, Rocken C, et al. Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1669-77.
55. Goette A, Arndt M, Rocken C, et al. Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2000; 101: 2678-81.
56. Boldt A, Wetzel U, Weigl J, et al. Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1785-92.
57. Hussain A, Wyatt AW, Wang K, et al. SGK1-Dependent Upregulation of Connective Tissue Growth Factor by Angiotensin II. *Kidney Blood Press Res* 2008; 31: 80-6.
58. Vallon V, Wyatt AW, Klingel K, et al. SGK1-dependent cardiac CTGF formation and fibrosis following DOCA treatment. *J Mol Med* 2006; 84: 396-404.
59. Milliez P, Deangelis N, Rucker-Martin C, et al. Spironolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction. *Eur Heart J* 2005; 26: 2193-9.
60. Yang SS, Han W, Zhou HY, et al. Effects of spironolactone on electrical and structural remodeling of atrium in congestive heart failure dogs. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 38-42.
61. Dudley SC, Hoch NE Jr, McCann LA, et al. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation* 2005; 112: 1266-73.
62. Adam O, Frost G, Custodis F, et al. Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 359-67.
63. Li JY, Lai YJ, Yeh HI, et al. Atrial Gap Junctions, NF-kappaB and Fibrosis in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery:

- The Relationship with Postoperative Atrial Fibrillation. *Cardiology* 2008; 112: 81-8.
64. Vellaichamy E, Khurana ML, Fink J, et al. Involvement of the NF-kappa B/matrix metalloproteinase pathway in cardiac fibrosis of mice lacking guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A. *J Biol Chem* 2005; 280: 19230-42.
65. Tsai CT, Lai LP, Kuo KT, et al. Angiotensin II activates signal transducer and activators of transcription 3 via Rac1 in atrial myocytes and fibroblasts: implication for the therapeutic effect of statin in atrial structural remodeling. *Circulation* 2008; 117: 344-55.
66. Nakano Y, Niida S, Dote K, et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to human atrial remodeling during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 818-25.
67. Tziakas DN, Chalikias GK, Papanas N, et al. Circulating levels of collagen type I degradation marker depend on the type of atrial fibrillation. *Europace* 2007; 9: 589-96.
68. Anne W, Willems R, Holemans P, et al. Self-terminating AF depends on electrical remodeling while persistent AF depends on additional structural changes in a rapid atrially paced sheep model. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43: 148-58.
69. Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O, et al. Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta (1) transgene in the heart. *Circ Res* 2000; 86: 571-9.
70. Liu S, Xu SW, Kennedy L, et al. FAK is required for TGFbeta-induced JNK phosphorylation in fibroblasts: implications for acquisition of a matrix-remodeling phenotype. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 2169-78.
71. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta 1 in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 2006; 118: 10-24.
72. Healey JS, Morillo CA, Connolly SJ. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in atrial fibrillation and cardiac remodeling. *Curr Opin Cardiol* 2005; 20: 31-7.
73. Birnie DH, Gollob M, Healey JS. Clinical trials, the renin angiotensin system and atrial fibrillation. *Curr Opin Cardiol* 2006; 21: 368-75.
74. Schmieder RE, Kjeldsen SE, Julius S, et al. Reduced incidence of new-onset atrial fibrillation with angiotensin II receptor blockade: the VALUE trial. *J Hypertens* 2008; 26: 403-11.
75. Savelieva I, Camm J. Statins and polyunsaturated fatty acids for treatment of atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5: 30-41.
76. Dobrev D. Cardiomyocyte Ca2+ overload in atrial tachycardia: is blockade of L-type Ca2+ channels a promising approach to prevent electrical remodeling and arrhythmogenesis? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 376: 227-30.
77. Brundel BJ, Kampinga HH, Henning RH. Calpain inhibition prevents pacing-induced cellular remodeling in a HL-1 myocyte model for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 521-8.

Nikotynamid i jego metabolit – N-metylonikotynamid – tylko witamina czy może nowy lek do walki z chorobami układu krążenia i hemostazy?

Andrzej Mogielnicki, Karol Kramkowski, Włodzimierz Buczek

Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny, Białystok

Streszczenie

Nikotynamid jest substancją znaną od bardzo dawna, należąca wraz z kwasem nikotynowym do grupy witaminy PP. Głównymi metabolitami nikotynamidu są N-metylonikotynamid oraz N-tlenek nikotynamidu. W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień na temat roli N-metylonikotynamidu w regulacji funkcji układu krążenia i hemostazy. Niniejszy artykuł zawiera streszczenie właściwości farmakologicznych nikotynamidu oraz jego metabolitu N-metylonikotynamidu, ze szczególnym uwzględnieniem ich wpływu na układ krążenia, śródbłonek naczyniowy i inne elementy hemostazy. Podjęto również trudną próbę określenia relacji badań podstawowych prowadzonych z udziałem powyższych substancji do realnego znaczenia klinicznego tych związków oraz ewentualnych możliwości terapeutycznych.

Słowa kluczowe: nikotynamid, N-metylonikotynamid, śródbłonek naczyniowy, zakrzepica

Abstract

Nicotinamide and nicotinic acid are well-known as a vitamin PP. N-methylnicotinamide (NMN⁺) and the nicotinamide-N-oxide are the two major primary metabolites of nicotinamide. In the last few years it has been growing number of data indicating on NMN⁺ as a potential regulator of cardiovascular and haemostasis systems. We reviewed here the pharmacological properties of nicotinamide and its metabolite – NMN⁺. We especially focused on their influence on cardiovascular system, endothelium and other haemostasis elements. We have also tried to estimate how the experimental studies with these compounds contribute to their therapeutic potential and the real use in clinical practice.

Key words: nicotinamide, N-methylnicotinamide, endothelium, thrombosis

Kardiologia Polska 2008; 66, 10 (supl. 3): 341–346

Wstęp

Nikotynamid jest amidem kwasu nikotynowego, tj. niacyny. Oba związki są określane jako witamina B₃ lub witamina PP. Nikotynamid jest bezpośrednim prekursorem służącym do syntezy NAD⁺ oraz NADP⁺, ważnych koenzymów reakcji oksydoredukcyjnych. Kwas nikotynowy, aby spełnić rolę witaminy w organizmie ludzkim, musi być przekształcony w nikotynamid. W niewielkim tylko stopniu może powstawać z kwasu nikotynowego i nie wykazano, aby miał on właściwości farmakologiczne i toksykologiczne zbliżone do kwasu. Nikotynamid, w przeciwieństwie do kwasu nikotynowego, nie obniża istotnie osoczowego poziomu cholesterolu oraz triacylogliceroli, nie powoduje również zaczerwienienia twarzy [1, 2]. Jest obecnie stosowany w niektórych krajach w leczeniu chorób zapalnych

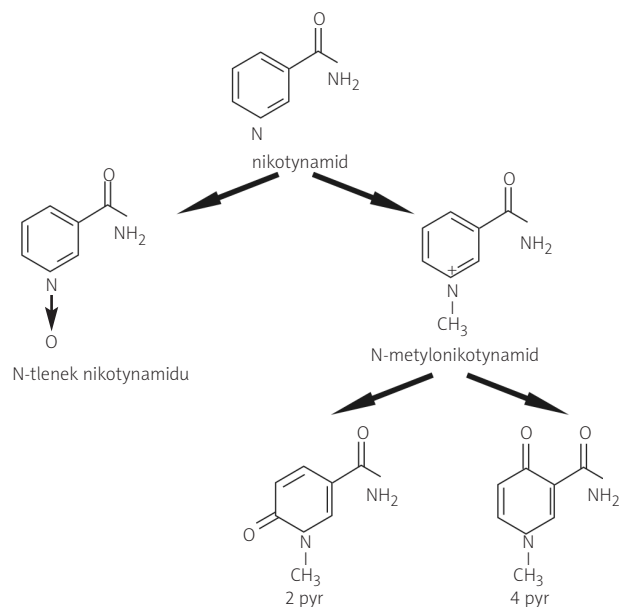
skóry (takich jak trądzik) lub w przypadku ogólnego niedoboru witaminy PP, który objawia się zaburzeniami skórnymi (rumień), pokarmowymi oraz reakcją ze strony ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Warto też wspomnieć, że w leczeniu wciąż znajduje się związek o bardzo zbliżonej nazwie – niketamid, o właściwościach analeptycznych. Nie należy jednak mylić nikotynamidu z niketamidem, który ma zupełnie inną budowę chemiczną i działanie farmakologiczne.

Metabolizm nikotynamidu

Nikotynamid po podaniu zewnętrznym jest metabolizowany kilkoma drogami. Wydaje się, że głównym szlakiem metabolicznym jest reakcja metylacji, przebiegająca przy udziale metylotransferazy, w której z nikotynamidu

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Włodzimierz Buczek, Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny, ul. Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok, tel./faks: +48 85 748 56 01, e-mail: pharmdyn@umwb.edu.pl



Rycina 1. Metabolizm nikotynamidu u człowieka

powstaje N-metylonikotynamid (NMN⁺) (35–45%), a następnie z NMN⁺ amid kwasu N-metyl-2-pirydino-5-karboksylowego (2 pyr) oraz N-metyl-4-pirydino-5-karboksylowego (4 pyr) [3, 4]. Drugim metabolitem nikotynamidu jest N-tlenek nikotynamidu (Rycina 1.). Jak wynika z danych, w organizmie ludzkim z nikotynamidu nie powstaje kwas nikotynowy [5].

Właściwości biologiczne i terapeutyczne nikotynamidu i jego metabolitów

Jeszcze do niedawna sądzono, że metabolity nikotynamidu to nieaktywne związki, które nie mają istotnego znaczenia w fizjologii człowieka. W ostatnich latach wykonano szereg badań, których wyniki przeczą wcześniejszym założeniom. W badaniach *in vitro* udowodniono, że NMN⁺ ma silne właściwości przeciwzapalne [6] i podobnie jak nikotynamid może być skuteczny w leczeniu trądziku [7]. Ponadto metabolity NMN⁺ – pyr 2 i pyr 4, mogą być uważane za toksyny uremiczne [8, 9], a co ciekawe – ich obecność w erytrocytach ludzkich po raz pierwszy wykryła grupa polskich uczonych pod kierownictwem prof. Smoleńskiego [10].

Najwięcej danych na temat właściwości biologicznych dotyczy przede wszystkim związku macierzystego – nikotynamidu. Badania kliniczne wykazały, iż nikotynamid podawany doustnie w dużych dawkach, tj. 1,5–3 g dziennie przez 1–6 miesięcy, działał korzystnie w chorobach skóry o podłożu zapalnym, takich jak trądzik [11], łuszczyca [12] czy też wielopostaciowe osutki świetlne [3], obumieranie tłuszczowe [13], pemfigoid [14]. Działanie tego związku najprawdopodobniej wynika z licznych efektów komórkowych, np. hamowania poli(ADP-rybozo)polimerazy-1 (PARP-1) nasilającej zależną od czynnika jądrowego kappa B trans-

krypcję, która odgrywa istotną rolę w ekspresji wielu zapalnych cytokin, chemokin, molekuł adhezyjnych i innych mediatorów [15]. Co ciekawe, w latach 50. i 60. próbowano stosować nikotynamid w megadawkach, jako lek wspomagający przy leczeniu schizofrenii i innych zaburzeń OUN, jednak nie potwierdzono istotnych korzyści płynących z takiego leczenia [3]. Najwięcej danych dotyczy prób zastosowania nikotynamidu w leczeniu cukrzycy. Mimo pozytywnych wyników uzyskanych w badaniach prowadzonych na zwierzętach z eksperymentalnie indukowaną cukrzycą [16], w dużym badaniu klinicznym nie potwierdzono opóźnienia wystąpienia cukrzycy typu 1 po zastosowaniu nikotynamidu [2].

Poza wymienionymi powyżej efektami działania nikotynamidu i jego pochodnych, interesujące wydają się badania wskazujące na ich istotną rolę w regulacji funkcji układu krążenia. Szczególnie ważne są obserwacje dotyczące korzystnych efektów pochodnych nikotynamidu w przebiegu dysfunkcji śródbłonnka oraz zakrzepicy naczyń, które leżą u podstaw większości schorzeń sercowo-naczyniowych.

Rola nikotynamidu oraz jego metabolitu – NMN⁺ – w regulacji funkcji układu krążenia i hemostazy

Nicotynamid i NMN⁺ nie zmieniają ciśnienia tętniczego, częstości akcji serca czy innych parametrów hemodynamicznych [17, 18]. Istnieją jednak nieliczne doniesienia o możliwym działaniu naczyniorozszerzającym nikotynamidu [19–20], natomiast nie wykazaliśmy takiego działania w przypadku jego metabolitu – NMN⁺ – zarówno w modelu perfundowanej kończyny dolnej szczura (Mogielnicki et al. *Pharm Rep* 2008, w druku), jak i w badaniu z izolowaną tętnicą krezkową szczura [40]. Wydaje się więc, że wpływ nikotynamidu i NMN⁺ na układ sercowo-naczyniowy wynika raczej z działania lokalnego, komórkowego, a nie z efektów hemodynamicznych. Potwierdzają to również nasze ostatnie badania, w których nikotynamid i NMN⁺ podane lokalnie śródskórnym spowodowały wzrost przepuszczalności skórnych naczyń krwionośnych w promieniu 0,5–1 cm od miejsca podania (Pietrzak et al. *Clin Exp Dermatol* 2008, w druku).

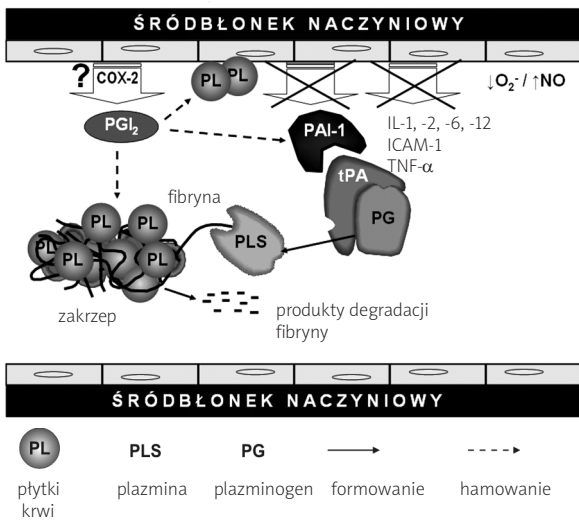
Protekcja śródbłonna

Prawidłowy śródbłonek naczyniowy jest wyznacznikiem stanu układu sercowo-naczyniowego, a jego dysfunkcja leży u podstaw takich chorób układu krążenia, jak nadciśnienie tętnicze, miażdżycy, choroba niedokrwienności serca czy też niewydolność serca [21]. Upośledzenie funkcji śródbłonna przejawia się zmniejszonym uwalnianiem naczynioprotekcyjnych przekaźników, takich jak niezmiernie ważny, powstający z L-argininy tlenek azotu (NO) oraz prostacyklina (PGI₂) wytwarzana z kwasu arachidonowego (AA) przez cyklooksygenazy COX-1 lub COX-2. Z drugiej strony dochodzi do nadmiernej syntezy i ekspresji takich czyn-

ników, jak destrukcyjny anion ponadtlenkowy (O_2^-), prozapalne cytokiny (np. IL-6, IL-8), chemokiny (np. MCP-1), cząsteczki adhezyjne (np. selektyna P, selektyna E, ICAM-1, VCAM-1) [21]. Zachwianie równowagi funkcyjnej śródbłonna rozpoczyna szereg procesów patologicznych. Narastające zapalenie i zwłóknienie ściany naczynia prowadzi do tworzenia blaszki miażdżycowej. Dodatkowy wzrost potencjału prozakrzepowego śródbłonna doprowadza wspólnie z miażdżycą do zakrzepicy tętniczej, która jest już bezpośrednią przyczyną zawału serca lub udaru mózgu i bardzo często przyczyną zgonu. Nie można więc niedoceniać znaczenia substancji leczniczych, które modyfikując funkcje śródbłonna, mogą wywierać korzystne działanie terapeutyczne. Widoczne jest to na przykładzie inhibitorów enzymu konwertującego i statyn, których punkt uchwytu działania stanowi głównie śródbłonek, a wiadomo, jak wielkie znaczenie mają te leki w terapii chorób układu krążenia [22].

Wydaje się, że najlepiej udokumentowane jest działanie przeciwzapalne nikotynamidu, które w istotny sposób może przyczyniać się do wygaszania zapalenia w ścianie naczynia w przebiegu miażdżycy. Poza wcześniej wspomnianymi korzystnymi efektami działania nikotynamidu w przebiegu schorzeń dermatologicznych o podłożu zapalnym, wykazano, że może on hamować transformację limfocytów [23] i aktywność makrofagów [24], ekspresję prozapalnych cytokin: interleukin (IL) 1, 6, 8, TNF- α [25], IL-12 [26] oraz molekuly adhezyjnej ICAM-1 [27]. Jego działanie potwierdzono również w badaniach na myszach z indukowanym zapaleniem [28]. Nie wiadomo jednak, czy identyczne efekty nikotynamid wywiera na komórki śródbłonna naczyniowego, gdyż wszystkie wymienione właściwości stwierdzono na innych komórkach. Interesująca wydaje się obserwacja dotycząca cytoprotekcyjnego działania nikotynamidu w stosunku do śródbłonkowych komórek mózgowych naczyń krwionośnych [29], a także komórek nerwowych [30]. Efekt cytoprotekcyjny potwierdzają również badania, w których nikotynamid podany szczurom lub myszom zmniejszał obszar niedokrwienia po eksperymentalnie indukowanym udarze mózgowym [31–34]. Pojedyncze doniesienia sugerują także, że nikotynamid może być zmiataczem wolnych rodników, z wyłączeniem NO [35], i działać antyoksydacyjnie [36], przedłużając w ten sposób czas życia NO i nasilając jego aktywność. Z drugiej strony wykazano, że nikotynamid hamuje indukowalną syntazę NO [24]. Problemem wydaje się jednak konieczność podawania nikotynamidu w olbrzymich dawkach (0,5–1 g/kg masy ciała) oraz brak potwierdzenia działania śródbłonkowego w badaniach klinicznych. Biorąc pod uwagę długoletnią historię badań nad właściwościami nikotynamidu oraz brak aktywności biologicznej małych dawek w badaniach *in vivo* lub małych stężeń w badaniach *in vitro*, trudno uwierzyć, aby mógł on w przyszłości odegrać istotną rolę w leczeniu chorób przebiegających z dysfunkcją śródbłonna.

W świetle powyższych obserwacji zwrócono uwagę na substancje chemiczne o podobnej budowie, a w związku z tym właściwościami przeciwzapalnymi, cytoprotekcyjnymi i potencjalnie korzystnym działaniem śródbłonkowym, lecz o wyższej aktywności biologicznej. W najnowszych badaniach wykazano, że różne pochodne nikotynamidowe chronią komórki śródbłonna przed uszkodzeniem indukowanym peroksynitratem, a efekt ten nie zależy od zahamowania aktywności PARP [37]. Już wcześniej inne eksperymenty *in vitro* wykazały, że silne działanie przeciwzapalne wykazuje metabolit nikotynamidu – NMN⁺ [6]. W bardziej odległej historii badań pojawiały się dowody świadczące o tym, że uważany dotąd za nieaktywny NMN⁺ może działać silniej przeciwczukrzycowo i cytoprotekcyjnie niż związek macierzysty [38]. Niedawno zasugerowano nawet, że to on może odpowiadać za większość efektów wywoływanych przez nikotynamid [39]. Badania z ostatnich lat prowadzone pod kierunkiem prof. Chłopickiego, prof. Smoleńskiego oraz badania naszego zespołu jednoznacznie wskazują, że NMN⁺ jeszcze silniej niż nikotynamid może działać protekcyjnie na śródbłonek naczyniowy. Przede wszystkim wykazaliśmy w modelach zwierzęcych, że NMN⁺ podobnie, chociaż w mniejszym stopniu, jak leki przeciwplatekcyjne, antykoagulanty oraz leki o działaniu śródbłonkowym, takie jak inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (ACE-I) czy statyny, ogranicza rozwój zakrzepicy tętniczej indukowanej w tętnicy szyjnej wspólnej szczura [17] oraz wywołuje trombolizę zakrzepu [40]. Stosowane dawki (3–100 mg/kg masy ciała) były znacznie niższe od dawek nikotynamidu użytych we wcześniej cytowanych badaniach i – co ciekawe – nikotynamid podany w dawce 30 mg/kg masy ciała nie wykazywał działania przeciwzakrzepowego [17]. Na istotny udział śródbłonna naczyniowego w przeciwzakrzepowym działaniu NMN⁺ w powyższych badaniach wskazywało kilka faktów. Zaobserwowaliśmy, że NMN⁺ działa również przeciwplatekcyjnie, ale jedynie w warunkach *in vivo*, w obecności zarówno płytek krwi, jak i śródbłonna naczyniowego. Ponadto w osoczu zwierząt, którym podano NMN⁺, wykazano wzrost 6-keto-PGF_{1 α} , stabilnego metabolitu prostacykliny (PGI₂) [17, 40], a efekty NMN⁺ znosiło wcześniejsze podanie zarówno nieselektywnie blokującej cyklooksygenazę (COX) 1 i 2 indometacyny, jak i selektywnego inhibitora COX-2 – rofekoksybu, natomiast nie L-NAME – inhibitora NOS. Mimo że powyższe badania zaprezentowały NMN⁺ jako nowy potencjalny, występujący endogennie w organizmie, nietoksyczny induktor szlaku COX-2/PGI₂, to nie odpowiedziały jednoznacznie na pytanie, czy źródłem PGI₂ i jednocześnie punktem uchwytu działania NMN⁺ jest głównie śródbłonek naczyniowy. Próba odpowiedzi na to pytanie poprzez zastosowanie modelu eksperymentalnego, mierzącego jedynie odpowiedź śródbłonna naczyniowego, bez udziału elementów morfotycznych, zakończyła się niepomyślnie. Perfuzja izolowanych kończyn dolnych szczura natlenionym buforem Tyroda z NMN⁺ nie spowodowała nasilonej



Rycina 2. Mechanizm działania ochronnego nikotynamidu i NMN⁺ na śródbłonek naczyniowy

syntezy PGI₂ (Mogielnicki et al. *Pharm Rep* 2008, w druku). Z drugiej jednak strony badania przeprowadzone na szczurach z hipertriacylglicerolemią i cukrzycą dowiodły, że NMN⁺ zapobiega rozwojowi dysfunkcji śródbłonka w tych modelach eksperymentalnych [41]. Również w naszym pierwszym badaniu NMN⁺ działał skuteczniej przeciwzakrzepowo u zwierząt z wywołanym eksperymentalnie nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym i rozwijającą się następnie dysfunkcją śródbłonka aniżeli u szczurów zdrowych [17], co potwierdza istotną rolę protekcji śródbłonkowej w mechanizmach działania NMN⁺ (Rycina 2).

Potencjał przeciwzakrzepowy

Jak wynika z opisanych powyżej badań, szczególnie NMN⁺, metabolit nikotynamidu, ma potencjał przeciwzakrzepowy, specyficzny dla zależnej od płytek krwi zakrzepicy tętniczej, natomiast nie żylną [17, 40]. Wydaje się, że efekt ten związany jest przede wszystkim z nasileniem śródbłonkowego szlaku COX-2/PGI₂. Nie można jednak wykluczyć innych mechanizmów odpowiedzialnych za działanie przeciwzakrzepowe NMN⁺. Jak wykazano już znacznie wcześniej, podwójna cząsteczka nikotynamidu potężona łańcuchem węglowym – 1,2-bis(nikotynamido)propan – zmniejszyła śmiertelność na skutek indukowanej kolagenem lub kwasem arachidonowym zakrzepicy tętnic mózgowych lub

płucnych myszy, szczurów lub królików. Równocześnie, podobnie jak w naszych badaniach, zaobserwowano wzrost stosunku PGI₂/tromboksan A₂ w osoczu zwierząt [42]. Działanie przeciwzakrzepowe NMN⁺ wprost proporcjonalnie korelowało z zahamowaniem agregacji płytek krwi, ale efekt przeciwplatetkowy obserwowano jedynie w warunkach *ex vivo* [17].

Nieliczne dane sugerują, że nikotynamid może modyfikować funkcje układu krzepnięcia. Wykazano, że nikotynamid hamuje odstawianie błonowych łańcuchów fosfatydyloserynowych, proces, który prowadzi do utraty przez ścianę naczynia właściwości antykoagulacyjnych, progresji procesów krzepnięcia i agregacji płytek krwi oraz zapalenia wewnątrzkomórkowego [30]. Nikotynamid może hamować inicjację kaskady krzepnięcia osoczkowego, ponieważ zaobserwowano, że zmniejsza on ekspresję czynnika tkankowego (TF) [43]. Jednakże analiza podstawowych parametrów koagulacyjnych, takich jak PT, APTT, poziom fibrynogenu, przeprowadzona w osoczu szczurów, którym podano nikotynamid i NMN⁺, nie wykazała wpływu tych związków na układ krzepnięcia. Interesująca jest natomiast hipoteza słabego fibrynolitycznego działania nikotynamidu oraz NMN⁺, które mogłyby się przyczynić do ich działania przeciwzakrzepowego. Mianowicie, już prawie 20 lat temu Gryglewski i wsp. wykazali w badaniach na kotach trombolityczne właściwości nikotynamidu [44]. Wydaje się, że mechanizm tego działania jest związany raczej ze zmniejszeniem aktywności inhibitorów fibrynolizy aniżeli z bezpośrednim działaniem litycznym. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy, że NMN⁺ w sposób wprost proporcjonalny do podanej dawki dożylniej zmniejszył osoczowy poziom i aktywność inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), nie wpływając na poziom t-PA [17].

Znaczenie kliniczne

Wszystkie dane dotyczące wpływu nikotynamidu oraz NMN⁺ na układ krążenia pochodzą z badań podstawowych, z udziałem zwierząt lub hodowli tkankowych. Wyniki części badań klinicznych potwierdzających potencjalne działanie cytoprotekcyjne i przeciwzapalne nikotynamidu mogą jedynie sugerować korzystny efekt jego stosowania w leczeniu dysfunkcji śródbłonka (Tabela I).

Warto także nadmienić, że nikotynamid zwiększa przepływ krwi przez narządy, np. tarczycę, stąd próby stosowania nikotynamidu jako wzmocnienia radioterapii [45, 46].

Tabela I. Podsumowanie badań klinicznych dotyczących nikotynamidu

Lata	Wskazanie	Liczba badań	Liczba chorych	Zakres dawek [g/dobę]	Czas trwania
1987–2008	cukrzyca typu 1 (cytoprotekcja)	12	16–1005	0,2–3	0,5–5 lat
1986–1998	schorzenia skórne (efekt przeciwzapalny)	4	8–76	1,5–3	0,5–6 miesięcy
1952–1970	schizofrenia	3	17–982	1–6	3–36 miesięcy

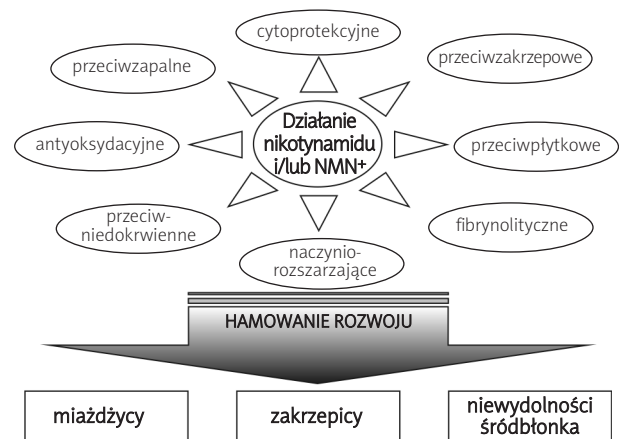
Problemem jest jednak konieczność podawania bardzo dużych dawek, a przy tym osiągnięcie wątpliwych, mało przekonywujących wyników. Ponadto większość danych pochodzi z lat 80. i 90. i nie ma dużych badań klinicznych z randomizacją, z twardymi punktami końcowymi. Wydaje się, że najlepsze i najnowsze jest badanie ENDIT, obejmujące ponad 1000 chorych, z randomizacją, przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby, kontrolowane placebo, prowadzone w 18 krajach europejskich, Kanadzie oraz Stanach Zjednoczonych i trwające 5 lat, które zakończyło się niepowodzeniem, zamykając ostatecznie możliwość wykorzystania nikotynamidu w leczeniu cukrzycy [47]. Wszystkie te fakty wskazują na niską aktywność biologiczną samego nikotynamidu, a co za tym idzie – niską skuteczność terapeutyczną.

Coraz więcej obiecujących wyników dostarczają badania podstawowe prowadzone z udziałem jednego z metabolitów nikotynamidu – NMN⁺. Co ważne, w badaniach, w których porównywano działanie nikotynamidu i NMN⁺, metabolit wykazywał podobne, a często nawet silniejsze działanie przeciwzapalne, cytoprotekcyjne oraz przeciwzakrzepowe [6, 17, 38]. Szereg badań dotyczyło wpływu NMN⁺ na układ krążenia i potwierdziło, że może on być lekiem stosowanym w terapii zaburzeń sercowo-naczyniowych przebiegających z dysfunkcją śródbłonna i zaburzeniami zakrzepowo-zatorowymi. Brak badań przeprowadzonych przez większą liczbę niezależnych ośrodków naukowych oraz brak badań publikowanych w renomowanych czasopiśmiech z wysokim *Impact Factor* utrudnia jednak wejście NMN⁺ w fazę badań klinicznych, dlatego nie wiadomo, czy wyniki eksperymentów prowadzonych na zwierzętach mogą przełożyć się na efekt terapeutyczny u ludzi.

Podsumowanie

Dane epidemiologiczne dotyczące zgonów z powodu chorób sercowo-naczyniowych w Polsce i w Europie nie pozostawiają złudzeń. Wciąż nie jesteśmy w stanie zapobiegać i skutecznie leczyć podstawowych schorzeń układu krążenia, a szczególnie tych, w których upośledzona jest funkcja śródbłonna naczyniowego. Jak ważne są leki mogące działać protekcyjnie na śródbłonek naczyniowy, świadczy duża skuteczność, szeroki zakres wskazań i powszechność stosowania ACE-I oraz statyn, których punkt uchwytu działania w znacznej mierze stanowi właśnie śródbłonek naczyniowy. Wydaje się, że odkrycie nowych, bezpiecznych substancji o działaniu śródbłonkowym jest wyzwaniem i może znacznie poprawić skuteczność leczenia schorzeń sercowo-naczyniowych. Takim związkami mogłyby być NMN⁺, co zostało pokazane na Rycinie 3., przedstawiającej działanie nikotynamidu i/lub NMN⁺ oraz wpływ na układ sercowo-naczyniowy.

Na podstawie analizy efektów wywoływanych przez oba związki można wskazać hipotetyczne schorzenia sercowo-naczyniowe, w których korzystne byłoby zastosowanie nikotynamidu i/lub NMN⁺. Są to:



Rycina 3. Wpływ nikotynamidu i/lub NMN⁺ na układ krążenia i hemostazy

- choroba niedokrwiennej serca,
- zawał mięśnia sercowego/udar mózgu,
- przewlekła niewydolność serca,
- angiopatie cukrzycowe.

Podsumowując powyższy przegląd piśmiennictwa, można stwierdzić, iż wciąż za mało jest badań nie tylko podstawowych, ale przede wszystkim klinicznych, pozwalających jednoznacznie ocenić rolę nikotynamidu oraz jego metabolitu – NMN⁺ – w leczeniu chorób układu krążenia. Wydaje się, że raczej trzeba szukać pochodnych nikotynamidu o wyższej aktywności biologicznej niż sam związek macierzysty, jak na przykład jego metabolit – NMN⁺. Dopiero te związki należy ocenić w badaniach *in vitro* oraz na modelach zwierzęcych, a być może w przyszłości zastosować również u ludzi. Warto przy tym zwrócić uwagę na interpretację wyników badań prowadzonych na zwierzętach oraz przekładanie ich na ludzi, gdyż jak wykazują wyniki badań farmakokinetycznych, metabolizm nikotynamidu różni się jakościowo oraz ilościowo w zależności od gatunku.

Piśmiennictwo

1. Jaconello P. Niacin versus niacinamide. *CMAJ* 1992; 147: 990.
2. The Merck Index. *Merck & CO, Inc.*, Rahway, NJ, USA 1989.
3. Knip M, Douek IF, Moore WP, et al. Safety of high-dose nicotinamide: a review. *Diabetologia* 2000; 43: 1337-45.
4. Perlzweig WA, Rosen F, Pearson PB, et al. Comparative studies in niacin metabolism. The fate of niacin in man, rat, dog, pig, rabbit, guinea pig, goat, sheep and calf. *Journal of Nutrition* 1950; 40: 453-69.
5. Stratford MR, Dennis MF. High-performance liquid chromatographic determination of nicotinamide and its metabolites in human and murine plasma and urine. *J Chromatogr* 1992; 582: 145-51.
6. Gebicki J, Sysa-Jedrzejowska A, Adamus J, et al. 1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin. *Pol J Pharmacol* 2003; 55: 109-12.
7. Wozniacka A, Wiczorkowska M, Gebicki J, et al. Topical application of 1-methylnicotinamide in the treatment of rosacea: a pilot study. *Clin Exp Dermatol* 2005; 30: 632-5.
8. Słominska EM, Smolenski RT, Szolkiewicz M, et al. Accumulation of plasma N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in patients with chronic renal failure. *Mol Cell Biochem* 2002; 231: 83-8.

9. Rutkowski B, Slominska E, Szolkiewicz M, et al. N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide: a novel uremic toxin? *Kidney Int Suppl* 2003; 519-21.
10. Slominska EM, Carrey EA, Foks H, et al. A novel nucleotide found in human erythrocytes, 4-pyridone-3-carboxamide-1-beta-D-ribose nucleoside triphosphate. *J Biol Chem* 2006; 281: 32057-64.
11. Shalita AR, Smith JG, Parish LC et al. Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris. *Int J Dermatol* 1995; 34: 434-7.
12. Namazi MR. Nicotinamide: a potential addition to the anti-psoriatic weaponry. *FASEB J* 2003; 17: 1377-9.
13. Handfield-Jones S, Jones S, Peachey R. High dose nicotinamide in the treatment of necrobiosis lipoidica. *Br J Dermatol* 1988; 118: 693-6.
14. Neumann R, Rappold E, Pohl-Markl H. Treatment of polymorphous light eruption with nicotinamide: a pilot study. *Br J Dermatol* 1986; 115: 77-80.
15. Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429.
16. O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, et al. Nicotinamide prevents the development of diabetes in the cyclophosphamide-induced NOD mouse model by reducing beta-cell apoptosis. *J Pathol* 2000; 191: 86-92.
17. Mogielnicki A, Kramkowski K, Pietrzak L, et al. N-methylnicotinamide inhibits arterial thrombosis in hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 515-27.
18. Stratford MR, Rojas A, Hall DW, et al. Pharmacokinetics of nicotinamide and its effect on blood pressure, pulse and body temperature in normal human volunteers. *Radiother Oncol* 1992; 25: 37-42.
19. Burns DM, Ruddock MW, Walker MD, et al. Nicotinamide-inhibited vasoconstriction: lack of dependence on agonist signalling pathways. *Eur J Pharmacol* 1999; 374: 213-20.
20. Ruddock MW, Hirst DG. Nicotinamide relaxes vascular smooth muscle by inhibiting myosin light chain kinase-dependent signaling pathways: implications for anticancer efficacy. *Oncol Res* 2004; 14: 483-9.
21. Drelicharz Ł, Mikita J, Chabielska E, et al. Śródbłonkowe działanie aldosteronu – implikacje terapeutyczne płynące z badań podstawowych i klinicznych. *Kardiologia Pol* 2005; 63: 409-19.
22. Gryglewski RJ, Uracz W, Swies J, et al. Comparison of endothelial pleiotropic actions of angiotensin converting enzyme inhibitors and statins. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 947: 229-46;
23. Burger DR, Vandenbark AA, Daves D, et al. Nicotinamide: suppression of lymphocyte transformation with a component identified in human transfer factor. *J Immunol* 1976; 117: 797-801.
24. Pellat-Deceunynck C, Wietzerbin J, Drapier JC. Nicotinamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophages. *Biochem J* 1994; 297: 53-8.
25. Ungerstedt JS, Blomback M, Soderstrom T. Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 48-52.
26. Kretowski A, Mysliwiec J, Szelachowska M, et al. Nicotinamide enhances in vitro production of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha in peripheral whole blood of people at high risk of developing type 1 diabetes and people with newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 47: 81-6.
27. Hiromatsu Y, Sato M, Tanaka K, et al. Inhibitory effects of nicotinamide on intercellular adhesion molecule-1 expression on cultured human thyroid cells. *Immunology* 1993; 80: 330-2.
28. Kroger H, Hauschild A, Ohde M, et al. Enhancing the inhibitory effect of nicotinamide upon collagen II induced arthritis in mice using N-acetylcysteine. *Inflammation* 1999; 23: 111-5.
29. Chong ZZ, Lin SH, Maiese K. Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *J Vasc Res* 2002; 39: 131-47.
30. Maiese K, Chong ZZ. Nicotinamide: necessary nutrient emerges as a novel cytoprotectant for the brain. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 228-32.
31. Mokudai T, Ayoub IA, Sakakibara Y, et al. Delayed treatment with nicotinamide (Vitamin B (3)) improves neurological outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in Wistar rats. *Stroke* 2000; 31: 1679-85.
32. Maynard KI, Ayoub IA, Shen CC. Delayed multidose treatment with nicotinamide extends the degree and duration of neuroprotection by reducing infarction and improving behavioral scores up to two weeks following transient focal cerebral ischemia in Wistar rats. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 939: 416-24.
33. Yang J, Klaidman LK, Adams JD. Medicinal chemistry of nicotinamide in the treatment of ischemia and reperfusion. *Mini Rev Med Chem* 2002; 2: 125-34.
34. Sakakibara Y, Mitha AP, Ayoub IA, et al. Delayed treatment with nicotinamide (vitamin B3) reduces the infarct volume following focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats, diabetic and non-diabetic Fischer 344 rats. *Brain Res* 2002; 931: 68-73.
35. Kolb H, Burkart V. Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. *Diabetes Care* 1999; 22 Suppl 2: B16-20.
36. Klaidman LK, Mukherjee SK, Adams JD Jr. Oxidative changes in brain pyridine nucleotides and neuroprotection using nicotinamide. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1525: 136-48.
37. Slominska EM, Yuen A, Osman L, et al. Cytoprotective effects of nicotinamide derivatives in endothelial cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008; 27: 863-6.
38. Fischer LJ, Falany J, Fisher R. Characteristics of nicotinamide and N1-methylnicotinamide protection from alloxan diabetes in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 70: 148-55.
39. Gosteli J. Nicotinamide trials in diabetes intervention. Does a metabolite provide benefit? *Med Hypotheses* 2005; 64: 1062-3.
40. Chlopicki S, Swies J, Mogielnicki A, et al. 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 230-9.
41. Bartu M, Lomnicka M, Kostogryś RB, et al. 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharmacol Rep* 2008; 60: 127-38.
42. Mizukami M, Neichi T, Yamazaki T, et al. Effects of AVS (1,2-bis (nicotinamido) propane) on platelet function and vascular endothelium. *Arzneimittelforschung* 1984; 34: 764-8.
43. Ungerstedt JS, Heimersson K, Soderstrom T, et al. Nicotinamide inhibits endotoxin-induced monocyte tissue factor expression. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2554-60.
44. Gryglewski RJ, Marcinkiewicz E, Radomski M, et al. Prostacyclin and the mechanism of action of defibrotide. *Eicosanoids* 1989; 2: 163-7.
45. Gupta N, Saleem A, Kotz B, et al. Carbogen and nicotinamide increase blood flow and 5-fluorouracil delivery but not 5-fluorouracil retention in colorectal cancer metastases in patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3115-23.
46. Hoskin PJ, Rojas AM, Phillips H, et al. Acute and late morbidity in the treatment of advanced bladder carcinoma with accelerated radiotherapy, carbogen, and nicotinamide. *Cancer* 2005; 103: 2287-97.
47. Gale EA, Bingley PJ, Emmett CL, et al. European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet* 2004; 363: 925-31.

Znaczenie apoptozy w patogenezie miażdżycy

Role of apoptosis in the pathogenesis of atherosclerosis

Danuta Zapolska-Downar^{1,2}, Grażyna Sygitowicz², Mirosław Jarosz¹

¹ Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa

² Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Apoptoza jest formą genetycznie zaprogramowanej śmierci, która odgrywa główną rolę w regulacji ilości komórek w wielu tkankach, włączając w to tkankę naczyniowo-sercową. Badania ostatnich lat wskazują na znaczenie zaprogramowanej śmierci komórek w miażdżycy. Wykryto wiele regulatorów, które przyczyniają się do apoptozy komórek obecnych w płytce miażdżycowej i wyjaśniono mechanizmy ich działania. Wydaje się, że rola apoptozy w powstawaniu miażdżycy jest dwojaka i zależy od etapu zmiany miażdżycowej. We wczesnych etapach śmierć apoptotyczna komórek mięśni gładkich i komórek zapalnych może osłabiać proces apoptozy. Kiedy natomiast zmiana jest uformowana, apoptoza komórek śródbłonna i mięśni gładkich oraz makrofagów może promować wzrost płytki miażdżycowej i stan nadkrzepliwości oraz indukować jej pęknięcie. Wyjaśnienie molekularnych mechanizmów, które regulują apoptozę, może pomóc w opracowaniu nowych strategii leczenia miażdżycy i jej głównych komplikacji, ostrych epizodów naczyniowych. W pracy szczegółowo omówiono molekularne mechanizmy prowadzące do indukcji apoptozy. Na podstawie badań eksperymentalnych opisano warunki i różnego rodzaju czynniki biofizjologiczne i biochemiczne, które mogą wpływać na apoptozę komórek obecnych w płytce miażdżycowej. Ponadto przedyskutowano znaczenie apoptozy dla progresji miażdżycy i wystąpienia jej klinicznych powikłań.

Słowa kluczowe: apoptoza, miażdżyca, szlaki sygnalizacyjne, komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich, makrofagi

Abstract

Apoptosis is a form of genetically programmed cell death, which play a key role in regulation of cellularity in a variety tissues, including the cardiovascular tissue. Studies over the past year have demonstrated the significance of programmed cell death in atherosclerosis. Some of the key regulators that contribute to the apoptosis of cells within the atherosclerosis lesion have been identified and their mechanism of action elucidated. It seems that the role of apoptosis in atherogenesis is dual, depending on the stage of the plaque. In early stages apoptotic death of smooth muscle cells and inflammatory cells may delay atherosclerotic process. However, once the plaque is formed, apoptosis of smooth muscle cells, endothelial cells and macrophages may promote plaque growth and pro-coagulation and may induce rupture. Clarification of the molecular mechanisms that regulates apoptosis may help design a new strategy for treatment of atherosclerosis and its major complication, the acute vascular syndromes. The article discusses in detail mechanisms leading to induction of apoptosis. On the basis of the results of experimental studies, the condition and various biophysiological and biochemical factors, which may influence apoptosis of vascular cells have been described. Moreover, the article discusses the relevance of apoptosis to plaque progression and clinical consequence of vascular cell apoptosis.

Key words: apoptosis, atherosclerosis, signaling pathway, endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages

Kardiologia Polska 2008; 66: 10 (supl. 3): 347–357

Apoptoza jest drugim obok nekrozy sposobem eliminacji komórek z organizmu, który zapewnia utrzymanie homeostazy dzięki zachowaniu równowagi między proliferacją a eliminacją niepotrzebnych czy nieprawidłowych komórek. Słowo „apoptoza” pochodzi z języka greckiego i oznacza opadanie płatków kwiatowych lub liści, co odnosi się do końca

wegetacji roślin. Zostało zaproponowane przez Kerrego i wsp. [1], którzy w ten sposób określili zaprogramowany zespół zmian biochemicznych i morfologicznych charakteryzujący inny od nekrozy proces obumierania komórek.

Apoptoza inicjowana jest głównie przez czynniki wewnętrzne i dotyczy zazwyczaj pojedynczych komórek [2]. Jest

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Danuta Zapolska-Downar, Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa, tel.: +48 22 572 07 35, e-mail: zapolska@vp.pl

procesem skoordynowanym, genetycznie kontrolowanym i czynnym energetycznie. Najpierw następuje obkurczenie i zmniejszenie objętości komórki wskutek utraty wody i elektrolitów. Jednocześnie dochodzi do zagęszczania i marginalizacji chromatyny oraz degradacji jądrowego DNA. Następnie błona komórkowa fałduje (ang. *blebbing*). Na jej powierzchni pojawiają się tzw. ciątka apoptotyczne, zawierające fragmenty cytoplazmy, organella komórkowe oraz fragmenty chromatyny. Ciątka te są szybko fagocytowane przez makrofagi i sąsiadujące komórki, dzięki czemu nie dochodzi do uruchomienia mechanizmów odpowiedzi zapalnej.

W przeciwieństwie do apoptozy, nekroza jest bardziej chaotycznym modelem śmierci [2]. Powodowana jest głównie przez czynniki zewnętrzne, takie jak: ciśnienie osmotyczne, temperatura, związki toksyczne, stres hipoksyjny czy uszkodzenia mechaniczne. Zazwyczaj dotyczy zespołu komórek i nie wymaga nakładu energii. W nekrozie dochodzi do postępującej utraty integralności błony cytoplazmatycznej, napływu jonów sodu i wapnia oraz wody, co powoduje pęcznienie komórki. Kolejne stadium to obrzęk mitochondriów, fragmentacja błony cytoplazmatycznej i uwolnienie zawartości komórki do otaczającego środowiska, co powoduje reakcję obronną organizmu z wywołaniem odpowiedzi zapalnej. Różnice między apoptozą a nekrozą przedstawia Tabela I.

Molekularne mechanizmy apoptozy

Wiele czynników wpływa na proces apoptozy i jego regulację. Sygnałem do rozpoczęcia tego procesu może być niedobór lub brak czynników wzrostowych, hormonów czy substancji odżywczych [3]. Mogą też to być uszkodzenia DNA, aktywacja onkogenów, stymulacja specyficznych receptorów błonowych i wewnątrzkomórkowych, obecność reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu lub promieniowanie jonizujące. Zaprogramowana śmierć komórki przebiega w trzech etapach [4, 5]. W pierwszym, zwanym fazą induk-

cji lub inicjacji oraz przekazywania sygnału, podejmowana jest decyzja o śmierci komórki pod wpływem wymienionych czynników wewnątrz- i zewnątrzpochodnych. Sygnał śmierci jest odczytywany i przekazywany wzdłuż określonych ścieżek, zależnych od sygnału i rodzaju komórki. Najlepiej poznanymi ścieżkami są: wiązanie receptor-ligand – tzw. szlak zewnątrzpochodny, który w efekcie końcowym prowadzi do aktywacji jednej z kaspaz efektorowych – kaspazy 8, oraz szlak mitochondrialny – wewnątrzpochodny, podczas którego dochodzi do aktywacji innej kaspazy inicjującej – kaspazy 9. W kolejnym etapie, zwanym fazą wykonawczą, który jest wspólny dla różnych dróg sygnałowych inicjujących apoptozę, dochodzi do aktywacji kaspaz efektorowych przez powstałe w fazie pierwszej kaspazy inicjujące. Pod wpływem kaspaz efektorowych (głównie kaspazy 3) dochodzi do proteolizy wielu białek istotnych dla życia komórki i ostatecznie do jej śmierci. W ostatnim etapie, czyli fazie degradacji, następuje fagocytoza powstających ciałek apoptotycznych przez makrofagi i otaczające komórki.

Faza inicjacji i przekazywania sygnału drogą zewnątrzpochodną (receptorową)

Transmisja sygnału śmierci poprzez ścieżkę zewnątrzpochodną rozpoczyna się związaniem ligandu ze specyficznym receptorem błonowym, zwanym receptorem śmierci [5]. Receptory te należą do nadrodziny czynnika martwicy guza (ang. *tumor necrosis factor*, TNF) i są transbłonowymi cząsteczkami, których domeny zewnątrzkomórkowe odpowiadają za wiązanie z ligandem, zaś fragment cytoplazmatyczny, zawierający domenę śmierci (ang. *death domain*, DD) odpowiada za przekazywanie sygnału do wnętrza komórki. Dotychczas najlepiej poznane są mechanizmy zależne od receptora Fas (CD95, Apo1), dla którego ligandem jest rozpuszczalna forma Fas-L i receptora TNF-R1, dla którego ligandem jest TNF- α . Interakcje Fas/Fas-L powodują zmiany konformacyjne domeny DD. Dzięki temu re-

Tabela I. Różnice między apoptozą a nekrozą

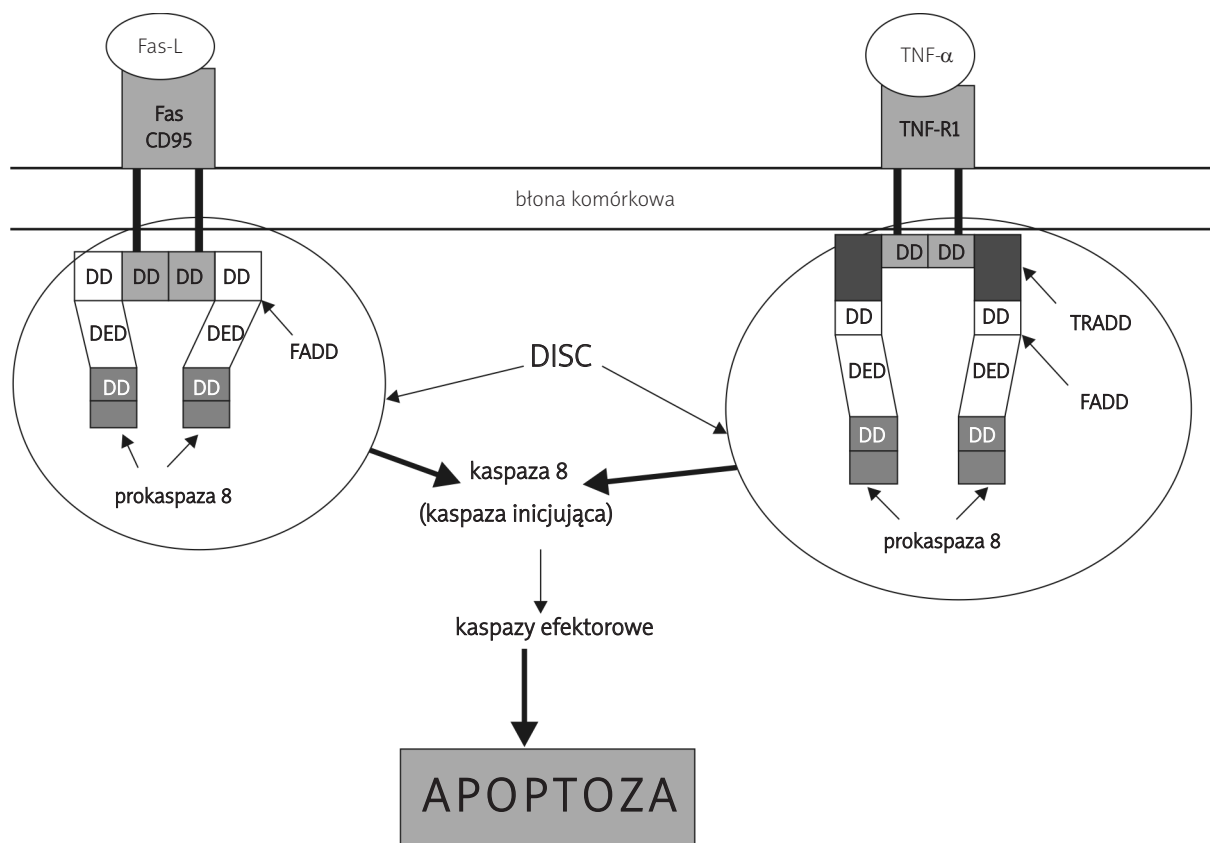
	Apoptoza	Nekroza
Sposób eliminacji komórek	programowana, genetycznie kontrolowana śmierć komórki	chaotyczny model śmierci komórki
Czas	śmierć komórki jest procesem wieloetapowym, ale szybko zachodzącym	śmierć komórki w bardzo krótkim czasie (kilka minut)
Nakłady energii	proces czynny, endoenergetyczny	nie wymaga nakładu energii
Przebieg procesu	obkurczanie jądra i całej komórki, zagęszczanie i fragmentacja DNA; zmniejszenie objętości cytoplazmy i kondensacja materiału genetycznego; degradacja DNA i pofałdowanie błony komórkowej; powstanie i uwolnienie ciałek apoptotycznych (zachowanie ciągłości błony komórkowej)	utrata integralności błony cytoplazmatycznej; pęcznienie komórki i powstanie jądra pyknotycznego; dezintegracja błony komórkowej; obrzęk mitochondriów, fragmentacja błony cytoplazmatycznej, uwolnienie zawartości komórek do otaczającego środowiska pozakomórkowego
Wpływ na otaczające komórki	ciątka apoptotyczne są szybko fagocytowane przez makrofagi i sąsiadujące komórki	obecność produktów rozpadu komórki może uszkadzać sąsiadujące komórki
Odpowiedź organizmu	nie dochodzi do uruchomienia mechanizmów odpowiedzi zapalnej	wywołanie reakcji obronnej organizmu z wywołaniem reakcji zapalnej

ceptor Fas łączy się z białkiem adaptorowym (ang. *fas-associated protein with death domain*, FADD) zawierającym również sekwencję DD, za pomocą której wiąże się z receptorem Fas. Białko FADD zawiera domenę DED (ang. *death effector domain*), do której przyłącza się za pomocą swojej domeny śmierci prokaspaza 8. Powstaje kompleks sygnalizujący apoptozę – DISC (ang. *death inducing signalling complex*), w obrębie którego dochodzi do przekształcenia prokaspazy 8 w aktywny enzym. TNF-R1 po połączeniu z TNF- α łączy się z TRADD (ang. *TNF-R1 associated death domain*). TRADD przekazuje sygnał do apoptozy pośrednio, przez wiązanie FADD, do którego, podobnie jak poprzednio, przyłącza się prokaspaza 8. Tworzy się DISC, w obrębie którego powstaje aktywna kaspaza 8, aktywująca następnie kaspazy efektorowe. Przebieg inicjacji apoptozy drogą zewnątrzpochodną przedstawia Rycina 1.

Faza inicjacji i przekazywania sygnału drogą wewnątrzpochodną (mitochondrialną)

Na szlaku wewnątrzpochodnym apoptozy za decyzje o śmierci komórki odpowiedzialne są mitochondria [5]. Wśród czynników indukujących mitochondrialny szlak apoptozy wy-

mienia się: wzrost reaktywnych form tlenu (RFT), wzrost stężenia jonów wapnia, czynniki zaburzające transport elektronów, uszkodzenia DNA, szok termiczny czy brak czynników wzrostu. Powyższe czynniki indukują szereg zmian, wśród których za wczesne uznaje się otwieranie porów mitochondrialnych, tzw. megakanatów. Są to leżące w miejscach styku zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej kompleksy białkowe składające się z translokatora nukleotydu adeninowego (ANT), napięciozależnego kanału anionowego (VDAC) i cyklofiliny D [6]. Otwarcie megakanatów prowadzi do obniżenia potencjału transbłonowego, co jest pierwszym sygnałem inicjacji apoptozy drogą wewnątrzpochodną [5]. Konsekwencją jest pęcznienie mitochondrium i pęknięcie błony zewnętrznej. Z przestrzeni międzybłonowej do cytozolu uwalniane są białka promujące śmierć komórki, m.in. cytochrom c, AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) czy prokaspazy 2, 3, 9. Uwolniony do cytoplazmy cytochrom c jest głównym czynnikiem promującym mitochondrialną kaskadę aktywacji. W obecności dATP łączy się z obecnym w cytoplazmie czynnikiem Apaf-1, co prowadzi do zmiany jego konformacji i w efekcie odstonięcia domeny werbunku kaspaz (ang. *caspase and RIP adapter with death domain*, CARD).



Rycina 1. Faza inicjacji i przekazywania sygnału drogą zewnątrzpochodną

DD – domena śmierci (ang. *death domain*), DED – ang. *death effector domain*, DISC – kompleks sygnalizujący apoptozę (ang. *death inducing signaling complex*), FADD – ang. *fas associated protein with death domain* (białko adaptorowe), TRADD – TNF-R1 associated death domain (białko adaptorowe)

Z domeną CARD łączy się prokaspaza 9, w wyniku czego powstaje kompleks zwany apoptosomem. W obrębie apoptosomu dochodzi do aktywacji prokaspazy 9, która z kolei na drodze proteolizy uaktywnia prokaspazy efektorowe. Przebieg inicjacji apoptozy drogą wewnątrzpochodną przedstawia Rycina 2.

W regulacji mitochondrialnej drogi aktywacji apoptozy biorą udział białka błonowe należące do rodziny Bcl-2, które znajdują się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Członkowie tej rodziny mogą zarówno indukować (Bax, Bak, Bid, Bad, Bag i in.), jak i hamować (Bcl-2, Bcl-xL, Bod, Bim) apoptozę poprzez regulację przepuszczalności błony mitochondrialnej [7]. Białka antyapoptotyczne są zdolne tworzyć, natomiast białka proapoptotyczne uniemożliwiają tworzenie kanałów jonowych, zapewniających utrzymanie elektrochemicznej homeostazy [8]. Mogą stabilizować zewnętrzną błonę mitochondrialną poprzez modulację przepływu jonów przez kanały jonowe, a tym samym hamować tworzenie megakanałów i uwalnianie cytochromu c. Natomiast białka proapoptotyczne ulegają translokacji do wewnętrznej warstwy błony mitochondrialnej, gdzie w połączeniu z VDAC tworzą megakanały, przez które dochodzi do ucieczki cytochromu c.

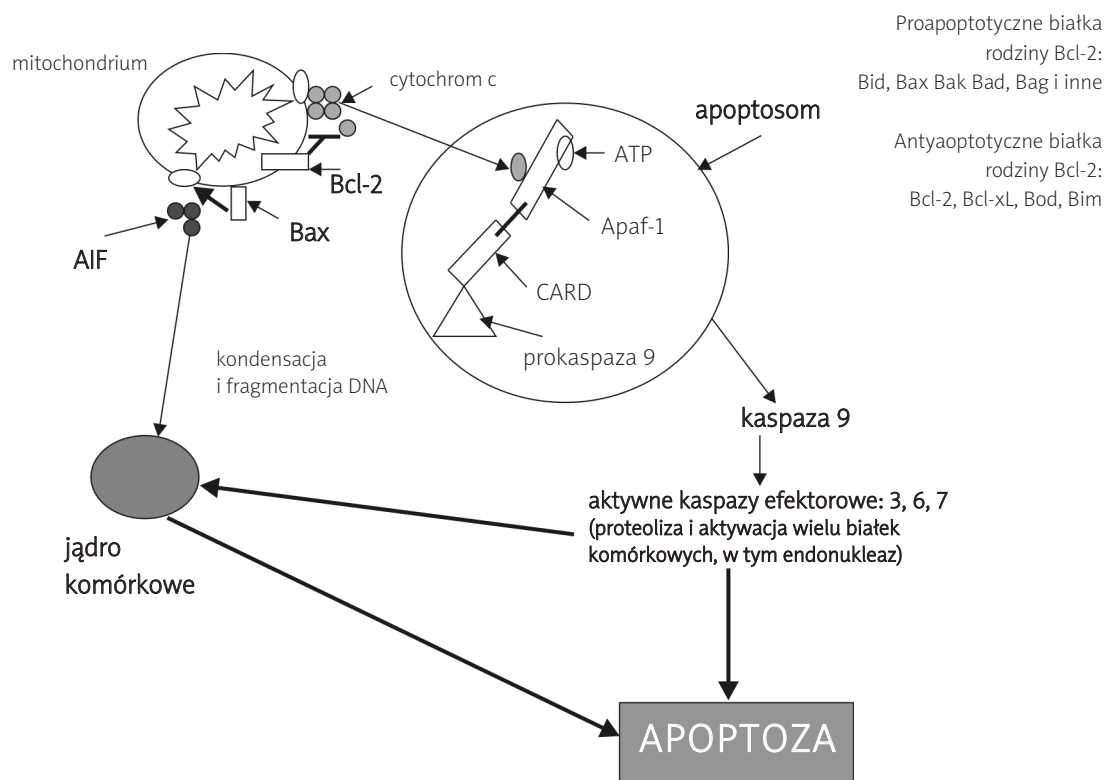
Jak wspomniano wcześniej, zmiany w przepuszczalności błony mitochondrialnej są związane również z uwalnianiem czynnika AIF. Jest to flawoproteina o właściwo-

ściach oksydoreduktazy, która w zdrowych komórkach jest zlokalizowana w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Uwolniony z mitochondriów AIF wędruje do jądra, gdzie wiążąc się z DNA, wywołuje niezależną od kaspaz kondensację i fragmentację DNA [9].

Ostatnie badania sugerują, że szlaki zewnątrz- i wewnątrzpochodny nie są całkowicie niezależne od siebie [5]. Powstająca w szlaku zewnątrzpochodnym kaspaza 8 może aktywować zlokalizowane w błonie zewnętrznej mitochondriów białko Bid. Bid ulega proteolizie pod wpływem kaspazy 8, co prowadzi do jego aktywacji. Aktywne białko Bid działa hamująco na Bcl-2, przez co promuje uwalnianie cytochromu c i uruchomienie szlaku wewnątrzpochodnego.

Faza wykonawcza

Drugim etapem zaprogramowanej śmierci komórki jest faza wykonawcza. Podczas jej przebiegu zostaje nieodwracalnie i ostatecznie uruchomiony program śmierci komórki. Białkami fazy wykonawczej są proteazy serynowe zwane kaspazami. Są syntetyzowane jako nieaktywne proteazy i aktywowane na drodze proteolitycznej poprzez odcięcie od zymogenu takiego fragmentu, który blokuje aktywność enzymu [5, 10]. Jako aktywne enzymy mają zdolność do rozrywania wiązania peptydowego leżącego bezpośred-



Rycina 2. Faza inicjacji i przekazywania sygnału drogą wewnątrzpochodną

AIF – ang. apoptosis inducing factor, CARD – domena werbunku kaspaz (ang. caspase and RIP adapter with death domain)

nio za kwasem asparaginowym. Są uważane za główne enzymy „maszyny proteolitycznej” apoptozy. Powstałe w pierwszym etapie kaspazy inicjujące aktywują kaspazy efektorowe (kaspazy: 3, 6 i 7). Wydaje się, że główną kaspazą efektorową jest kaspaza 3.

Aktywacja kaspaz efektorowych prowadzi do selektywnej i uporządkowanej degradacji białek strukturalnych i enzymatycznych, dając w końcowym efekcie inaktywację białek, które są istotne dla życiowych funkcji komórek [10, 11]. Enzymy te rozrywają połączenia między komórkami, dezorganizując cały cytoskielet poprzez zniszczenie aktyny oraz filamentów pośrednich, co jest powodem charakterystycznych zmian morfologii komórek apoptotycznych. Natomiast zniszczenie lamininy uszkadza błonę jądrową. Degradacja białkowej kinazy DNA (uczestniczy w wykrywaniu uszkodzeń jądrowego DNA) i polimerazy (poli ADP) rybozy – PARP (bierze udział w rozpoznawaniu i naprawie uszkodzeń DNA) uniemożliwia proces naprawy uszkodzonego DNA. Swoistym substratem dla kaspaz jest czynnik fragmentacji DNA – DFF (ang. *DNA fragmentation fragment*), który aktywuje endonukleazy, enzymy degradujące DNA na fragmenty polinukleosomalne, a dalej na małe fragmenty oligonukleosomalne [11]. Główną endonukleazą jest CAD (ang. *caspase-activated DNAase*). Występuje ona w postaci nieaktywnej, związanej z podjednostką inhibitorową. Swą nukleolityczną aktywność ujawnia dopiero po zadziałaniu kaspazy 3 lub 7, które usuwają sekwencję inhibitorową. Dzięki działaniu endonukleaz obserwujemy jedną z najbardziej znanych i charakterystycznych cech komórek apoptotycznych, którą jest obecność w nich po-fragmentowanego na odcinki DNA, wykrywanego podczas elektroforezy na żelu jako „drabinki”.

Inną znaną cechą charakterystyczną apoptozy jest utrata asymetrii błony komórkowej w wyniku przemieszczenia się jednego z fosfolipidów – fosfatydyloseryny – z warstwy wewnętrznej na powierzchnię błony plazmatycznej, co można ocenić za pomocą barwienia aneksyną V [12]. Dzieje się tak dlatego, że już we wczesnych etapach fazy efektorowej dochodzi do hamowania enzymu utrzymującego asymetrię błony komórkowej.

Faza degradacji i usuwania ciałek apoptotycznych

Ostatnią fazą w kaskadzie reakcji procesu apoptozy jest faza degradacji. W jej wyniku fragmenty materiału jądrowego, cytoplazmy i zachowanych organelli są upakowywane i otaczane fragmentami błony komórkowej – powstają ciała apoptotyczne [13]. Aktywność tkankowej transglutaminazy zapewnia stabilizację błony umierającej komórki i ciałek apoptotycznych. Powstające ciała apoptotyczne usuwane są poprzez ich specyficzne rozpoznawanie i fagocytozę przez makrofagi lub inne otaczające je komórki. Ligandem dla swoistego rozpoznawania ciałek apoptotycznych może być fosfatydyloseryna, znajdująca się na ich powierzchni w wyniku utraty asymetrii błony komórkowej [14]. Chroni to organizm przed uruchomieniem

mechanizmów odpowiedzi zapalnej. Dodatkowo, komórki w trakcie apoptozy uwalniają reaktywne formy tlenu, które mogą indukować peroksydację fosfolipidów błony komórkowej. Wykazano, że komórki podlegające apoptozie zawierają w swojej błonie komórkowej epitopy, podobne do zmodyfikowanych oksydacyjnie LDL [13]. Te epitopy stają się ligandami do ich rozpoznawania i fagocytozy przez makrofagi za pomocą receptorów wymiatających (ang. *scavenger receptors*).

Rola białka p53 w regulacji apoptozy

Nadrzędną rolę w regulacji procesu apoptozy odgrywa gen *p53*. Jest to gen supresorowy, który kontroluje normalny wzrost i stabilność genomu [15, 16]. Świadczy o tym fakt, że mutacje tego genu są związane z większością chorób nowotworowych. Produktem genu *p53* jest białko p53, które jest głównym regulatorem cyklu komórkowego. W prawidłowej komórce poziom p53 jest niski, a jego dramatyczny wzrost obserwuje się po uszkodzeniu DNA czy też wywołaniu innych form stresu. W sytuacji uszkodzenia DNA indukcji genu *p53* towarzyszy zwiększona synteza i fosforylacja białka p53. Białko to decyduje o losie komórki; ma zdolność zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 lub skierowania go na drogę apoptozy, zależnie od stopnia uszkodzenia materiału genetycznego. Białko p53 wiąże się bezpośrednio z uszkodzonym DNA i działa jako czynnik transkrypcyjny, indukujący transkrypcję wielu genów. Ich produkty hamują podziały komórkowe, uczestniczą w naprawie DNA lub stymulują produkcję białek niezbędnych w apoptozie. W razie uszkodzenia DNA białko p53 zatrzymuje komórkę w fazie G1 poprzez wpływ na gen *p21* i pozwala na naprawę uszkodzeń DNA. Jeżeli naprawa uszkodzonego DNA jest niemożliwa, to białko p53 indukuje proces apoptozy, dzięki któremu komórka umiera i nie popetnia błędów. Białko p53 aktywuje proces apoptozy poprzez nasilenie ekspresji proapoptotycznego białka Bax. Jednocześnie blokuje gen *Bcl-2*, a tym samym zmniejsza ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2. Ponadto, stymuluje ekspresję receptora Fas na błonie komórkowej.

Rola genu *p53* jest dobrze poznana w aspekcie wielu chorób nowotworowych. Ostatnie badania wskazują na udział p53 w regulacji komórek obecnych w zaawansowanej zmianie miażdżycowej [17]. Zwiększoną ekspresję i fosforylację tego białka w połączeniu z oksydacyjnym uszkodzeniem DNA i jednoczesną aktywacją dróg naprawy tych uszkodzeń stwierdzono w zaawansowanej zmianie miażdżycowej [18]. Powyższe obserwacje sugerują, że to uszkodzenia DNA są odpowiedzialne za zwiększenie ekspresji p53. Rzeczywiście markery uszkodzenia DNA obecne są zarówno w komórkach krążących we krwi osób z miażdżycą, jak i komórkach obecnych w zmianie miażdżycowej [19]. Ponadto stopień uszkodzenia DNA koreluje z nasileniem miażdżycy u zwierząt doświadczalnych. Z wielu badań cytowanych w pracy wynika, że stwierdzone w płytce miażdżycowej p53 hamuje proliferację komór-

rek mięśni gładkich i jednocześnie promuje ich apoptozę. Niemniej wyniki pochodzące z badań przeprowadzonych na zwierzęcym modelu doświadczalnym miażdżycy u myszy pozbawionych jednocześnie genu *p53* są niejednoznaczne i kontrowersyjne. Sytuacja została częściowo wyjaśniona dzięki opublikowanym ostatnio wynikom badań [18], z których wynika, że u myszy *p53^{-/-}/ApoE^{-/-}* w porównaniu z myszami *ApoE^{-/-}* zwierającymi gen *p53* zmiany miażdżycowe powstawały szybciej. Stwierdzono jednocześnie nasilenie szybkości proliferacji i zmniejszenie tempa apoptozy. Głównymi komórkami proliferującymi były monocyty/makrofagi, natomiast apoptoza dotyczyła w równym stopniu komórek mięśni gładkich i makrofagów. Przeszczep komórek szpiku zawierających *p53* prowadził do osłabienia formowania zmiany miażdżycowej, ale także znacznej redukcji apoptozy. Na podstawie tych wyników i analizy danych z literatury autorzy sformułowali następujące wnioski dotyczące roli *p53* w patogenezie miażdżycy: endogenny *p53* chroni komórki mięśni gładkich przed apoptozą, po części poprzez promowanie naprawy DNA, natomiast wzrost ekspresji *p53* powyżej poziomów podstawowych indukuje ich apoptozę. Wpływ na makrofagi jest nieco inny. Zarówno endogenne, jak i podwyższone poziomy *p53* promują apoptozę makrofagów, natomiast brak *p53* może prowadzić do ich nekrozy.

Apoptoza komórek śródbłonka

Śródbłonek pokrywający naczynia w miejscach predysponowanych do rozwoju miażdżycy charakteryzuje się zwiększonym *turnover*, co sugeruje istnienie bezpośrednio zależności pomiędzy zwiększoną umieralnością i powstawaniem nowych komórek a podatnością na rozwój zmiany miażdżycowej. Uważa się, że zwiększony *turnover* komórek śródbłonka jest wynikiem nasilenia procesu apoptozy [20]. Zmiany miażdżycowe zlokalizowane są najczęściej w miejscach rozgałęzień i rozwidleń naczyń, czyli w miejscach z turbulentnym lub zwolnionym przepływem krwi. Obserwuje się tam osłabienie lub brak sił hemodynamicznych, takich jak: siły rozciągania (ang. *stretch stress*) i siły ścinania (ang. *shear stress*). W wielu badaniach wykazano, że takie warunki stymulują apoptozę komórek śródbłonka [21]. Natomiast szybki laminarny przepływ krwi hamuje apoptozę stymulowaną innymi czynnikami proaterogennymi. Siły ścinania, podobnie jak przepływ laminarny, mogą wywierać swoje działanie antyapoptotyczne poprzez stymulację uwalniania NO, zwiększenie potencjału antyoksydacyjnego oraz wpływ na transkrypcję i ekspresję genów czynników wzrostowych [22]. Wpływ NO na apoptozę śródbłonka zależy od jego stężenia w komórce [22, 23]. W stężeniach fizjologicznych tlenek azotu zapobiega apoptozie. W zdrowych naczyniach fizjologiczne stężenia pojawiają się w wyniku działania endotelialnej syntazy NO (eNOS), której głównym aktywatorem są siły ścinania. Antyapoptotyczne działanie NO może się odbywać poprzez aktywację kinaz zależnych od cGMP, co pro-

wadzi do zahamowania apoptozy. Ponadto, tlenek azotu powoduje nitrozylację kaspaz, co prowadzi do ich inaktywacji. W miażdżycy obserwujemy inną sytuację. Dochodzi wówczas do zwiększonej produkcji NO poprzez indukowaną syntazę NO (iNOS), znajdującą się w makrofagach fagocytyzujących zmodyfikowane formy LDL. Produkowane przez makrofagi wolne rodniki tlenowe tworzą z NO nad-tlenoazotyn, który jest źródłem rodników hydroksylowych. Zarówno NO, jak i rodniki hydroksylowe niszczą strukturę DNA i prowadzą do modyfikacji wielu białek, w tym enzymów łańcucha oddechowego. Może to być przyczyną indukcji apoptozy w tych komórkach.

Pierwsze doniesienia o możliwości indukcji apoptozy w komórkach śródbłonka pojawiły się na początku lat 90. Robaye i wsp. [24] wykazali, że TNF może indukować apoptozę tych komórek. Jak wiemy, TNF- α jest cytokiną prozapalną, której głównym źródłem są makrofagi. TNF- α indukuje apoptozę głównie poprzez aktywację receptorów śmierci i tym samym uruchomienie szlaku zewnątrzpochodnego

Z przeprowadzonych dotychczas badań *in vitro* wynika, że większość uznanych czynników ryzyka miażdżycy może indukować apoptozę komórek śródbłonka.

Oksy-LDL, które odgrywają główną rolę w patogenezie miażdżycy, mogą promować apoptozę poprzez wpływ na wiele mechanizmów regulujących tę zaprogramowaną śmierć komórki [13, 22, 23]. Stymulują apoptozę zarówno poprzez wpływ na szlak zewnątrz-, jak i wewnątrzpochodny. Działanie oksy-LDL na drodze receptorowej polega na zwiększeniu wrażliwości receptorów Fas na sygnały indukujące apoptozę. Wpływ oksy-LDL na szlak mitochondrialny zaznacza się w obrębie megakanatów w błonie mitochondrialnej. Zmienia się także stężenie wapnia w komórce. Dochodzi do uwalniania cytochromu c, powstania apoptosomu i aktywacji kaspazy 3. Proapoptotyczne działanie oksy-LDL może być również wynikiem ich wpływu na Bcl-2. Pod wpływem oksy-LDL zmniejsza się ekspresja antyapoptotycznego białka Bcl-2, bez wyraźnych zmian stężenia proapoptotycznego Bax. Ponadto oksy-LDL aktywują białko *p53* [25]. W płytce miażdżycowej oksy-LDL mogą zwiększać wrażliwość komórek śródbłonka na apoptozę poprzez hamowanie eNOS i tym samym zmniejszenie syntezy i uwalniania tlenu azotu.

Jednym z czynników patogenetycznych miażdżycy jest nasilenie stresu oksydacyjnego, a powstające w nadmiarze RFT są silnymi induktorami apoptozy. Indukcja apoptozy przez RFT została potwierdzona w badaniach, w których wykazano zahamowanie wywołanej oksysterolami apoptozy za pomocą przeciwutleniaczy, takich jak N-acetylocysteina czy witaminy E i C. W mediowanej RFT indukcji apoptozy dochodzi także do aktywacji białka *p53* [25].

Cukrzyca jest uznany za czynnik ryzyka miażdżycy. W badaniach *in vitro* wykazano, że wysokie stężenia glukozy indukują apoptozę komórek śródbłonka poprzez wpływ na aktywację kaskady kaspaz [27]. Z opublikowanych ostat-

nio danych wynika, że również homocysteina indukuje apoptozę w komórkach śródbłonna poprzez wpływ na aktywność kaspazy-3 [28]. Kolejnym czynnikiem indukującym apoptozę komórek śródbłonna jest angiotensyna II, substancja o silnych właściwościach promiażdżycowych [29].

Jak wynika z przedstawionych faktów, wiele czynników patogenetycznych miażdżycy oraz sytuacje promujące rozwój i progresję miażdżycy mogą indukować apoptozę komórek śródbłonna. Czy tak jest rzeczywiście *in vivo*? Należy przypuszczać, że jest to uzależnione od nasilenia działania czynników zarówno proapoptotycznych, jak i antyapoptotycznych. Może to zależeć od stężenia HDL, którym przypisuje się korzystne działanie w miażdżycy. Badania Suca i wsp. [30] wykazały, że HDL, a w szczególności apolipoproteina A, hamują stymulowaną oksy-LDL apoptozę komórek śródbłonna poprzez wpływ na uwalnianie jonów wapnia do cytozolu. Rozmiary apoptozy w płytce miażdżycowej mogą zależeć także od rodzaju lokalnie wydzielanych cytokin. IL-10 jest cytokiną, która hamuje zapalenie i odgrywa istotną, protekcyjną rolę w rozwoju miażdżycy. Ostatnio wykazano, że obecność tej cytokiny w płytce miażdżycowej była związana z redukcją apoptozy [31]. Warunki antyapoptotyczne w płytce miażdżycowej mogą być także wynikiem prawidłowych interakcji komórka-komórka czy też komórka-macierz pozakomórkowa [13]. Ponadto, może to również zależeć od ilości obecnych w płytce miażdżycowej czynników wzrostowych, które działają antyapoptotycznie, oraz od warunków hemodynamicznych w krążeniu.

Apoptoza komórek mięśni gładkich

Apoptoza komórek mięśni gładkich może być indukowana przez wiele czynników i warunków obecnych w płytce miażdżycowej. Z badań *in vitro* wynika, że komórki mięśni gładkich pochodzących z ludzkiej zmiany miażdżycowej w porównaniu z komórkami zdrowych naczyń wolniej proliferują, szybciej się starzeją i wykazują wyższą podatność na apoptozę, co sugeruje, że istniejące w płytce warunki zmieniają ich fenotyp i podatność na działanie różnych mediatorów [32].

W zaawansowanej zmianie miażdżycowej, w pobliżu mięśni gładkich, stwierdza się duże ilości oksy-LDL [33]. Regiony te charakteryzują się wysoką ekspresją proapoptotycznego białka Bax i intensywną apoptozą komórek mięśni gładkich. Z badań *in vitro* wynika, że oksy-LDL mogą indukować apoptozę komórek mięśni gładkich poprzez wpływ na szlak receptorowy [34]. Aktywacji Fas/FasL towarzyszyła aktywacja kaskady kaspaz. Mogą także aktywować szlak mitochondrialny poprzez wpływ na białka z rodziny Bcl-2 [34]. Wykazano, że inkubacja komórek mięśni gładkich z oksy-LDL związana była ze zwiększeniem ekspresji proapoptotycznego białka Bax z jednoczesnym zmniejszeniem ekspresji antyapoptotycznego Bcl-2.

Apoptoza komórek mięśni gładkich w miażdżycy może być wynikiem interakcji z komórkami zapalnymi, które

na swej powierzchni mają ligandy dla receptorów śmierci oraz są źródłem proapoptotycznie działających cytokin. Obecne w zmianie miażdżycowej komórki mięśni gładkich mają na swej powierzchni Fas, natomiast makrofagi, limfocyty T oraz komórki śródbłonna mają FasL [33]. Badania przeprowadzone na wycinkach zmiażdżycowanych naczyń wykazały, że obecne w błonie wewnętrznej komórki mięśni gładkich zawierające na swojej powierzchni receptor Fas współistniały z apoptotycznymi komórkami mięśni gładkich w miejscach zawierających duże ilości makrofagów i limfocytów T. Tak więc apoptoza komórek mięśni gładkich z udziałem receptorów śmierci może zachodzić w miejscach, w których jest duża liczba komórek zapalnych. Inkubacja komórek mięśni gładkich z cytokinami, takimi jak INF- γ czy IL-1, związana była z indukcją ekspresji Fas i podwyższeniem wrażliwości na apoptozę [35]. Cytokiny wydzielane przez makrofagi i limfocyty T mogą działać poprzez zwiększenie wydzielania NO, który może zabijać komórki mięśni gładkich poprzez wpływ na szlak mitochondrialny [33].

Niedostatek lub upośledzenie dostępu czynników wzrostu może być również silnym induktorem apoptozy komórek mięśni gładkich. Takim przykładem może być IGF-1 (ang. *insulin-like growth factor-1*), który jest czynnikiem antyapoptotycznym dla tych komórek [36]. Aktywacja receptora dla tego czynnika hamuje indukowaną oksy-LDL apoptozę poprzez wpływ na uwalnianie cytochromu c. Działanie IGF-1 w komórkach mięśni gładkich pochodzących ze zmiany miażdżycowej może być osłabione, gdyż w komórkach tych stwierdza się obniżoną ekspresję receptora dla tego czynnika [37]. Warto podkreślić, że metaloproteinazy produkowane przez makrofagi mogą się przyczyniać do apoptozy komórek mięśni gładkich poprzez degradację składowych tkanki łącznej, od których te komórki otrzymują istotne sygnały do przeżycia [38].

Jak wspomniano wcześniej, białko p53 może być również zaangażowane w apoptozę komórek mięśni gładkich w miażdżycy. Pochodzące ze zmiany miażdżycowej komórki mięśni gładkich są bardziej podatne na apoptozę mediuowaną p53 [39]. Z badań przeprowadzonych na zwierzętach wynika, że wywołany dietą hipercholesterolową stres oksydacyjny doprowadzający do uszkodzenia DNA był związany ze wzrostem ekspresji p53 [40].

Apoptoza makrofagów

Apoptoza makrofagów widoczna jest we wszystkich stadiach miażdżycy i prawdopodobnie jest wynikiem oddziaływania wielu czynników, które są różne w zależności od stadium choroby. Na podstawie badań przeprowadzonych na kulturach komórkowych wyłoniono kilka możliwych czynników działających proapoptotycznie na makrofagi [41]. Mogą to być oksy-LDL, cytokiny zapalne, wysokie stężenia NO, niedostatek czynników wzrostowych czy wewnątrzkomórkowe nagromadzenie wolnego cholesterolu.

Uważa się, że za proapoptotyczne działanie oksy-LDL na makrofagi odpowiedzialne są zawarte w nich oksyste-

role [42]. Indukują apoptozę makrofagów poprzez wpływ na drogę mitochondrialną, którą uruchamiają poprzez zwiększenie napływu wapnia do cytozolu lub poprzez zwiększenie tworzenia RFT. Ponadto aktywują białka proapoptyczne Bad i Bim poprzez ich defosforylację z następczą translokacją do błony mitochondrialnej. Jednocześnie hamują ekspresję białek antyapoptycznych.

Z ostatnich badań wynika, że niektóre cytokiny produkowane przez obecne w zmianie miażdżycowej komórki zapalne mogą indukować apoptozę makrofagów. Taką cytokiną, produkowaną przez limfocyty T i obecną w płytce miażdżycowej, jest interferon γ (INF- γ), który hamuje syntezę DNA i indukuje apoptozę makrofagów [33]. Proapoptyczne działanie przypisuje się również IL-18 – cytokinie, której dużą ekspresję, zlokalizowaną w pobliżu makrofagów, stwierdza się w zaawansowanej zmianie miażdżycowej [33].

Silnym induktorem apoptozy makrofagów, szczególnie istotnym dla apoptozy tych komórek w zmianie zaawansowanej, jest akumulacja dużych ilości wolnego cholesterolu [42, 43]. We wczesnych etapach miażdżycy nie dochodzi do nadmiernej akumulacji cholesterolu, ponieważ z jednej strony w wyniku działania acetylotransferazy cholesterolu (ACAT) podlega on estryfikacji, z drugiej zaś strony przy sprawnie działającym mechanizmie *efflux* usuwany jest z komórki. W zmianie zaawansowanej dochodzi do stopniowego obniżania zawartości ACAT i upośledzenia usuwania cholesterolu z komórki z jednoczesnym jego nagromadzeniem zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowo. Z dotychczas przeprowadzonych badań [42, 43] wynika, że nadmierna akumulacja wolnego cholesterolu w makrofagach prowadzi do indukcji apoptozy zarówno drogą zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkową. Aktywacja drogi receptorowej związana była z aktywacją kaspazy 8, którą udało się zahamować poprzez zastosowanie przeciwciał anty-FasL. Już we wczesnych etapach akumulacji cholesterolu w makrofagach dochodziło do obniżenia potencjału transbłonowego mitochondriów, uwalniania cytochromu c i aktywacji kaspazy 9. Zaobserwowano także wzrost poziomu Bax zarówno w cytoplazmie, jak i w mitochondriach. Potwierdzeniem istotnej roli nagromadzenia wolnego cholesterolu w apoptozie makrofagów są badania przeprowadzone na myszach transgenicznych pozbawionych jednocześnie genu dla receptora LDL i genu dla ACAT [44]. U myszy tych dochodzi do nasilenia tworzenia zmian miażdżycowych, zwiększenia ilości wolnego cholesterolu, redukcji liczby makrofagów oraz nasilenia ich apoptozy.

Potencjalne znaczenie apoptozy w miażdżycy i pękaniu płytki miażdżycowej

Wyniki ostatnich badań sugerują, że apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki, odgrywa istotną rolę w progresji miażdżycy. Wykorzystując techniki barwienia wycinków naczyń w celu wykazania obecności cech apoptotycznych, stwierdzono, że w zmiażdżycowanej ścianie naczynia dochodzi do apoptozy obecnych tam komórek [13, 45, 46].

Proces ten nie występuje w zdrowych naczyniach. Komórki apoptotyczne stwierdza się już na poziomie pasm tłuszczowych, jednak największą intensywność apoptozy obserwuje się w zmianie zaawansowanej. Dystrybucja apoptozy w obrębie blaszki miażdżycowej nie jest jednolita. Najczęściej występuje w regionach z dużą ilością makrofagów, co sugeruje, że komórki te biorą udział w jej indukcji.

O ile śmierć komórek obecnych w zmianie miażdżycowej jest już sprawą oczywistą, to udział apoptozy tych komórek w progresji miażdżycy nie został do końca wyjaśniony. Podobnie jest w przypadku spekulacji na temat potencjalnej, szkodliwej lub korzystnej, roli apoptozy komórek blaszki w patogenezie i progresji miażdżycy. Zestawienie korzystnych i niekorzystnych następstw apoptozy komórek ściany naczynia przedstawia Tabela II.

Apoptozę komórek mięśni gładkich rozpatruje się jako zjawisko niekorzystne, gdyż może ona prowadzić do osłabienia czapeczki łącznotkankowej, a tym samym do powstawania niestabilnej zmiany predysponowanej do pęknięcia [22, 33, 34]. Blaszka miażdżycowa predysponowana do pęknięcia charakteryzuje się obecnością zwiększonej liczby makrofagów oraz zmniejszoną liczbą komórek mięśni gładkich, co sugeruje, że apoptoza komórek mięśni gładkich może być stymulowana przez makrofagi. W blaszkach miażdżycowych osób z niestabilną postacią choroby niedokrwiennej w porównaniu z jej postacią stabilną stwierdza się zwiększony poziom apoptozy komórek mięśni gładkich [47]. Pomimo że powyższe badania sugerują istnienie związku przyczynowego pomiędzy apoptozą komórek mięśni gładkich a pękaniem blaszki miażdżycowej, nadal nie ma wielu bezpośrednich dowodów na istnienie takiej zależności. Ostatnio opublikowane zostały badania przeprowadzone na zwierzęcym modelu doświadczalnym miażdżycy skonstruowanym tak, że możliwa była selektywna indukcja apoptozy komórek mięśni gładkich [48]. Z badań tych wynika, że apoptoza tych komórek związana jest z pojawieniem się wielu cech charakterystycznych dla płytki poddatnej na pęknięcie. Stwierdzono osłabienie czapeczki łącznotkankowej, powiększenie rdzenia nekrotycznego, utratę białek strukturalnych oraz intensywne miejscowe zapalenie. Ponadto w zmianie miażdżycowej stwierdzono duże ilości fragmentów ciałek apoptotycznych otoczonych makrofagami, co może świadczyć o upośledzeniu ich usuwania. Autorzy sugerują, że defekt ten prowadzi do wtórnej nekrozy, której następstwem może być zaobserwowana również zwiększona ekspresja MCP-1 (czynnik chemotaktyczny dla monocytów) oraz wzrost IL-6.

Wydaje się, że apoptoza makrofagów i limfocytów T powinna być zjawiskiem korzystnym, ze względu na usuwanie komórek odgrywających istotną rolę w progresji miażdżycy. Mogłoby to osłabić odpowiedź zapalną oraz obniżyć ilość metaloproteinaz, enzymów trawiących składowe tkanki łącznej czapeczki pokrywającej zmianę miażdżycową, a tym samym sprzyjałoby stabilizacji blaszki miażdżycowej.

Tabela II. Skutki apoptozy w miażdżycy

Korzystne skutki apoptozy	Szkodliwe skutki apoptozy
<ul style="list-style-type: none"> • jako proces fizjologiczny równoważy mitozę • ogranicza akumulację komórek • hamuje nadmierny rozwój warstwy wewnętrznej • ogranicza odpowiedź zapalną poprzez eliminację limfocytów T i makrofagów • jest procesem adaptacyjnym – poprzez eliminację szkodliwych/zbędnych komórek, bez naruszenia integralności ściany naczynia • stanowi czynnik stabilizujący blaszkę – zmniejsza pulę makrofagów i aktywność metaloproteinaz trawiących macierz pozakomórkową 	<ul style="list-style-type: none"> • doprowadza do zaniku czapeczki łącznotkankowej • poprzez usuwanie komórek mięśni gładkich prowadzi do obniżenia syntezy tkanki łączonej i destabilizuje blaszkę • apoptoza endotelium inicjuje erozję blaszki, promuje miejscową agregację trombocytów oraz wyzwolenie kaskady krzepnięcia • apoptoza makrofagów i komórek piankowatych z ich następczą nekrozą przyczynia się do wzrostu rdzenia lipidowego oraz formacji kaszki • jest źródłem chemotaktycznych, prokoagulacyjnych i stymulujących wzrost zmiany miażdżycowej ciałek apoptotycznych • zwiększa ryzyko autoimmunizacji • zwiększa właściwości prokoagulacyjne blaszki; fosfatydyloseryna ekspozycja podczas apoptozy znacznie wzmacnia aktywność czynnika tkankowego • ciała apoptotyczne, jeśli nie są skutecznie usuwane, mogą się gromadzić w obszarze rdzenia lipidowego, a związany z tym nadmiar jonów Ca^{2+} sprzyja kalcyfikacji blaszki, typowej dla stadium zaawansowanego

Znaczenie apoptozy makrofagów nie jest do końca jednoznaczne. Wydaje się, że jest w dużej mierze uzależnione od stadium zaawansowania zmiany miażdżycowej. Sugeruje się, że we wczesnych etapach miażdżycy apoptoza makrofagów jest zjawiskiem sprzyjającym stabilności płytki miażdżycowej [41]. Inaczej jest jednak w zaawansowanej zmianie. Apoptoza makrofagów w tym przypadku wydaje się zjawiskiem niekorzystnym i może się przyczyniać do progresji miażdżycy, między innymi dlatego że prowadzi do powstania pozakomórkowego rdzenia lipidowo-nekrotycznego. Jak wspomniano wcześniej, zmiana zaawansowana zawiera dużo więcej makrofagów podlegających apoptozie niż zmiana wczesna, co sugeruje, że we wczesnych etapach miażdżycy fagocytowanie komórek apoptotycznych jest wystarczające, a w zaawansowanych zmianach upośledzone. Jedną z przyczyn upośledzonego usuwania komórek apoptotycznych mogą być obecne w płytce miażdżycowej oksy-LDL, które przez kompetycyjne blokowanie receptorów dla komórek apoptotycznych hamują ich wyłapywanie przez fagocyty. Defektywna fagocytoza ciałek apoptotycznych prowadzi do ich nagromadzenia w blaszce miażdżycowej oraz nagromadzenia materiału o silnych właściwościach pobudzania reakcji immunologicznej [49]. Nieusunięte komórki apoptotyczne mogą ponadto podlegać wtórnej nekrozie i prowadzić do pozakomórkowej akumulacji lipidów i nasilenia odpowiedzi zapalnej.

Niewątpliwie apoptoza komórek śródbłonna jest zjawiskiem niekorzystnym i może być odpowiedzialna za transformację zmiany stabilnej w zmianę predysponowaną do pęknięcia [13, 23]. Apoptoza śródbłonna może

inicjować erozję blaszki miażdżycowej, co prowadzi do odstąpienia włókien kolagenu, a tym samym adhezji i agregacji płytek krwi. Do wnętrza blaszki miażdżycowej poprzez uszkodzone powłoki wdziera się krew i dochodzi, między innymi, do kontaktu z czynnikiem tkankowym (TF). Głównym źródłem obecnego w blaszce miażdżycowej TF są zaktywowane makrofagi. TF jest glikoproteiną, która aktywuje zewnątrzpochodny tor krzepnięcia i przyczynia się do tworzenia trombiny. Zarówno komórkowy, jak i pozakomórkowy TF jest głównym determinantem trombo-genności rdzenia lipidowego. Tak więc erozja blaszki miażdżycowej będąca wynikiem apoptozy komórek śródbłonna może prowadzić do tworzenia zakrzepu zamykającego światło naczynia, przyczyniając się tym samym do wystąpienia ostrych epizodów wieńcowych. Apoptoza komórek śródbłonna prowadzi do zmian ich fenotypu, czyli osłabienia naturalnych funkcji przeciwzakrzepowych, a tym samym do powstania środowiska sprzyjającego stanowi nadkrzepliwości [50]. Apoptoza komórek śródbłonna może promować zarówno lokalną, jak i systemową nadkrzepliwość. Komórki czy też ciała apoptotyczne, zawierające na swej powierzchni fosfatydyloserynę, uwalniają mikrofragmenty błon z dużą zawartością tego fosfolipidu o silnych właściwościach prozakrzepowych [13]. Mikrofragmenty te mogą następnie pojawiać się w krążeniu. Zwiększone poziomy krążących we krwi mikrofragmentów stwierdzone zostały w przypadku większości chorób naczyniowo-sercowych [51]. Podobnych obserwacji dokonano u osób z nadciśnieniem, otyłością i hipercholesterolemią.

Wydaje się, że najważniejsze znaczenie apoptozy w patogenezie miażdżycy, a szczególnie w wystąpieniu ostrych powikłań klinicznych, jest związane z nasileniem stanu nadkrzepliwości. Dotyczy to nie tylko komórek śródbłonna, ale także apoptozy innych komórek znajdujących się w blaszce miażdżycowej. Jest bowiem bardzo prawdopodobne, że niepodlegające natychmiastowemu usuwaniu ciała apoptotyczne czy znajdujące się w płytce miażdżycowej mikrofragmety błon, zawierające fosfatydyloserynę, mogą aktywować znajdujący się tam czynnik tkankowy. To z kolei mogłoby stwarzać idealne warunki do inicjacji kaskady krzepnięcia w momencie pęknięcia płytki miażdżycowej i ekspozycji rdzenia lipidowego na elementy wdzierającej się tam krwi. Potwierdzają to badania [52], w których wykazano, że apoptoza makrofagów jest istotnie wyższa w miejscach pęknięcia płytki miażdżycowej i tworzenia zakrzepu u osób, u których doszło do nagłej śmierci sercowej.

Z przedstawionych danych wynika, że apoptoza obecnych w płytce miażdżycowej komórek może być jednym z czynników patogenetycznych miażdżycy, przy czym wydaje się, że odgrywa ona przede wszystkim istotną rolę w pękaniu płytki miażdżycowej i powstawaniu zakrzepu, a tym samym wystąpieniu ostrych powikłań klinicznych. Podlegające apoptozie komórki śródbłonna mają silne właściwości prokoagulacyjne, co może sprzyjać powstawaniu zakrzepu, podczas gdy apoptoza komórek mięśni gładkich i makrofagów może nasilać odpowiedź zapalną oraz być przyczyną destabilizacji czapeczki pokrywającej zmianę miażdżycową. Niemniej należałoby stwierdzić, że nieznanym jest dokładny i rzeczywisty rozmiar wpływu apoptozy na te procesy. Miażdżycy jest chorobą o wieloczynnikowej patogenezie, dlatego niezbędne są badania prowadzone na zwierzęcym modelu pęknięcia blaszki miażdżycowej. Badania takie pozwoliłyby lepiej zrozumieć molekularne i komórkowe mechanizmy istotne dla wystąpienia ostrych powikłań miażdżycy i jednocześnie w przyszłości skuteczniej zapobiegać wystąpieniu ostrych epizodów naczyniowo-sercowych u ludzi.

Piśmiennictwo

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br Cancer* 1972; 26: 239-57.
- Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: 189-96.
- Nalepa G, Łukowska-Szczechowska E. Kaspazy i apoptoza: umrzyj i pozwól żyć. *Wiad Lek* 2002; 55: 100-6.
- Twomey C, McCarthy JV. Pathway of apoptosis and importance in development. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 345-59.
- Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31: 214-23.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998; 187: 1261-71.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-6.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997; 277: 370-2.
- Cande C, Cecconi F, Dessen P, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 2002; 115: 4727-34.
- Shi Y. Caspase activation, inhibition and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* 2004; 13: 1979-87.
- Lavrick IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 115: 2665-72.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51.
- Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 947-62.
- Drewa T, Olszewska D, Woźniak A. Znaczenie zaprogramowanej śmierci komórki w patogenezie chorób człowieka. *Pol Merk Lek* 2002; 70: 336-41.
- Mróz P, Młynarczyk I. Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowanie TRAIL w terapii nowotworów. *Post Biol Kom* 2003; 27: 527-68.
- Crow MT. Revisiting p53 and its effectors in ischemic heart injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 401-3.
- Mercer J, Bennett M. The role of p 53 in atherosclerosis. *Cell Cycle* 2006; 5: 1907-9.
- Martinet W, Knaapen M, De Mayer GR, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 106: 927-31.
- Mecer J, Mahmoudi M, Bennet M. DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease. *Mutat Res* 2007; 621: 75-86.
- Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9: 697-8.
- Kaiser D, Freyberg MA, Friedl P. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231: 586-90.
- Knock MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovas Res* 2000; 45: 736-46.
- Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, et al. Endothelial cell apoptosis: Biochemical characteristics and potential implication for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1673-90.
- Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, et al. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1991; 138: 447-53.
- Cheng J, Cui R, Chen CH, et al. Oxidized low-density lipoprotein stimulates p 53-dependent activation of apoptotic Bax leading to apoptosis of different endothelial progenitor cells. *Endocrinology* 2007; 148: 2085-94.
- Granville DJ, Shaw JR, Leong S, et al. Release of cytochrome c, Bax migration, Bid cleavage and activation of caspases 2, 3, 6, 7, 8, and 9 during endothelial cell apoptosis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1021-5.
- Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, et al. High-glucose triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1995; 44: 1323-7.
- Zhang C, Cai Y, Adachi MT, et al. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells

- through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 2001; 276: 35867-74.
29. Halkin A, Keren G. Potential indications for angiotensin-converting enzyme inhibitors in atherosclerotic vascular disease. *Am J Med* 2002; 112: 126-34.
 30. Suc I, Escargueil-Blanc I, Trolly M, et al. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2158-66.
 31. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 85: 17-24.
 32. Bennett MR, Macdonald K, Chan SW, et al. Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ Res* 1998; 82: 704-12.
 33. Kavurma MM, Bhindi R, Lowe HC, et al. Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 465-72.
 34. Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 469-75.
 35. Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, et al. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2200-8.
 36. Li Y, Higashi Y, Itabe H, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor activation inhibits oxidized LDL-induced cytochrome C release and apoptosis via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 2178-84.
 37. Patel VA, Zhang QJ, Siddle K, et al. Defect in insulin-like growth factor-1 survival mechanism in atherosclerotic plaque-derived vascular smooth muscle cells is mediated by reduced surface binding and signaling. *Circ Res* 2001; 88: 895-902.
 38. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-6.
 39. Bennett MR, Littlewood TD, Schwartz SM, et al. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circ Res* 1997; 81: 591-9.
 40. Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, et al. Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering. *Circ Res* 2001; 88: 733-9.
 41. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2255-64.
 42. Tabas I. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ* 2004; Suppl 1: S12-S16.
 43. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 2002; 110: 905-11.
 44. Fazio S, Major AS, Swift LL, et al. Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT 1 in macrophages. *J Clin Invest* 2001; 107: 163-71.
 45. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, et al. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 97: 2307-15.
 46. Lutgens E, de Muinck ED, Kitslaar PJ, et al. Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 473-9.
 47. Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, et al. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 480-8.
 48. Clarke M, Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *Am J Nephrol* 2006; 26: 531-5.
 49. Levine JS, Koh JS. The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen and accelerant. *Semin Nephrol* 1999; 19: 34-47.
 50. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, et al. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997; 89: 2429-42.
 51. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticle: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006; 48: 180-6.
 52. Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, et al. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol* 2000; 157: 1259-68.

Aliskiren – doustny inhibitor reniny

Aliskiren an oral direct renin inhibitor

Justyna M. Hermanowicz, Włodzimierz Buczko

Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny, Białystok

Streszczenie

Autorzy opisują właściwości farmakologiczne aliskirenu, pierwszego inhibitora reniny, który zwiększa możliwości terapeutyczne w leczeniu nadciśnienia tętniczego. W artykule opisano także farmakokinetykę leku po podaniu doustnym, jego interakcje z innymi lekami hipotensyjnymi oraz możliwości zastosowania aliskirenu w terapii. Z dotychczasowych obserwacji wynika, że aliskiren może być stosowany w leczeniu osób z nadciśnieniem tętniczym nietolerujących inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę czy blokerów receptora AT₁ dla angiotensyny.

Słowa kluczowe: aliskiren, inhibitor reniny

Abstract

The authors described the pharmacological properties of aliskiren – the first renin inhibitor. The pharmacokinetics of aliskiren after oral administration in humans, its interaction with other hypotensive drugs and therapeutic significance are also described. The present data indicate that aliskiren can be useful as an alternative tool in the treatment of hypertension in patients who do not tolerate converting enzyme inhibitors or angiotension AT₁ receptor blockers.

Key words: aliskiren, rennin inhibitor

Kardiol Pol 2008; 66, 9 (supl. 3): 358–361

Idea zablokowania układu renina-angiotensyna (RAS) istnieje od ponad 30 lat. Liczne grupy badaczy bezskutecznie próbowały znaleźć aktywny inhibitor reniny, który byłby podawany doustnie. Niestety, pierwsze generacje leków o takim mechanizmie działania nigdy nie zostały wprowadzone do leczenia. Niska biodostępność, szybka eliminacja oraz słaby efekt hipotensyjny uniemożliwiały ich kliniczne zastosowanie. Odkrycie w 2003 r. aliskirenu, pierwszego inhibitora reniny aktywnego po podaniu doustnym, było niewątpliwie wielkim sukcesem [1–5].

Aliskiren jest lekiem dobrze rozpuszczalnym w wodzie, o niskiej lipofilności [6, 3]. Mechanizm jego działania polega na hamowaniu układu renina-angiotensyna-aldosteron w punkcie aktywacji (Rycina 1). Blokuje on przekształcenie angiotensynogenu w angiotensynę I oraz zmniejsza stężenie angiotensyny I (Ang I) i angiotensyny II (Ang II) [3, 7, 8]. W przeciwieństwie do innych znanych leków hipotensyjnych (inhibitory enzymu konwertującego – ACE-I, antagoniści receptora angiotensyny – ARB), które powo-

dują kompensacyjne zwiększenie aktywności reninowej osocza (PRA), leczenie aliskirenem zmniejsza wartość PRA u chorych z nadciśnieniem tętniczym o ok. 50–80% [8, 9]. Wysoki poziom PRA wiąże się z ryzykiem wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych u chorych z nadciśnieniem, a także u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym krwi [8, 10, 11]. Po podaniu doustnym aliskiren obniża PRA oraz poziom angiotensyny I i angiotensyny II przez 48 godz. [12, 13]. W porównaniu z ARB silniej hamuje aktywność reniny [8, 9, 12, 14]. Aliskiren jest inhibitorem wysoce specyficznym. Duże powinowactwo do ludzkiej reniny związane jest z liczbą wiązań z centrum aktywnym enzymu [3, 7]. Wartość IC₅₀ (stała hamowania) dla czystej i osoczowej ludzkiej reniny wynosi ok. 0,6 nM/l [6]. U zdrowych osobników aliskiren w dawkach 40–640 mg wykazuje zależną od dawki redukcję aktywności reninowej osocza, poziomu Ang I i Ang II [8, 9].

Po podaniu doustnym aliskiren osiąga maksymalne stężenia w osoczu po 1–3 godz. [8, 12, 15–17] (Tabela I).

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Włodzimierz Buczko, Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny, ul. Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok, tel./faks: +48 85 748 56 01; e-mail: pharmdyn@umwb.edu.pl

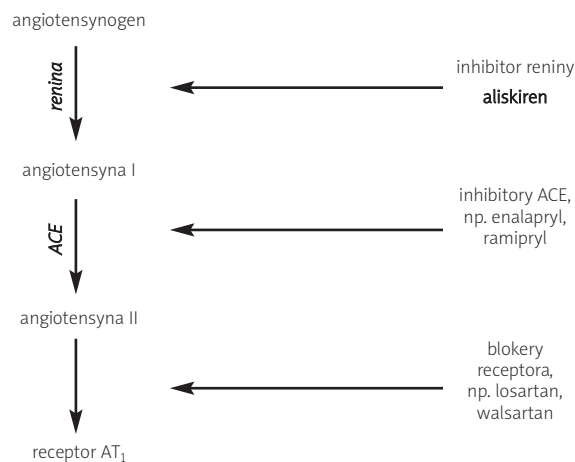
Aliskiren wykazuje niską biodostępność – ok. 2,5%, przyczyna tak słabej dostępności nie została dotąd wyjaśniona [13, 18–20]. Posiłki o dużej zawartości tłuszczu zmniejszają C_{max} o 85% oraz pole powierzchni pod krzywą (AUC) o 71% [24]. Okres półtrwania aliskirenu wynosi 23–70 godz. [3, 6, 8, 13, 19, 21–24]. Tak duże rozbieżności prawdopodobnie związane są z różną długością okresu między podaniem leku a pobraniem próbki do badań [14–17, 24, 25]. Stan stacjonarny w osoczu ustala się w ciągu 7–8 dni w przypadku podawania raz na dobę [8, 18]. Po podaniu dożylnym średnia objętość dystrybucji w stanie stacjonarym wynosi ok. 135 l, co wskazuje, że aliskiren jest w dużym stopniu dystrybuowany do przestrzeni pozanaczyniowej [6]. Lek ten wiąże się z białkami osocza w stopniu umiarkowanym (47–51%), niezależnie od stężenia [18, 22, 26]. Aliskiren jest metabolizowany w niewielkim stopniu (ok. 20%). Z badań *in vivo* wynika, że głównym enzymem odpowiedzialnym za jego metabolizm może być CYP 3A4 [13, 15, 16, 18, 19]. Aliskiren wydalany jest głównie z kałem w postaci niezmienionej [13, 22]. Po podaniu doustnym ok. 1/4 dawki jest wydalane z moczem w formie niezmetabolizowanej [8].

Aliskiren jest lekiem dobrze tolerowanym w różnych grupach wiekowych. Obserwuje się podobny spadek ciśnienia u osób powyżej 65. roku życia i u osób młodych [25]. Płeć, masa ciała, przynależność do grupy etnicznej nie mają istotnego wpływu na farmakokinetykę aliskirenu. Nie obserwuje się także większych różnic w farmakokinetyce aliskirenu między chorymi z cukrzycą typu 2 i zdrowymi ochotnikami [24, 27]. Sposób dawkowania aliskirenu u osób z zaburzeniami czynności wątroby i nerek nie musi być zmieniony. Stosowanie u dzieci nie jest wskazane ze względu na brak danych dotyczących bezpieczeństwa i skuteczności stosowania [8].

We wstępnej fazie badań aliskiren testowany był na zwierzętach. Z badań tych wynika, iż powoduje on zależną od dawki redukcję ciśnienia krwi u szczurów z nadciśnieniem. Nasila także hipotensyjny efekt innych podawanych równocześnie leków przeciwnadciśnieniowych [18, 20]. Badania na transgenicznym szczurach, których nerki produkowały ludzką reninę, wykazały, iż aliskiren obniża ciśnienie krwi, zmniejsza albuminurię, przerost serca, istotnie redukuje grubość ściany lewej komory oraz zwiększa przeżycie szczurów w porównaniu z osobnikami nieleczonego aliskirenem [28]. Aliskiren w minimalnych dawkach wykazuje także protekcyjne działanie narządowe, bez istotnego wpływu na ciśnienie [29]. Wyższe dawki leku znacząco obniżają ciśnienie tętnicze krwi oraz całkowicie eliminują śmiertelność testowanych zwierząt [29].

Tabela I. Parametry farmakokinetyczne aliskirenu

	Biodostępność	t_{max}	$t_{1/2}$	Stan stacjonarny	Wiązanie z białkami	Metabolizm	Wydalenie
Dorośli	2,5%	1–3 godz.	23–70 godz.	7–8 dni	47–51%	20% w wątrobie	głównie z kałem



Rycina 1. Uproszczony schemat punktów uchwytu leków blokujących układ RAS

Aliskiren jest skutecznym lekiem przeciwnadciśnieniowym. Jego wpływ oceniano w wielu badaniach z udziałem chorych z pierwotnym, łagodnym, umiarkowanym, a także ciężkim nadciśnieniem tętniczym. Badania trwały 6–52 tygodni, a głównym kryterium oceny skuteczności była zmiana ciśnienia tętniczego zarówno w fazie rozkurczu (DBP), jak i w fazie kurczenia się komór serca (SBP) [13]. Aliskiren badano nie tylko w monoterapii, ale także w skojarzeniu z innymi lekami hipotensyjnymi. W wieloośrodkowym, przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby, 8-tygodniowym badaniu z randomizacją, z udziałem 652 dorosłych chorych z nadciśnieniem, oceniano redukcję ciśnienia tętniczego po zastosowaniu aliskirenu w dawkach 150, 300 i 600 mg, irbesartanu w dawce 150 mg oraz placebo. Uzyskane wyniki wskazywały, iż trzy zastosowane dawki znacząco redukują DBP i SBP w porównaniu z placebo. Przeprowadzone badania wykazały również, że aliskiren w dawkach 300 i 600 mg silniej obniża ciśnienie rozkurczowe w porównaniu z irbesartanem [13, 18, 30].

Istnieją również doniesienia o przeciwwątrobowym działaniu aliskirenu. W badaniach *in vitro*, na pełnej krwi ludzkiej po podaniu aliskirenu w stężeniu terapeutycznym obserwowano znaczący wzrost poziomu AT-III. Nie odnotowano natomiast jego wpływu na pozostałe mediatory procesu hemostazy. Zmiany w stężeniach mediatorów następowały natomiast po zastosowaniu wyższych dawek leku. Przeciwwątrobowe właściwości aliskirenu wciąż jednak nie są wykorzystywane klinicznie, co wynika z braku dostatecznych danych oraz sprzeczności w działaniu leku na płytki krwi (hamowanie i aktywacja równocześnie) [31].

Oceniano również działanie aliskirenu w połączeniu z inhibitorem konwertazy (ramipryl), blokerem receptora angiotensyny (walsartan), beta-blokerem (atenolol), blokerem kanału wapniowego (amlodypina) oraz diuretykiem (hydrochlorotiazyd). Badania te wykazały, że aliskiren stosowany w terapii skojarzonej może powodować dodatkowy spadek ciśnienia tętniczego [8, 13, 26]. Stosowanie aliskirenu z innymi lekami hipotensyjnymi (ARB i hydrochlorotiazyd) umożliwia także zastosowanie niższych dawek tych leków w celu uzyskania pożądanego efektu hipotensyjnego [9]. Z przeprowadzonych badań wynika, iż terapia kombinowana daje lepsze efekty i jest lepiej tolerowana niż terapia pojedynczym lekiem.

Aliskiren nie wpływa na aktywność enzymów cytochromu P450, jest słabo metabolizowany przez CYP3A4, w umiarkowanym stopniu wiąże się z białkami, dlatego też stosunkowo rzadko wchodzi w interakcje z innymi lekami [15, 18, 19, 26]. Jest lekiem względnie bezpiecznym. Dotychczas nie odnotowano żadnych poważniejszych działań niepożądanych, do najczęstszych należy biegunka. Sporadycznie mogą wystąpić wysypka, bóle i zawroty głowy, zmęczenie, dolegliwości żołądkowe czy bóle pleców [8, 14, 18, 19]. Podobnie jak wszystkie leki wpływające na układ RAS, aliskiren może wywołać kaszel, a niekiedy nawet obrzęk naczynioruchowy. Przypadki takie zdarzają się niezwykle rzadko, u niewielu ponad 1% chorych przyjmujących aliskiren [8]. Podczas stosowania aliskirenu może wystąpić hiperkaliemia. Zwiększony poziom potasu częściej jednak obserwujemy w terapii skojarzonej z ACE-I, głównie u chorych na cukrzycę. Z tego względu u tych chorych wskazana jest rutynowa kontrola poziomu elektrolitów oraz funkcji nerek [8]. Przeciwwskazaniem do stosowania aliskirenu jest nadwrażliwość na lek oraz drugi i trzeci trymestr ciąży. Nie należy stosować go także u kobiet karmiących piersią oraz u osób z obustronnym zwężeniem tętnicy nerkowej [8, 18]. Zalecana dawka preparatu aliskirenu wynosi 150 mg raz na dobę w monoterapii lub w skojarzeniu z innymi lekami stosowanymi w nadciśnieniu tętniczym. Lek należy przyjmować podczas posiłku, mniej więcej o tej samej porze każdego dnia. U chorych, których ciśnienie tętnicze nie jest odpowiednio kontrolowane, dawkę można zwiększyć do 300 mg raz na dobę [8, 18].

Powszechnie wiadomo, iż choroby układu krążenia są olbrzymim problemem społecznym. Stanowią one jedną z głównych przyczyn przedwczesnych zgonów kobiet i mężczyzn na świecie.

Aliskiren jest lekiem nowej generacji, specyficznie blokującym układ RAS, o innowacyjnym mechanizmie działania i długim okresie półtrwania, zapewniającym proste dawkowanie (raz na dobę). W porównaniu z ACE-I i ARB oferuje on bardziej optymalną blokadę układu RAS oraz bardziej efektywne hamowanie produkcji Ang II. Z tego względu aliskiren wskazany jest między innymi w terapii chorób, w których głównym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój schorzenia jest angiotensyna II [3, 9, 19, 32, 33].

W dostępnej literaturze nie ma danych dotyczących odległych skutków terapii aliskirenem. Wszystkie dotychczas przeprowadzone badania potwierdzają skuteczność jego działania w leczeniu nadciśnienia, zarówno w monoterapii, jak i w terapii skojarzonej [19]. Aliskiren może być stosowany w leczeniu nie tylko nadciśnienia tętniczego, ale także nefropatii cukrzycowej, miażdżycy czy niewydolności serca [3]. Ponadto jest on stosunkowo bezpieczny dla osób z chorobami układu sercowo-naczyniowego i dysfunkcją nerek, gdyż wydalany jest przez wątrobę oraz rzadko reaguje z innymi lekami [33, 34]. Badania kliniczne wskazują, iż aliskiren może, podobnie jak inne inhibitory RAS, działać protekcyjne na serce i nerki [19, 35]. Doniesienia te wymagają jednak potwierdzenia w badaniach klinicznych przeprowadzonych na ludziach.

Biorąc powyższe pod uwagę, należy sądzić, iż aliskiren będzie alternatywą dla inhibitorów konwertazy angiotensyny i blokerów receptora dla angiotensyny w leczeniu osób nietolerujących tych leków. Jest to szczególnie ważne u chorych z cukrzycą, białkomoczem czy albuminurią [13, 19].

Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że aliskiren może już wkrótce dołączyć do innych leków szeroko stosowanych w leczeniu nadciśnienia tętniczego.

Piśmiennictwo

1. Fisher ND, Hollenberg NK. Renin inhibition: what are the therapeutic opportunities? *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 592-9.
2. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 1977; 196: 441-4.
3. Stanton A. Potential of renin inhibition in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003; 4: 6-10.
4. Wood JM, Cumin F, Maibaum J. Pharmacology of renin inhibitors and their application to the treatment of hypertension. *Pharmacol Ther* 1994; 61: 325-44.
5. Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 698-705.
6. Campbell DJ. Interpretation of plasma renin concentration in patients receiving aliskiren therapy. *Hypertension* 2008; 51: 15-8.
7. Müller DN, Luft FC. Direct renin inhibition with Aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 221-8.
8. Tecturna (aliskiren) tablets [prescribing information] East Hanover, NJ. *Novartis Pharmaceuticals Corporation* September 2007. <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/tekturna.pdf>. Accessed April 16, 2007
9. Bruckner A. Creighton University Drug Information Center-Drug Monograph Aliskiren Novartis 2007.
10. Alderman MH, Cohen HW, Sealey JE, Laragh JH. Plasma renin activity levels in hypertensive persons: their wide range and lack of suppression in diabetic and in most elderly patients. *Am J Hypertens* 2004; 17: 1-7.
11. Alderman MH, Ooi WL, Cohen H, et al. Plasma renin activity: a risk factor for myocardial infarction in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1997; 10: 1-8.
12. Azizi M, Menard J, Bissery A, et al. Pharmacologic demonstration of the synergistic effects of a combination of the renin inhibitor aliskiren

- and the AT₁ receptor antagonist valsartan on the angiotensin II -renin feedback interruption. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 3126-33.
13. Oral renin inhibitors. *Lancet* 2006; 368: 1449-56.
 14. Opril S, Yarows SA, Patel S, et al. Efficacy and safety of combined use of aliskiren and valsartan in patients with hypertension: a randomized, double-blind trial. *Lancet* 2007; 370: 221-9.
 15. Nussberger J, Wuerzner G, Jensen Ch, Brunner HR. Angiotensin II suppression in human by the orally active renin inhibitor aliskiren (SPP 100) comparison with enalapril. *Hypertension* 2002; 39: 1-8.
 16. Vaidyanathan S, Jermay J, Yeh Ch, et al. Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, exhibits similar pharmacokinetics and pharmacodynamics in Japanese and Caucasian subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62: 690-8.
 17. Vaidyanathan S, Limoges D, Yeh C, Dieterich H. Aliskiren, an orally effective renin inhibitor, shows dose linear pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79 (suppl): P64.
 18. Cada DJ, Levien T, Baker DE. Aliskiren. *Hospital Pharmacy* 2007; 42: 737-98.
 19. Cheng JW. Aliskiren: renin inhibitor for hypertension management. *Clin Ther* 2008; 30: 31-47.
 20. Wood JM, Schnell, Christian R, et al. Aliskiren, a novel, orally effective renin inhibitor, lowers blood pressure in marmosets and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005; 23: 417-26.
 21. Ferro A, Gilbert G, Krum H. Importance of renin in blood pressure regulation and therapeutic potential of renin inhibition. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 577-81.
 22. Waldmeier F, Glaenzel U, Wirz B, et al. Absorption, distribution, metabolism and elimination of direct renin inhibitor aliskiren in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1418-28.
 23. Wuerzner G, Azizi M. Renin inhibition with aliskiren. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35: 426-30.
 24. Zhao C, Vaidyanathan S, Yeh CM, et al. Aliskiren exhibits similar pharmacokinetics in healthy volunteers and patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45: 1125-34.
 25. Vaidyanathan S, Reynolds Ch, Yet CM, et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of the novel oral direct renin inhibitor aliskiren in elderly healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2007; 47: 453-60.
 26. Vaidyanathan S, Valencia J, Kemp C, et al. Lack of pharmacokinetic interaction of aliskiren a novel direct renin inhibitor for the treatment of hypertension with the antihypertensive amlopine, valsartan, hydrochlorothiazide (HCTZ) and ramipril in healthy volunteers. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 1343-56.
 27. Vaidyanathan S, Zhao C, Yeh CM, Dieterich HA. Pharmacokinetics and safety of novel oral renin inhibitor aliskiren in patients with type 2 diabetes. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79: (suppl): P-12.
 28. Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, et al. Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension* 2005; 46: 569-76.
 29. Dechend R, Shagdarsuren E, Gratze P, et al. Lowdose renin inhibitor and lowdose AT₁-receptor blocker therapy ameliorate target organ damage in rats harbouring human renin and angiotensinogen genes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2007; 8: 81-4.
 30. Weir M, Bush C, Zhang J, et al. Antihypertensive efficacy and safety of the oral renin inhibitor aliskiren in patients with HTN. *Eur Heart J* 2006; 27 (suppl): 229.
 31. Serebruany VL, Malinin A, Barsness G, et al. Effects of aliskiren, a renin inhibitor, on biomarkers of platelet activity, coagulation and fibrinolysis in subjects with multiple risk factors for vascular disease. *J Hum Hypertens* 2008; 22: 303-10.
 32. Fischli W, Clozel JP, Breu V, et al. A renin inhibitor with increasing effects on chronic treatment. *Hypertension* 1994; 24: 163-9.
 33. Neuberg GW, Kukin ML, Penn J, et al. Hemodynamic effects of renin inhibition by enalkiren in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1991; 67: 63-6.
 34. Kiowski W, Beermann J, Rickenbacher P, et al. Angiotensinergic versus nonangiotensinergic hemodynamic effects of converting enzyme inhibition in patients with chronic heart failure. Assessment by acute renin and converting enzyme inhibition. *Circulation* 1994; 90: 2748-56.
 35. Sureshkumar KK, Vasudevan S, Marcus RJ, et al. Aliskiren: clinical experience and future perspectives of renin inhibition. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9: 825-37.

STRESZCZENIA

XIII SYMPOZJUM
SEKCJI KARDIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
KARDIOLOGICZNEGO

Słowo od Zarządu

1. Otrzymaliśmy 42 streszczenia, 26 z nich zakwalifikowano jako kardiologię eksperymentalną w badaniach podstawowych, pozostałe jako badania eksperymentalne w badaniach klinicznych.

Każde streszczenie zostało ocenione w skali 1–5 przez co najmniej trzech recenzentów. Średnie oceny znalazły się w zakresie 2,5–5,0. Taki rozkład ocen pozwolił na zakwalifikowanie wszystkich streszczeń do prezentacji ustnej.

Lista Recenzentów

Zbigniew Baj	Aldona Dembińska-Kieć	Michał Mączewski
Waldemar Banasiak	Krzysztof J. Filipiak	Włodzimierz Musiał
Andrzej Beręsewicz	Krzysztof S. Gołba	Krzysztof Narkiewicz
Włodzimierz Buczek	Jarostaw D. Kasprzak	Grzegorz Opolski
Krystyna Cedro-Ceremużyńska	Bohdan Lewartowski	Tomasz Siminiak
Ewa Chabielska	Urszula Mackiewicz	Ryszard Smoleński
Stefan Chłopicki	Barbara Malinowska	Wojciech Zaręba
Marek A. Deja	Marcin Malinowski	Tomasz Zdrojewski
	Walentyna Mazurek	

2. Inaugurujemy w tym roku Sesję Nagrody Zarządu Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK. Wezmą w niej udział autorzy sześciu najwyższej ocenionych streszczeń, których średnia ocen mieści w zakresie 4,6–5,0. Streszczenia te zostaną dodatkowo ocenione przez jury w czasie Sympozjum. Laureat zostanie wybrany na podstawie ostatecznej oceny, która będzie się składać z dwóch części:

- oceny recenzentów uzyskanej w procesie kwalifikacji (1–5) – 50%,
- oceny jury w czasie Sympozjum, obejmującej sposób prezentacji i jakość dyskusji (1–5) – 50%.

Lista streszczeń Sesji Nagrody Zarządu Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK ułożona wg rankingu recenzentów

586. The influence of channel openers NS1619 and CGS7184 as regulator of endothelial cells function

Iwona Stanisławska¹, Antonina Chmura-Skirińska², Magdalena Bartuś¹, Stefan Chłopicki¹, Adam Szewczyk²

¹Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

²Instytut Biologii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

609. Tkanka okotonaczyniowa tętnicy piersiowej wewnętrznej wydziela specyficzny naczyniowo czynnik przeciwskurczowy

Marcin Malinowski¹, Marek Deja¹, Krzysztof S. Gołba², Piotr Janusiewicz¹, Tomasz Roleder², Stanisław Woś¹

¹II Klinika Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Górnośląski Ośrodek Kardiologii, SPSK Nr 7, Katowice

²Katedra i Klinika Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

624. Farmakologiczna modulacja aktywności śródbłonkowej endoteliny 1 i prostacykliny w modelu nadciśnienia płucnego wywołanego przez monokrotalin

Andrzej Fedorowicz¹, Maria Walczak², Joanna Szymura-Oleksiak², Justyna Dzieża³, Tomasz Skórka³, Stefan Chłopicki¹

¹Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

²Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

³Instytut Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk, Kraków

588. Wpływ wczesnego, krótkotrwałego zablokowania kalcyneuryny na pozawałową przebudowę serca szczura

Urszula Mackiewicz, Michał Mączewski, Emilia Klemenska, Bohdan Lewartowski

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

610. Wpływ inhibitorów konwertazy angiotensyny na układ hemostazy u starych szczurów

Anna Gromotowicz¹, Andrzej Karp¹, Adrian Stankiewicz¹, Janusz Szemraj², Ewa Chabielska¹

¹Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny, Białystok

²Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

584. The effect of cardiomyocyte specific CCN1 overexpression on cardiac phenotype at baseline and after myocardial infarction in a mouse model

Anna Kozieradzka¹, Nils Holger Zschemisch², Sergej Erschow², Britta Stapel², Philipp Fischer², Denise Hilfiker-Kleiner²

¹Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny, Białystok

²Hannover Medical School, Hannover, Germany

572

Charakterystyka mechanizmów zaangażowanych w działanie skurczowe serotoniny na tętnice płucne myszy z nadekspresją transportera dla serotoniny

Marta Baranowska¹, Margaret R. Mac Lean²,
Hanna Kozłowska¹, Barbara Malinowska¹

¹ Zakład Fizjologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny, Białystok

² Division of Neuroscience and Biomedical Systems, University of Glasgow, Scotland, UK

Wstęp: Zwiększone stężenie serotoniny (5-HT), syntetyzowanej w komórkach śródbłonna naczyń płucnych, poprzez oddziaływanie z receptorami serotoninowymi (5-HT_{2A}, 5-HT_{1B}) oraz wnikanie do komórki za pośrednictwem transportera dla serotoniny (SERT) może prowadzić do rozwoju nadciśnienia płucnego (PAH) (*J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313: 539-48, 2). U chorych z PAH wykazano zwiększoną ekspresję genu transportera dla serotoniny (SERT) (*J Clin Invest* 2001; 108: 1141-50, 3). Myszy z nadekspresją transportera dla serotoniny (SERT+) wykazują podwyższone ciśnienie płucne i są podatne na rozwój PAH pod wpływem hipoksji (*Circulation* 2004; 109: 2150-5).

Cel: Charakterystyka mechanizmu działania skurczowego 5-HT na tętnice płucne podsegmentarne myszy niemodyfikowanych genetycznie (WT) i transgenicznych z nadekspresją transportera dla serotoniny (SERT+).

Materiał i metody: Tętnice płucne podsegmentarne pobrano z lewego płata płuca. Efekt skurczowy 5-HT wyrażano jako procent odpowiedzi skurczowej KCl (50 mM).

Wyniki: Serotonina (10⁻⁹ – 10⁻⁴ M), zależnie od stężenia, powodowała skurcz badanych naczyń płucnych myszy WT i SERT+ (pEC₅₀ i E_{max} wynosiły odpowiednio 6,64±0,12 i 74,87±3,90, n=6; oraz 5,46±0,12 i 94,26±7,32, n=13). Antagonista receptora 5-HT_{2A} ketanseryna (3 × 10⁻⁸ M) przesuwiała w prawo krzywą skurczową dla 5-HT w obu grupach, natomiast antagonistą receptora 5-HT_{1B} GR 55662 (10⁻⁶ M) osłabiała odpowiedź skurczową 5-HT jedynie w przypadku tętnic wyizolowanych od zwierząt WT. Citalopram (10⁻⁶ M) – inhibitor SERT – nasilał działanie 5-HT jedynie u zwierząt transgenicznych SERT+. Podanie antagonisty receptora 5-HT_{1B} i SERT LY393558 (10⁻⁷ M) osłabiło znacznie odpowiedź skurczową 5-HT zarówno u zwierząt WT, jak i SERT+. Łączne podanie antagonisty receptora 5-HT_{1B} GR 55662 (10⁻⁶ M) i citalopramu (10⁻⁶ M) nie wykazało działania synergistycznego.

Wnioski: Interakcje z SERT i wzmożona odpowiedź ze strony receptorów 5-HT_{1B} i 5-HT_{2A} mogą być przyczyną nasilonej czynności skurczowej i prowadzić do wzrostu ciśnienia płucnego u normoksyjnych zwierząt SERT+. Inhibitory SERT mogą nasilać skurcz naczyń indukowany serotoniną, może on być jednak osłabiony poprzez jednoczesną blokadę receptora 5-HT_{1B} i transportera SERT. LY393558 stanowi zatem potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu PAH.

573

Ocena czynności skurczowej lewej komory za pomocą wybranych parametrów kardiografii impedancyjnej

Wojciech Balak¹, Władysław Sinkiewicz²

¹ Oddział Kardiologii z Zakładem Diagnostyki Kardiologicznej, Szpital Wojewódzki, Bydgoszcz

² Katedra i Zakład Klinicznych Podstaw Fizjoterapii, Bydgoszcz

Wstęp: Podstawowym badaniem umożliwiającym rozpoznanie upośledzenia czynności skurczowej lewej komory jest badanie echokardiograficzne z oceną frakcji wyrzutowej lewej komory. Kardiografia impedancyjna jest nieinwazyjną metodą diagnostyczną znajdującą coraz szersze zastosowanie w kardiologii.

Cel: Zbadanie przydatności wybranych parametrów kardiogramów impedancyjnych w ocenie czynności skurczowej lewej komory poprzez określenie ich korelacji z frakcją wyrzutową lewej komory.

Materiał i metody: Badaniem objęto 50 osób. Grupę badaną stanowiło 30 chorych ze skurczową niewydolnością serca – frakcja wyrzutowa lewej komory (LVEF) ≤35%, w tym 13 chorych z niewydolnością serca na tle niedokrwinnym. Grupę kontrolną stanowiło 20 chorych bez objawów niewydolności serca, z prawidłową frakcją wyrzutową lewej komory, dobranych pod względem płci i wieku. Chorym wykonano badanie echokardiograficzne z oceną LVEF metodą planimetryczną oraz pomiary hemodynamiczne metodą kardiografii impedancyjnej (ICG) za pomocą Task Force Monitor (CNSystems). Oceniono objętość wyrzutową lewej komory (SV), rzut serca (CO), wskaźnik kurczliwości (IC), wskaźnik pracy lewej komory (LVWI). Wyniki poddano analizie statystycznej z oceną współczynnika korelacji liniowej Pearsona (poziom istotności – p < 0,05).

Wyniki: Oznaczona za pomocą echokardiografii wartość LVEF wynosiła średnio 23±6% w grupie badanej oraz 64±7% w grupie kontrolnej. Kardiogramy impedancyjne parametry określające czynność skurczową lewej komory wynosiły odpowiednio dla grupy badanej i grupy kontrolnej (wartości średnie ± SD): SV – 62±15 i 85±18 ml, CO – 4,4±1 i 5,6±1,4 l/min, IC – 30±12,4 i 42,6±15,4 1000/s, LVWI – 2,69±0,7 i 3,5±0,9 mmHg × l/[min × m²]. Wykazano znamienne korelacje wszystkich powyższych parametrów zmierzonych za pomocą ICG z frakcją wyrzutową lewej komory (dla SV i LVEF – r=0,4989, p < 0,001; dla CO i LVEF – r=0,3933, p=0,007; dla IC i LVEF – r=0,3809, p=0,009; dla LVWI i LVEF – r=0,4125, p=0,004).

Wnioski: Oznaczone za pomocą kardiografii impedancyjnej parametry określające czynność skurczową lewej komory (SV, CO, IC, LVWI) w istotny sposób korelują z wartością frakcji wyrzutowej lewej komory, co świadczy o ich przydatności w diagnostyce skurczowej niewydolności serca.

575

Wartość predykcyjna albuminy zmodyfikowanej niedokrweniem w ocenie ryzyka przyszłych incydentów sercowo-naczyniowych u chorych leczonych inwazyjnie (PTCA)

Jadwiga H. Hartwich¹, Joanna Góralska¹,
Dominika Drobniak-Hełdak², Renata Rajtar²,
Wiesława Kolasińska-Kloch², Aldona Dembińska-Kiec¹

¹ Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

² II Klinika Kardiologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Wstęp: Poszukiwane są markery dla oceny ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych u chorych poddawanych rewaskularyzacji naczyń wieńcowych. Test „albuminy zmodyfikowanej niedokrweniem” (IMA) oparty jest na zmniejszonej zdolności wiązania jonów kobaltu do N-końca albuminy osocza w wyniku stresu oksydacyjnego wywołanego niedokrweniem mięśnia sercowego. Bar-Or i wsp. (2001) zaobserwowali, że stężenie tak zmodyfikowanej albuminy we krwi wzrasta przejściowo w ciągu kilku minut po incydencie niedokrwienia i maleje po reperfuzji.

Cel: Oszacowanie wartości prognostycznej dynamicznych zmian poziomu IMA w ocenie ryzyka przyszłych incydentów sercowo-naczyniowych chorych leczonych przezskórną angioplastyką naczyń wieńcowych (PTCA).

Materiał i metody: Do badania włączono 26 mężczyzn w wieku 39–71 lat (55±8): 16 ze stabilną chorobą wieńcową (S), 6 z zawalem mięśnia sercowego (AMI) i 4 zdrowych mężczyzn (K) dobranych pod względem wieku i wskaźnika masy ciała. Wszyscy chorzy leczeni byli przezskórną angioplastyką naczyń wieńcowych z implantacją stentu, po czym kontynuowali standardowe leczenie farmakologiczne (aspiryna, klopidogrel, beta-bloker, inhibitor ACE, statyna). Z badania wykluczono chorych z otyłością, cukrzycą, procesem zapalnym, chorobami autoimmunologicznymi i nowotworami. Oznaczenia biochemiczne wykonano przed (poziom wyjściowy) oraz 7 i 28 dni po pomyślnym zabiegu angioplastyki naczyń wieńcowych (*post-stress*). We krwi oznaczano poziom leukocytów, IMA/ALB, CPK, CK-MB, troponiny I, albuminy, potencjału antyoksydacyjnego (FRAP, SH) i pierwotnych produktów oksydacji lipidów (LOOH).

Wyniki: W badaniu wykazano najwyższą wartość wskaźnika IMA/ALB w surowicy krwi chorych z zawalem mięśnia sercowego w porównaniu z osobami ze stabilną chorobą wieńcową i z grupą kontrolną. Histogram skategoryzowany wskazuje znacznie większą częstość występowania wysokich wartości IMA u chorych z angiograficznie potwierdzonym zwężeniem naczyń (AMI, S) w porównaniu z grupą kontrolną (K). Poziom IMA ujemnie korelował z frakcją wyrzutową lewej komory serca i z parametrami potencjału antyoksydacyjnego osocza (FRAP, SH), natomiast dodatnio korelował ze stężeniami CPK i CK-MB. Zaobserwowano tendencję do obniżenia wartości IMA *post-stress* w porównaniu z wartościami wyjściowymi, przy czym wartość ta była zawsze najwyższa w grupie AMI.

Wnioski: Wyniki naszych badań sugerują, że poziom IMA w surowicy może być użytecznym markerem w definiowaniu ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych wśród chorych poddawanych zabiegom PTCA.

576

Aktywacja PPAR- α a cechy histopatologiczne mięśnia sercowego u chorych z ubytkiem w przegrodzie międzykomorowej

Magdalena Brudek, Elżbieta Czarnowska,
Anna Turska-Kmieć, Lidia Ziółkowska, Wanda Kawalec,
Wiesława Grajkowska, Bohdan Maruszewski

Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

Wstęp: Jądrowy czynnik transkrypcyjny PPAR- α aktywowany w tkance mięśnia sercowego hamuje procesy zapalne, włóknienie, a także reguluje procesy metaboliczne związane z utylizacją kwasów tłuszczowych. Jego ekspresja może zatem korelować z cechami niewydolności serca. Aktywacja PPAR- α u chorych z ubytkiem w przegrodzie międzykomorowej (VSD) może być regulowana m.in. mechanicznym stresem, niedotlenieniem, zaburzoną równowagą ciśnienia w komorach, chociaż u tych chorych nie było to dotychczas badane.

Cel: Sprawdzenie hipotezy, że u dzieci z wrodzonym ubytkiem w przegrodzie międzykomorowej aktywacja PPAR- α w kardiomiocytach związana jest z cechami klinicznymi niewydolności serca.

Materiał i metody: Fragmenty mięśnia sercowego pobrano z prawego przedsionka (PP) w czasie zabiegu korekcji wady od 14 dzieci z VSD w wieku 4–22 miesięcy. Przed operacją 11/14 chorych było leczonych werospironem, 2/11 digoksyną i 3/11 ACE-I. Przedoperacyjne badania wykazały VSD typu podaortalnego u 3 chorych i okołobroniastego u 11 chorych z przeciekiem lewo-prawym, powiększenie LK i LP, dobrą czynność skurczową LK, różnicę ciśnień między LK i PK od 16 do 90 mmHg. W tkance pobranej z PP oceniano cechy histopatologiczne i ultrastrukturalne kardiomiocytów, ilość tkanki włóknistej, fenotyp komórek i wielkość nacieku zapalnego (CD3, CD4, CD8, LCA, CD68) oraz liczbę kardiomiocytów wykazujących ekspresję PPAR- α i α -aktyny mięśni gładkich (SMA) oraz gromadzenie glikogenu [PAS (+)].

Wyniki: Analiza liczby kardiomiocytów z ekspresją PPAR- α w tkance PP wykazała dwa rodzaje serc: (1) z ekspresją w pojedynczych jądrach lub brakiem ekspresji (średnio 1,6±2,19) u 7 chorych, i (2) z ekspresją >10% jąder (średnio 13,71±3,71) u 7 chorych. W sercach (1) charakterystyczna była obecność większej liczby komórek nacieku zapalnego o fenotypie LCA i CD68, większe włóknienie niż w sercach (2), wynoszące odpowiednio 7,27±2,05 vs 2,65±0,48%. W obu grupach serc tylko u 2 chorych występowały pojedyncze kardiomiocyty SMA (+) i PAS (+). W obu grupach obserwowano uszkodzone mitochondria, ale tylko w grupie (1) utratę grzebieni mitochondrialnych oraz cechy nasilonej nekrozy. Cechy histopatologiczne uszkodzenia mięśnia sercowego w grupie (1) korelowały jedynie z obniżoną wartością gradientu ciśnienia między LK i PK (większym ciśnieniem skurczowym PK).

Wnioski: Wyniki potwierdzają, że najważniejszym parametrem klinicznym związanym ze stopniem uszkodzenia mięśnia sercowego jest wielkość gradientu przepływu krwi LK-PK. Leki aktywujące PPAR- α mogą mieć znaczenie w terapii chorych oczekujących na usunięcie wady.

577

Dwuetapowy szlak syntezy angiotensyny II u szczura

Karol Kramkowski, Andrzej Mogielnicki, Dariusz Pawlak, Włodzimierz Buczek

Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny, Białystok

Wstęp: Badania ostatnich lat wskazują na istnienie innych niż ACE enzymów (np. ACE2 lub enzym podobny do CPA), które degradują angiotensynę I (Ang I). Enzymy te powodują powstanie Ang-(1-9) z Ang I.

Cel: Odpowiedź na pytanie, czy Ang-(1-9) jest konwertowana do Ang II – substancji o silnym działaniu hipertensyjnym, czy też do innych aktywnych bądź nieaktywnych peptydów.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono w osoczach i płytkach krwi szczura. W czasie godzinnej infuzji Ang I, Ang II lub Ang-(1-9) mierzono u szczurów średnie ciśnienie tętnicze krwi (MBP). Po infuzji od tych zwierząt pobierano krew i techniką HPLC oznaczono stężenia angiotensyn. Innym grupom zwierząt podawano Ang I i Ang-(1-9) oraz enalaprilat (2,5 mg/kg *i.v.*) w szybkim wlewie dożylnym i mierzono stężenia produktów degradacji tych peptydów we krwi zebranej z tętnicy szyjnej wspólnej. W eksperymentach *in vitro* wykorzystano homogenaty szczurzych płukanych płytek krwi. Po 0, 15 lub 30 min inkubacji Ang I, Ang II lub Ang-(1-9) z homogenatami reakcje zatrzymywano i mierzono stężenia peptydów.

Wyniki: Ang-(1-9), podobnie jak Ang I i Ang II, zwiększała średnie ciśnienie tętnicze krwi (MBP) podczas godzinnej infuzji, jednak efekt ten był słabiej zaznaczony w przypadku Ang-(1-9) (odpowiednio: Δ MBP=13,01 \pm 2,99, $p < 0,05$ vs VEH; 21,47 \pm 6,28, $p < 0,05$ vs VEH; 30,75 \pm 4,13, $p < 0,001$ vs VEH; $n=3-10$). Dodatkowo, po godzinnej infuzji (50 μ M/kg/min, 0,033 ml/min) wykryto Ang II (16,1 \pm 8,0 μ M) oraz śladowe ilości Ang III, Ang IV, Ang-(1-7) i Ang-(1-5). Po szybkim podaniu dożylnym Ang I wykrywano Ang-(1-9) i Ang II, jednak w przypadku Ang II obserwowano dwufalowy wzrost stężenia (ok. 50 i 110 s od rozpoczęcia wlewu, odpowiednio 8,34 \pm 5,44 i 7,06 \pm 4,34 μ M). Enalaprilat nie hamował syntezy Ang II w krążeniu (maksymalne stężenie Ang II ok. 110 s od rozpoczęcia wlewu wynosiło 9,15 \pm 3,05 μ M). Po inkubacji Ang I (20 \pm 0,32 μ M) z homogenatami szczurzych płytek (37°C, pH=7, liczba płytek =108), obserwowano wzrost stężenia Ang-(1-9) (od 0,0 μ M na początku eksperymentu do odpowiednio: 4,60 \pm 2,88 i 7,00 \pm 0,80 μ M w 15. i 30. min). Co więcej, po inkubacji Ang-(1-9) (20 \pm 0,11 μ M) w tych samych warunkach stężenie Ang II również wzrastało (od 0,0 μ M na początku eksperymentu do odpowiednio: 1,29 \pm 0,45 i 1,83 \pm 0,23 μ M w 15. i 30. min).

Wniosek: Ang II może powstawać z Ang I bezpośrednio lub pośrednio z udziałem Ang-(1-9).

578

Kwasy tłuszczowe i różnicowanie komórek progenitorowych izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej

Adriana Balwier, Urszula Czech, Anna Polus, Aldona Dembińska-Kieć

Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Wstęp: Angiogeneza jest procesem ważnym dla adipogenezy. Tkanka tłuszczowa zawiera frakcję podścieliskową (ang. *stromal vascular fraction*, SVF) zawierającą komórki uczestniczące w procesie angiogenezy.

Cel: Wykazanie wpływu wolnych kwasów tłuszczowych na proangiogenne vs proadipogenne właściwości ludzkich komórek SVF izolowanych z podskórnej tkanki tłuszczowej.

Materiał i metody: Komórki SVF hodowane były w medium proangiogenym (EBM z 2% FCS) lub proadipogenym (DMEM bez surowicy, ale z insuliną, transferyną i hydrokortyzonem). Badano wpływ 24-godzinnej inkubacji z 1–30 μ M kwasu palmitynowego, oleinowego, arachidonowego i eikozapentaenowego na proliferację, migrację oraz tworzenie struktur kapilaropodobnych w matrygelu. Różnicowanie do adipocytów potwierdzono barwieniem czerwienią olejową. Zmiany w ekspresji genów wykazano metodą mikromacierzy oraz *real-time* PCR.

Wyniki: W zależności od rodzaju medium, komórki SVF różnicują się do komórek śródbłonka bądź adipocytów, co udokumentowano badaniem ekspresji genów. Proangiogenne komórki SVF proliferują, migrują oraz tworzą struktury kapilaropodobne w matrygelu, po stymulacji czynnikami proangiogennymi. Jednakże FFA nie wpływają na proangiogenne właściwości tych komórek. Nienasycone kwasy tłuszczowe wykazywały większy udział w aktywacji ekspresji genów charakterystycznych dla adipocytów, podczas gdy nasycone kwasy tłuszczowe stymulowały geny charakterystyczne dla procesu angiogenezy.

Wnioski: Wolne kwasy tłuszczowe mogą decydować o kierunku różnicowania się komórek SVF.

Badanie finansowane z grantu promotorskiego nr N404 008 32/0237.

579

Stabilna oraz przejściowa transfekcja mysich mioblastów plazmidem zawierającym sekwencje kodujące dla czynników proangiogennych

Marcin Krupka¹, Alicja Józkowicz², Józef Dulak²,
Małgorzata Białas¹, Natalia Rozwadowska¹,
Monika Frączek¹, Jerzy Kotlinowski², Bożena Lackowska²,
Maciej Kurpisz¹

¹ Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

² Zakład Biotechnologii Medycznej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wstęp i cel: Tradycyjne metody leczenia mięśnia sercowego po przebytych zawałach opierają się na ograniczaniu obszaru martwicy i dalszej przebudowy lewej komory oraz na zapobieganiu objawom niewydolności pozawałowej. Nowoczesne terapie związane z wypełnieniem obszaru blizny komórkami macierzystymi wzbogacone zostały w ostatnim czasie o modyfikacje genetyczne wspomnianych komórek. Wprowadzanie nowych genów ma na celu poprawę ukrwienia w obrębie uszkodzonej tkanki oraz indukcję mechanizmów cytotropekcyjnych względem przeszczepianych komórek.

Metody: W pracy przedstawiono wpływ jednoczesnej nadekspresji dwóch czynników proangiogennych – czynnika wzrostu fibroblastów 4 (ang. *fibroblast growth factor*, FGF-4) oraz czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF-A) na komórki mysiej linii mioblastów C2C12. Przygotowano konstrukcję genową pTRUF-22-FGF4-ires-VEGF zawierającą ORF dla dwóch genów. Sekwencje genów w plazmidzie rozdzielone zostały sekwencją wewnętrznego wiązania rybosomów (ang. *internal ribosome entry site*, IRES) zapewniającą ich jednoczesną ekspresję pod kontrolą wspólnego promotora. Przeprowadzono transfekcję mysich mioblastów, uzyskując linię C2C12, w której badane czynniki ulegały ekspresji zarówno przejściowo, jak i stabilnie.

Wyniki: Stwierdzono, że transfekowane komórki wykazują zmiany w przebiegu cyklu komórkowego, w potencjale angiogennym oraz w ekspresji markerów miogennych w stosunku do nie-transfekowanych komórek kontrolnych. Zauważono także zwiększone tempo proliferacji komórek modyfikowanych genetycznie. Nie wykazano natomiast wpływu nadekspresji badanych czynników na proces apoptozy/nekrozy w warunkach stresu oksydacyjnego.

Wnioski: Uzyskane wyniki sugerują, że transplantacja mioblastów z nadekspresją badanych czynników proangiogennych – FGF-4, VEGF – może zostać wykorzystana w regeneracji poza-wałowego mięśnia sercowego.

580

Hamowanie różnicowania ludzkich komórek SVF do kardiomiocytów przez kolagen typu I

Agnieszka Śliwa, Adriana Balwierz, Anna Polus,
Beata Kieć-Wilk, Łukasz Partyka, Aldona Dembińska-Kieć

Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Wstęp: Proces różnicowania kardiomiocytów zachodzi w okresie życia płodowego, u osób dorosłych regeneracja tkanki serca jest ograniczona. Sugeruje się, że w terapii polegającej na rekonstrukcji tkanek mogą zostać wykorzystane komórki progenitorowe ze względu na ich zdolność do różnicowania się w komórki różnych typów. Dobrym i stosunkowo łatwo dostępnym źródłem tych komórek może być tkanka tłuszczowa. Uważa się, że ludzka tkanka tłuszczowa zawiera populację niezróżnicowanych komórek (ang. *stromal vascular fraction*, SVF), które mogą ulegać różnicowaniu w wiele typów komórek, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Komórki SVF, podobnie jak inne komórki progenitorowe, do różnicowania się w kardiomiocyty, oprócz pewnych cytokin, potrzebują również zachowania łączności pomiędzy komórkami oraz kontaktu z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej.

Cel: Zbadanie wpływu kolagenu typu I na różnicowanie ludzkich komórek SVF do kardiomiocytów.

Metody: Różnicowanie ludzkich komórek SVF było indukowane przez inkubację w medium Methocult w obecności SCF, IL-3 i IL-6. Zmiany morfologiczne komórek obserwowano przy użyciu mikroskopu optycznego i pomiaru ekspresji charakterystycznych genów metodą qRT-PCR.

Wyniki: Zaobserwowano zmiany kształtu miotubul oraz *up-regulation* genów charakterystycznych dla kardiomiocytów: GATA, MEF2C, MYOD1, ANP w obecności cytokin promujących miogenezę. Natomiast obecność kolagenu typu I zapobiega indukowanej przez cytokiny ekspresji genów i hamuje różnicowanie komórek.

Wnioski: Ludzkie komórki SVF różnicują się do komórek podobnych do kardiomiocytów w obecności pewnych cytokin, podczas gdy kolagen typu I osłabia ten efekt. Kolagen typu I nie może być rekomendowany do tworzenia struktur przestrzennych wykorzystywanych w terapii polegającej na rekonstrukcji serca.

Praca została wykonana w ramach projektu F6 EU SC&CR (LSHB-CT-2004-502988).

581

Brak funkcjonalnej endotelialnej syntazy tlenku azotu u myszy eNOS^{-/-} a rozwój tkanki tłuszczowej i insulinooporności

Urszula Rażny, Łukasz Wątor, Beata Kieć-Wilk, Łukasz Partyka

Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Wstęp: Gromadzenie tkanki tłuszczowej prowadzi do rozwoju otyłości i zespołu metabolicznego oraz oporności na insulinę. Akumulacja lipidów i rozrost tkanki tłuszczowej są uzależnione od unaczynienia tej tkanki. Tlenek azotu (NO) uwalniany ze śródbłonnki jest mediatorem angiogenego działania VEGF, bFGF, a także insuliny i leptyny. Z drugiej strony NO reguluje transport glukozy poprzez korzystny wpływ na wychwyt glukozy w mięśniach szkieletowych i metabolizm mitochondrium, zapobiegając rozwojowi insulinooporności.

Cel: Zbadanie wpływu diety wysokotłuszczowej na rozwój insulinooporności i objawów zespołu metabolicznego u myszy z wyłączonym genem śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS^{-/-}).

Materiał i metody: Sześciotygodniowe myszy eNOS^{-/-} (eNOS ko) oraz myszy kontrolne WT (C57/Bl/6J) skarmiano przez 13 tygodni dietą standardową (Murigran) i wysokotłuszczową (MP Bio-medicals). W trakcie eksperymentu myszy ważono 2 razy w tygodniu oraz co 2 tygodnie mierzono parametry biochemiczne w surowicy (glukoza, cholesterol, trójglicerydy), wykonywano testy kolorymetryczne Cormay kits. Na początku i na końcu skarmiania prowadzono pomiary stężenia adipokiny (leptyny, adiponektyny) oraz insuliny w surowicy przy użyciu testów ELISA.

Wyniki: Zwierzęta eNOS^{-/-} wykazywały tendencję do niższej wagi ciała w stosunku do WT. Po 13 tygodniach skarmiania dietą wysokotłuszczową u myszy eNOS^{-/-} stwierdzono znamienne niższy przyrost wagi ciała w porównaniu z myszami kontrolnymi (C57). Pomiary powierzchni pod krzywą trójglicerydów wykazały istotnie statystycznie wyższy poziom trójglicerydów u myszy eNOS^{-/-} skarmianych dietą wysokotłuszczową w porównaniu z myszami kontrolnymi (C57) ($p < 0,05$). Dieta wysokotłuszczowa wywołała istotny wzrost poziomu cholesterolu zarówno u myszy eNOS^{-/-}, jak i u myszy kontrolnych. Zarówno dieta standardowa, jak i wysokotłuszczowa powodowały wzrost poziomu insuliny w obu badanych grupach, jakkolwiek na diecie standardowej przyrost insuliny był wyższy u zwierząt eNOS^{-/-} w stosunku do zwierząt kontrolnych. Zwierzęta eNOS^{-/-} oraz kontrolne po skarmianiu dietą wysokotłuszczową odpowiedziały wzrostem poziomu leptyny w surowicy, u myszy eNOS^{-/-} obserwowano większy przyrost leptyny (nieznamienne statystycznie).

Wnioski: Myszy z wyłączonym genem eNOS prezentują niektóre objawy zespołu metabolicznego, co może być związane ze zmienionym metabolizmem tkanki tłuszczowej.

Badania wykonano w ramach grantu MNIł Nr 2PO5A 142 30 oraz K/ZDS/000623.

582

Ocena zależności między stężeniem mózgowego peptydu natriuretycznego w surowicy chorych z rozkurczową niewydolnością serca w przebiegu nadciśnienia tętniczego a wartością wskaźników turbulencji rytmu serca

Władysław Sinkiewicz¹, Piotr Matyszka²

¹ Katedra i Zakład Klinicznych Podstaw Fizjoterapii, Bydgoszcz

² Oddział Kardiologii z Zakładem Diagnostyki Kardiologicznej, Szpital Wojewódzki, Bydgoszcz

Wstęp: U ok. 50% chorych z niewydolnością serca (NS) obserwuje się zachowaną funkcję skurczową lewej komory, co określa się mianem rozkurczowej NS.

Cel: Celem badania było określenie zależności pomiędzy stężeniem peptydu natriuretycznego (BNP) w surowicy a wartością wskaźników turbulencji rytmu zatokowego jako wykładników równowagi współczulno-przywspółczulnej u chorych z rozkurczową niewydolnością serca – predyktorów nagłego zgonu sercowego.

Materiał i metody: Badaniem objęto 100 chorych. Do grupy badanej włączono 50 osób (w wieku 47–80 lat) z nadciśnieniem tętniczym z objawami NS (II–III/IV klasa czynnościowa wg NYHA) oraz z prawidłową funkcją skurczową lewej komory (LVDd \geq 6,0 cm, LVEF \geq 45%) i zaburzeniami funkcji rozkurczowej w badaniu echokardiograficznym. Grupę kontrolną tworzyło 50 chorych (45–79 lat) z nadciśnieniem tętniczym bez objawów NS. U chorych oznaczano stężenie BNP w surowicy oraz wykonywano 24-godzinne badanie EKG metodą Holtera z użyciem rejestratorów cyfrowych. W analizie turbulencji rytmu serca (HRT) oznaczano dwa parametry numeryczne turbulencji: początek (TO) i nachylenie (TS) turbulencji.

Wyniki: W grupie badanej analizę HRT przeprowadzono u 39 (78%) chorych (u 11 osób nie stwierdzono występowania arytmii komorowej). Wartości TO w grupie 39 osób wynosiły od –0,053% do 0,078% (średnio –0,0056 \pm 0,027%), podczas gdy TS mieściło się w zakresie 0,0–19,5 ms/R-R (średnio 6,64 \pm 4,64 ms/R-R). Stężenie BNP wynosiło 9,64–141,69 pg/ml (średnio 44,90 \pm 35,62 pg/ml). Średnie wyniki BNP wykazywały istotną dodatnią korelację z ocenioną na podstawie objawów podmiotowych klasą czynnościową wg NYHA i wynosiły odpowiednio: w II klasie wg NYHA – średnio 32,85 pg/ml, w III klasie wg NYHA – średnio 84,08 pg/ml, w III/IV klasie wg NYHA – średnio 226,07 pg/ml (współczynnik korelacji $r=0,68$, $p < 0,001$). W analizie jednoczynnikowej nie stwierdzono zależności między wartością BNP a TO i BNP a TS.

W grupie kontrolnej analizę HRT przeprowadzono u 44 (88%) chorych (u 6 osób nie stwierdzono występowania arytmii komorowej). Wartości TO w grupie 44 osób wynosiły od –0,0792% do 0,0612% (średnio –0,0092 \pm 0,025%), podczas gdy TS mieściło się w zakresie 0,0–33 ms/R-R (średnio 8,77 \pm 7,93 ms/R-R). Stężenie BNP wynosiło 14,51–291,7 pg/ml (średnio 52,06 \pm 54,19 pg/ml). W analizie jednoczynnikowej również nie wykazano zależności między wartością BNP a TO i BNP a TS.

Wnioski:

1. Stężenie BNP w surowicy chorych z rozkurczową NS wykazuje istotną dodatnią korelację ze stanem klinicznym określanym zgodnie z klasyfikacją NYHA.
2. Wartości BNP zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej nie wykazują związku ze wskaźnikami turbulencji rytmu zatokowego – predyktorami nagłego zgonu sercowego.

583

Częstość występowania obturacyjnego lub mieszanego bezdechu sennego ocenianego metodą holterowską w grupie chorych ze stabilną skurczową niewydolnością serca

Władysław Sinkiewicz¹,
Małgorzata Dowgwiłłowicz-Nowicka²

¹ Katedra i Zakład Klinicznych Podstaw Fizjoterapii, Bydgoszcz

² Oddział Kardiologii z Zakładem Diagnostyki Kardiologicznej, Szpital Wojewódzki, Bydgoszcz

Wstęp: Zaburzenia oddychania w czasie snu (ZOCs) są zespołem klinicznym pogarszającym w istotny sposób przebieg i rokowanie chorych ze skurczową niewydolnością serca (SNS), występują u 40–80% chorych. W tej grupie dominuje postać centralna, jednak bezdech obturacyjny lub mieszany stanowi także istotny problem kliniczny.

Cel: Ocena częstości występowania cech obturacyjnego i mieszanego bezdechu sennego w grupie chorych z SNS na podstawie badania przeprowadzonego metodą Holtera.

Materiał i metody: Grupa badana złożona była z 70 chorych (8 kobiet i 62 mężczyzn), średnia wieku – 54,8 roku, z objawami NS w II i III klasie wg NYHA, z dysfunkcją skurczową lewej komory (EF \geq 40%). Grupę kontrolną stanowiło 50 osób (7 kobiet i 43 mężczyzn), średnia wieku – 57,8 roku, bez klinicznych objawów niewydolności serca, dobranych odpowiednio pod względem płci i wieku. Nasilenie senności dziennej oceniano na podstawie skali Epworth (wynik >10 pkt oznacza nasiloną senność dzienną). Ocenę bezdechu sennego przeprowadzono za pomocą programu Lifescreen Apnea. Obecność i stopień nasilenia ZOCs określano na podstawie szacowanego wskaźnika bezdechu/sptyconego oddychania (ang. *apnea/hipopnea index*, AHI). Dla badania holterowskiego podaje się następujące przedziały diagnostyczne AHI: norma <5 , wartości graniczne (ang. *borderline apnea*) 5–15, bezdech senny >15 .

Wyniki: Nasilenie senności w skali Epworth wynosiło średnio 5 pkt w grupie badanej i 4 pkt w grupie kontrolnej. Wyniki prawidłowe (<9 pkt) stwierdzono u 64 (91,4%) osób w grupie badanej i 42 (84,0%) w grupie kontrolnej. Wyniki wskazujące na senność dzienną (>10 pkt) uzyskano u 6 (8,4%) osób w grupie badanej i u 8 (16%) w grupie kontrolnej (różnica nieistotna statystycznie). Wynik badania holterowskiego był prawidłowy (AHI <5) u 11 (15,9%) osób w grupie badanej oraz u 9 (19,6%) osób w grupie kontrolnej (różnica nieistotna statystycznie). Cechy granicznego bezdechu

(AHI 5–15) stwierdzono u 20 (29,0%) chorych w grupie badanej oraz u 25 (54,3%) osób w grupie kontrolnej (różnica istotna statystycznie). Wskaźnik AHI >15 , świadczący o obecności zaburzeń oddychania w czasie snu, wykazano u 38 (55,1%) osób w grupie badanej i u 12 (26,1%) w grupie kontrolnej (różnica istotna statystycznie, $p < 0,006$).

Wnioski: Częstość występowania bezdechu sennego ocenianego za pomocą badania holterowskiego jest istotnie wyższa w grupie chorych ze skurczową niewydolnością serca w porównaniu z grupą kontrolną pomimo braku istotnych statystycznie różnic w klinicznej manifestacji zaburzeń oddychania w czasie snu ocenianej na podstawie skali Epworth. Algorytmy holterowskie pozwalające na rozpoznawanie obturacyjnego i mieszanego bezdechu sennego mogą się okazać przydatne w codziennej praktyce klinicznej.

584

The effect of cardiomyocyte specific CCN1 overexpression on cardiac phenotype at baseline and after myocardial infarction in a mouse model

Anna Kozieradzka¹, Nils H. Zschemisch²,
Sergej Erschow², Britta Stapel², Philipp Fischer²,
Denise Hilfiker-Kleiner²

¹ Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny, Białystok

² Hannover Medical School, Hannover, Germany

Background: CCN1 is a pro-angiogenic factor induced in cardiomyocytes rapidly after ischemia and pressure overload. It promotes migration, proliferation and survival of cardiac cells.

Aim: The aim of our study was to investigate the effect of its overexpression on cardiac function and morphology in a transgenic mouse model at baseline and after myocardial infarction (MI).

Methods: Five inducible cardiomyocyte-specific (using the alpha-MHC-promoter) CCN1 transgenic mouse lines were generated. Two lines (CTC1 and CTC3) were expressing the transgene, when combined with the TTA inducer (CTC1/TTA, CTC3/TTA genotypes). Baseline echocardiography was performed at the age of 12 weeks. For histological analysis isolectin B4-WGA, Ki-67-isolectin B4, sirius red and CD-45 stainings were used. MI was induced in 12-weeks old males by means of permanent left coronary artery ligation. Two weeks after MI echocardiographic parameters were measured and hearts were excised. We defined infarct size in HE-stained preparations as percentage of total affected left ventricle circumference.

Results: Constitutive postnatal activation of the CCN1 transgene resulted in a 3.12 increased expression of CCN1 protein in left ventricular tissue. CTC1/TTA and CTC3/TTA males had increased baseline systolic function compared to wild types (fractional area change in short axis 58.5 ± 5.3 vs. $50.8 \pm 7.1\%$, $p < 0.05$ and 51.5 ± 6.9 vs. $47.1 \pm 10.1\%$, $p = 0.08$, respectively) and lower left ventricular end-diastolic volume (41.5 ± 7.2 vs. 58.7 ± 11.5 μ l, $p < 0.05$ and 57.6 ± 12.0 vs.

70.8±12.6 µl, $p < 0.05$, respectively). CTC1/TTA mice had tendency towards smaller mean csa (294.6 vs. 360.3 µm², $p=0.2$) and increased collagen deposition. Capillary density remained unchanged (1.76 vs. 1.71 capillaries/cardiomyocyte) despite increased rate of proliferating endothelial cells. There was no difference between the genotypes in CD-45 staining. After MI CTC1/TTA males ($n=19$, WTs: $n=25$) displayed higher mortality within the first 4 days post MI with no evidence for left ventricular rupture (31.6 vs. 12%, $p=0.22$ χ^2 test). After two weeks morphometric measurements of surviving mice showed comparable infarct sizes in both groups (24.6±15 vs. 28.7±20.5%, $p=0.56$). In animals with similar infarct sizes no evident difference in myocardial function was found (fractional area change in long axis 27.1±8.7% in CTC1/TTA group vs. 26.6±10.5% in WTs, $p=0.8$).

Conclusions: Constitutive cardiac specific overexpression of CCN1 affects baseline cardiac function (increased systolic function, lower heart volumes) and morphology (smaller csa, increased proliferation rate of endothelial cells). After myocardial infarction high CCN1 protein expression seems to be detrimental and promote an early post MI mortality.

586

The influence of channel openers NS1619 and CGS7184 as regulator of endothelial cells function

Iwona Stanisławska¹, Antonina Chmura-Skirlińska², Magdalena Bartuś¹, Stefan Chłopicki¹, Adam Szewczyk²

¹ Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

² Instytut Biologii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Background: Potassium channels are present in the inner-mitochondrial membrane. Recently, a large-conductance Ca²⁺-activated potassium (BKca) channel was described in heart, aorta, glioma and brain mitochondria. These channels play a pivotal role in cytoprotection. Activation of mitoKATP channels with pharmacological agents can lead to cardioprotection and neuroprotection. Moreover activation of mitochondrial BKCa channel by NS1619 can lead to cardioprotection. The pharmacological substances such as benzimidazolone derivative NS1619 and indol derivatives CGS7181 and CGS7184 can modulate activity of BKca channels.

Aim: In the present work, we investigated the influence of potassium channel opener CGS7184 and NS1619 on the isolated rat aorta ring.

Methods: We have chosen two substances NS1619 and CGS7184 which induce vasodilatation.

Results: The comparison of vasodilatation in the rat aorta isolated, after treatment with CGS7184 and NS1619 and in the presence of SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) reveal that addition of CGS7184 induced more intensive NO-dependent vasodilatation than in the presence of NS1619. Additionally to comparison the concentration of nitric oxide produced by isolated

rat aorta in different condition we used the EPR methods. In the presence of CGS we observed the more intensive signal from nitrosohemoglobin thereby these data confirmed formation of nitric oxide from isolated rat aorta.

Conclusion: Our results suggested that BKCa channel opener CGS7184 activates nitric oxide production in this system which is responsible for vasodilatation.

This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education, No. PBZ/MNiSW/07/2006/26 and Nr PBZ/MNiSW/07/2006/29.

587

CNN2 protein is announcing marker for cardiac remodeling following STZ induced moderate hyperglycemia in the mouse heart

Karol Kamiński¹, Barbara Szepietowska², Tomasz Bonda³, Marcin Kożuch⁴, Joanna Mencil³, Andrzej Małkowski⁵, Olga Kovalchuk⁶, Małgorzata Szlachowska³, Włodzimierz Musiał¹, Maria Winnicka³

¹ Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny, Białystok

² Klinika Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny, Białystok

³ Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny, Białystok

⁴ Klinika Kardiologii Inwazyjnej, Uniwersytet Medyczny, Białystok

⁵ Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny, Białystok

⁶ Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny, Białystok

Background: Diabetes causes changes in the myocardium often called diabetic cardiomyopathy. This condition has been extensively investigated in the animal models with the high glucose levels. Nevertheless, it has not been investigated, whether moderate hyperglycaemia, in the absence of other features of metabolic syndrome may also cause similar changes in the heart.

Aim: The aim of the study was to assess the changes in the myocardium in the animal model of mild type 1 diabetes.

Methods: Moderate hyperglycaemia was induced in 8–10 week old male C57Bl6J mice by 5 intraperitoneal injections of streptozotocin (40 mg/kg). After 16 weeks they were sacrificed, left ventricle (LV) dimensions and extent of cardiac fibrosis were assessed by morphometry. The abundance of CCN 1 and CCN2 proteins in LV samples was assessed using western blotting, while activity of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) was established in zymography. Real time PCR was used to investigate the expression of TGF-β1 and ANP.

Results: Mice with moderate hyperglycaemia presented comparable cardiac weight, dimensions, fibrosis and hypertrophy parameters (atrial natriuretic peptide expression, cardiomyocyte cross-sectional area) as the non-diabetic controls. However, the abundance of profibrotic CCN2 protein was significantly increased in hyperglycaemic animals (1±0.47 vs. 1.67±0.28 respectively

$p < 0.05$). CCN1 protein abundance was slightly increased (1.27 fold), this however did not reach the statistical significance. Interestingly, this change was independent from the TGF β 1 expression, as its RNA abundance was similar in both groups. Moderate hyperglycaemia also caused small, but significant increase in the activity of the MMP2 (1 ± 0.07 vs. 1.21 ± 0.17 respectively $p < 0.05$).

Conclusion: Moderate hyperglycaemia causes activation of profibrotic gene expression program, which initially may be counterbalanced by an increase in metalloproteinase activity. In animal model of mild type 1 diabetes no profound changes in cardiac morphology are found.

588

Wpływ wczesnego, krótkotrwałego zablokowania kalcyneury na pozawałową przebudowę serca szczura

Urszula Mackiewicz, Michał Mączewski,
Emilia Klemenska, Bohdan Lewartowski

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Wstęp: Głównie zmiany zachodzące na poziomie przeżywalnych zawał lewej komory (LK) kardiomiocytów to ich przerost oraz zmiany funkcji i ekspresji białek obiegu Ca^{2+} . Głównym czynnikiem uruchamiającym program „przerostowy” w kardiomiocytach jest aktywacja wewnątrzkomórkowej fosfatazy zwanej kalcyneuryną.

Cel: Zbadanie wpływu zahamowania aktywności kalcyneury w wczesnym okresie po indukcji zawału na przebieg pozawałowej przebudowy serca szczura.

Metody: Szczurom rasy Wistar (ok. 250 g) podawano przez pierwsze 4 doby po indukcji rozległego zawału lewej komory (LK) lub po operacji pozornej bloker kalcyneury – cyklosporynę (Cs) w dawce 7,5 mg/kg masy ciała 2 razy na dobę lub sól fizjologiczną. Po 8 tygodniach echokardiograficznie określano wymiary i kurczliwość LK i mierzono ciśnienia w LK przy użyciu cewnika wewnątrzsercowego. Następnie izolowano kardiomiocyty z LK i mierzono w nich sygnał Ca^{2+} , mierzono transport Ca^{2+} przez ATP-azę wapniową siateczki sarkoplazmatycznej (SERCA), wymiennik Na^+/Ca^{2+} (NCX) i ATP-azę wapniową sarkolemy (PMCA) oraz zawartość Ca^{2+} w siateczce sarkoplazmatycznej (SR).

Wyniki: Po 3 dniach podawania Cs po zawałe aktywność kalcyneury została zmniejszona o 75%. Osiem tygodni po zawałe obserwowaliśmy istotny przerost oraz rozstrzeń i spadek kurczliwości LK, a na poziomie kardiomiocytów wzrost amplitudy sygnału Ca^{2+} , wzrost zawartości Ca^{2+} w SR (odpowiednio o 24 i 30%) oraz spadek szybkości opadania sygnału Ca^{2+} o 35%. Aktywność transportowa SERCA była zmniejszona o 36%, PMCA o 17%, natomiast NCX niezmienną. U zwierząt otrzymujących po zawałe Cs przerost LK był mniejszy, rozstrzeń większa, natomiast frakcja wyrzutowa LK niezmienną w porównaniu

ze zwierzętami po zawałe bez interwencji. Podawanie Cs po zawałe zmniejszyło o 7% wzdłużny przerost kardiomiocytów, nie miało wpływu na zmienioną po zawałe amplitudę sygnału Ca^{2+} , obniżyło o 18% zawartość Ca^{2+} w SR oraz zwiększyło o 24% szybkość opadania sygnału. Podawanie Cs zmniejszyło wywołany zawałem spadek szybkości transportu Ca^{2+} przez SERCA i PMCA odpowiednio o 30 i 17% oraz zmniejszyło niezmienną w wyniku pozawałowej przebudowy szybkość transportową NCX o 23%. Krótkotrwałe podawanie Cs nie miało wpływu na żaden z mierzonych parametrów u zwierząt operowanych pozornie.

Wnioski: Uzyskane wyniki sugerują, że wczesne, krótkotrwałe zahamowanie aktywności kalcyneury po zawałe serca ma odległy wpływ na przebudowę LK na poziomie makroskopowym i komórkowym. Zahamowanie kalcyneury po zawałe, poprzez zmniejszenie przerostu, prowadzi do większej rozstrzeni LK. Frakcja wyrzutowa LK jest zachowana prawdopodobnie dzięki korzystnemu wpływowi wczesnego zablokowania kalcyneury na funkcję białek obiegu Ca^{2+} .

589

Ocena zmian ekspresji genu *Cx 43* w komórkach śródbłonna pod wpływem kwasów tłuszczowych i beta-karotenu

Katarzyna Janczarska, Beata Kieć-Wilk, Agnieszka Śliwa,
Aldona Dembińska-Kieć

Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Wstęp: Mitochondria odgrywają główną rolę w chorobach degeneracyjnych związanych z wiekiem. Koneksyna 43, białko tworzące międzykomórkowe połączenia szczelinowe, odgrywa również ważną rolę w funkcji mitochondriów. *Cx43* jest częścią kompleksów kształtujących kanały mitoK-ATP, zależnych od jonów Ca^{2+} .

Cel: Ocena zmian ekspresji genu *Cx 43* w komórkach śródbłonna pod wpływem kwasów tłuszczowych i beta-karotenu oraz ocena działania koneksyny 43 na funkcję mitochondriów w warunkach stresu komórkowego, jakim jest kontakt z wolnymi kwasami tłuszczowymi.

Metody: Do badań użyto komórek śródbłonna naczyń krwionośnych HUVEC oraz komórek progenitorowych ludzkiej tkanki tłuszczowej, tzw. *stromal vascular fraction* (SVF), inkubowanych przez 24 godz. w medium EBM (EGM Bullet Kit Clonetics) z dodatkiem kwasów tłuszczowych: PA, AA, EPA (1–30 μ M) (SIGMA) oraz beta-karotenu (3 μ M) (ROCHE). Z komórek przed i po inkubacji wyizolowano mitochondria kitem (Pierce) w obecności inhibitorów proteaz (Halt TM). Zmianę ekspresji genu koneksyny 43 analizowano za pomocą qRT-PCR wg standardowego protokołu przy zastosowaniu GAPDH jako genu referencyjnego. Zmiany w poziomie białka przebadano metodą Western Blot. Metaboliczna aktywność mitochondriów będzie analizowana za pomocą elektrody Oxygraf 2-K (Oroboros).

Wyniki: Beta-karoten, ale nie użyte kwasy tłuszczowe, w sposób przeciwny wpływają na ekspresję koneksyny w badanych tkankach, hamując jej ekspresję w HUVEC. Nie stwierdzono jednak takiej różnicy w badanej metodą Western Blot ilości białka cx43 zarówno w całych komórkach, jak i izolowanych mitochondriach. Analiza aktywności mitochondriów jest w trakcie optymalizacji.

Wniosek: Wydaje się, że mimo zmiany ekspresji genu badane FFA i BC po inkubacji 24-godzinnej nie wpływają na całkowitą ilość białka Cx43 w HUVEC.

Praca jest wykonywana w ramach projektu K/ZDS/000683.

590

Ocena występowania oraz zmienności zjawiska aspirynoooporności u osób ze stabilną postacią choroby wieńcowej w trakcie dwuletniej obserwacji

Marek Postuła¹, Agnieszka Serafin¹, Krzysztof J. Filipiak¹, Michał Marchel¹, Zenon Huczek¹, Bożena Tarchalska-Kryńska², Grzegorz Opolski¹, Andrzej Członkowski²

¹ I Katedra i Klinika Kardiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

² Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawa

Cel: Ocena częstości występowania zjawiska aspirynoooporności w populacji osób ze stabilną postacią choroby niedokrwiennej serca w trakcie 2-letniej obserwacji oraz jednoczesna ocena zmienności zjawiska aspirynoooporności w tej populacji.

Materiał i metody: Do badania włączono, po wyrażeniu pisemnej zgody, 100 osób (w tym 38 kobiet, średnia wieku 67,02±8,31 roku) z chorobą niedokrwinną serca, które przyjmowały ASA w dawce 75–150 mg na dobę w ramach prewencji wtórnej ostrych zespołów wieńcowych przez przynajmniej 3 miesiące. Ocenę funkcji płytek wykonywano przy użyciu PFA-100 (Dade Behring) w momencie włączenia do badania oraz po 12 i 24 miesiącach. Regularne przyjmowanie ASA oceniano na podstawie wywiadu w momencie włączenia oraz podczas każdej wizyty w okresie obserwacji. Oporność na ASA określono na podstawie wartości czasu okluzji wyrażonego w sekundach (ang. *closure time*, CT), z zastosowaniem kaset testowych zawierających kolagen/epinefrynę (CEPI) dokonano następującego podziału: CEPI-CT ≤150 s – chorzy niewrażliwi na ASA, CEPI-CT ≥250 s – wrażliwi, CEPI-CT 151–249 s – pośrednio wrażliwi.

Wyniki: Według oznaczeń wykonanych za pomocą PFA-100 częstość aspirynoooporności wynosiła w momencie włączenia 33% (33 chorych). Funkcję płytek oceniono ponownie u 92 chorych po roku oraz u 90 po 2 latach, oporność na ASA wykazano odpowiednio u 27 (29,35%) oraz u 30 (33,33%) chorych. W badanej populacji u 21 osób stwierdzono wartości CEPI-CT ≤150 s w trakcie przynajmniej dwóch wizyt, u 8 badanych z tej

grupy (38,09%) aspirynoooporność stwierdzono podczas wszystkich wizyt; prawidłową odpowiedź na ASA podczas ≥2 wizyt stwierdzono u 38 osób, w tej grupie prawidłowa wrażliwość na ASA podczas 2-letniej obserwacji występowała u 13 (34,2%) osób. W modelu wieloczynnikowej analizy regresji logitowej niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia przetrwałej oporności na ASA, definiowanej jako wartości CT ≤150 s podczas ≥2 wizyt, była liczba nieprzyjętych tabletek ASA (OR=4,67, p=0,006) oraz stężenie trójglicerydów >150 mg% (OR=3,19, p=0,046); jednoczesne przyjmowanie leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych okazało się niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia przetrwałej nieprawidłowej odpowiedzi na ASA (OR=0,23; p=0,040).

Wnioski: W badanej populacji aspirynoooporność stwierdzono u ok. 1/3 badanych, jednocześnie wykazano dużą zmienność oraz niestabilność zjawiska aspirynoooporności. Nieregularne przyjmowanie ASA jest najważniejszym czynnikiem wpływającym na występowanie oraz na utrzymywanie się aspirynoooporności w trakcie 2-letniej obserwacji. Regularne przyjmowanie dodatkowo innych leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych wpływało niekorzystnie na utrzymywanie się prawidłowej odpowiedzi na ASA.

591

Charakterystyka promotora genu *IGF-1* u chorych poddanych angiografii naczyń wieńcowych

Paweł Burchardt¹, Anna Goździcka-Józefiak², Witold Nowak³, Rafał Link⁴, Tomasz Grotowski⁴, Tomasz Siminiak⁵

¹ Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Medyczny, Poznań, Oddział Kardiologiczny, Szpital Wojewódzki, Poznań

² Zakład Wirusologii Molekularnej, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

³ Wydziałowa Pracownia Techniki Molekularnych, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

⁴ Szpital Rehabilitacyjno-Kardiologiczny, Kowanówko

⁵ Uniwersytet Medyczny, Poznań, Szpital Rehabilitacyjno-Kardiologiczny, Kowanówko

Wstęp: Rola insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 w etiologii miażdżycy naczyń wieńcowych nie jest jasna.

Cel: Celem ogólnym pracy była analiza molekularna rejonu promotorowego P1 genu *IGF-1*, określenie jego polimorfizmów i zestawienie ich z poziomami białka IGF-1, a także próba powiązania poziomów ogólnoustrojowego IGF-1 z zaawansowaniem miażdżycy naczyń wieńcowych. Wyniki analizy molekularnej zestawiano z danymi klinicznymi badanych osób.

Materiał i metody: Pobierano krew od 101 kolejnych chorych, u których wykonywano badanie koronarograficzne. W surowicy i osoczu oznaczano parametry gospodarki lipidowej oraz stężenia IGF-1 i IGF-1. Z komórek krwi izolowano DNA, który amplifikowano metodą PCR. Produkt analizowano metodą SSCP. Materiał wykazujący różnicę w migracji prążka DNA w analizie metodą SSCP był poddawany analizie sekwencyjnej.

Wyniki: U osób poddanych angiografii naczyń wieńcowych stwierdzono pięć polimorfizmów w rejonie promotorowym P1 genu *IGF-1*: Rs35767, Rs11829693, Rs5742612, Rs2288377, Rs17879774. Dla Rs35767 stwierdzono genotypy C/C, C/T i T/T. Dla Rs11829693 stwierdzono genotypy G/G i A/A (1,99%). Dla Rs5742612 stwierdzono genotypy C/T i T/T. Genotyp C/T istotnie częściej występował u chorych z udarem mózgu w wywiadzie. Dla Rs2288377 stwierdzono genotyp A/T (1,98%) i T/T. Dla Rs35767, genotyp T/T stwierdzono niższe stężenia IGF-1, IGFBP3 oraz niższą wartość ilorazu IGF-1/BMI. W grupie chorych z genotypem A/A dla Rs11829693 obserwowano wyższe w porównaniu z pozostałymi osobami poziomy IGF-1 (228,5 vs 197,2 ng/ml), IGFBP3 (3364,0 vs 2103,6 ng/ml) i wartości ilorazu IGF-1/BMI (7,93 vs 7,25). W grupie osób z chorobą 3 naczyń poziomy osoczowe IGF-1 były wyższe niż w grupie chorych bez zmian w obrazie angiograficznym i bez zawału mięśnia sercowego w wywiadzie ($p < 0,05$). Dodatkowo stwierdzono, że chorzy powyżej 95. centyla (powyżej 105 pkt) w zakresie nasilenia miażdżycy naczyń wieńcowych wg skali Gensiniego mają istotnie wyższe poziomy IGF-1 oraz niższe stężenia HDL w porównaniu z chorymi z 0 pkt w tej skali. Obserwowano związek niższych poziomów IGF-1, IGFBP3 oraz wartości ilorazu IGF-1/BMI z zaawansowanym wiekiem chorych ($p < 0,05$), a także niższe wartości ilorazu IGF-1/BMI u chorych z cukrzycą. U badanych osób stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy IGF-1 a TC, TG i LDL oraz wartością ilorazu IGF-1/BMI a TC, LDL, Lp (a), apoB-100 i korelację pomiędzy poziomami IGFBP3 a TC, LDL, TG, apoB-100.

Wnioski: Stwierdzono wyższe poziomy ogólnoustrojowe IGF-1 u chorych poddawanych planowej angiografii naczyń wieńcowych z zaawansowaną miażdżycą tętnic wieńcowych. Udział polimorfizmów w rejonie P1 genu *IGF-1* w miażdżycy tętnic wieńcowych wymaga weryfikacji w większej grupie chorych.

592

Agregaty płytkowo-leukocytarne, płytkowe i mikrocząstki w migotaniu przedsionków

Marcin Makowski¹, Ireneusz Smorąg², Andrzej Bissinger¹, Tomasz Grycewicz¹, Włodzimierz Grabowicz¹, Konrad Masiarek¹, Andrzej Lubiński¹, Zbigniew Baj²

¹ Klinika Kardiologii Interwencyjnej, Kardiodiabetologii i Rehabilitacji Kardiologicznej, I Katedra Kardiologii i Kardiologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

² Zakład Patofizjologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Wstęp: Migotanie przedsionków jest jedną z głównych przyczyn sercopolnego udaru mózgu. Mechanizmy uczestniczące w powstawaniu materiału zatorowego w jamach przedsionków uwzględniają wszystkie składowe triady Virchowa. Rola płytek krwi w powstawaniu powikłań zatorowych oraz tworzenie przez nie agregatów do chwili obecnej nie jest w pełni wyjaśniona.

Cel: Ocena wpływu migotania przedsionków na aktywację płytek krwi wyrażoną liczbą agregatów płytkowo-leukocytarnych,

płytkowych oraz mikrocząstek ocenianych metodą cytometrii przepływową.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano grupę 12 chorych leczonych z powodu przetrwałego migotania przedsionków w Klinice Kardiologii Interwencyjnej, Kardiodiabetologii i Rehabilitacji Kardiologicznej w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym nr 2 w Łodzi. W celu wykluczenia potencjalnego wpływu innych schorzeń na aktywację płytek z badania wyłączone osoby z chorobą wieńcową oraz ze współtowarzyszącymi chorobami zapalnymi. Chorzy w wieku 21–60 lat byli poddawani kardiowersji elektrycznej zgodnie z obowiązującymi standardami leczenia Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Krew pobierano z żyły obwodowej w dwóch punktach czasowych: w trakcie migotania przedsionków (T0) oraz po 4 tygodniach utrzymania rytmu zatokowego (T1). Ocena aktywacji płytek krwi, tworzenia agregatów płytkowych i płytkowo-leukocytarnych, została przeprowadzona z użyciem cytometru przepływowego. Analizie poddano ekspresję markera aktywacji płytek CD62, liczbę agregatów płytkowych, płytkowo-leukocytarnych oraz mikrocząstek wyrażoną jako odsetek płytek CD61-dodatnich.

Wyniki: Utrzymanie rytmu zatokowego (T1) powoduje istotne zmniejszenie odsetka agregatów płytkowo-leukocytarnych w stosunku do okresu migotania przedsionków T0 ($8,94 \pm 1,53$ vs $18,2 \pm 2,4\%$, $p < 0,05$). Zmianie tej towarzyszy również zmniejszenie reakcji uwalniania płytek ocenianej ekspresją receptora CD62 ($22,89 \pm 2,53$ vs $15,75 \pm 0,97$, $p < 0,05$). Obserwowano także istotne obniżenie odsetka agregatów płytkowych po utrzymaniu rytmu zatokowego ($4,82 \pm 0,75$ vs $3,2 \pm 0,447\%$, $p < 0,05$) oraz zmniejszenie odsetka mikrocząstek ($1,7 \pm 0,26$ vs $0,71 \pm 0,16\%$, $p < 0,05$).

Wnioski: Utrzymanie rytmu zatokowego powoduje zmniejszenie liczby agregatów płytkowo-leukocytarnych, płytkowych oraz mikrocząstek. Zwiększona liczba agregatów oraz mikrocząstek w trakcie arytmii może odgrywać rolę w patogenezie powikłań zakrzepowo-zatorowych w przebiegu migotania przedsionków.

593

Kwas antranilowy a stężenie CC-chemokin w osoczu chorych z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych zachowawczo

Dariusz Pawlak¹, Anna Kowalewska¹, Michał Myśliwiec², Krystyna Pawlak¹

¹ Samodzielna Pracownia Farmakoterapii Monitorowanej, Uniwersytet Medyczny, Białystok

² Klinika Nefrologii i Transplantologii, Uniwersytet Medyczny, Białystok

Wstęp: Choroby układu sercowo-naczyniowego, spowodowane procesem miażdżycowym, uznawane są za jedną z głównych przyczyn śmiertelności w populacji chorych z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN) leczonych zachowawczo. Wczesną zmianą miażdżycową charakteryzuje obecność makrofagów i limfocytów T w ścianie wewnętrznej naczynia połączona z proliferacją

komórek mięśni gładkich. CC-chemokiny (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES) należą do rodziny niskocząsteczkowych białek (8–10 kDa) zapoczątkowujących aktywację i migrację z krwi do tkanek komórek typu monocyt/makrofag i limfocyt. Kwas antranilowy (AA) jest jednym z metabolitów szlaku kinureninowego powstającym z kinureniny (KYN) pod wpływem kinureninazy. W literaturze dostępne są jedynie nieliczne doniesienia dotyczące tego odgałęzienia szlaku kinureninowego. Wykazano, że metabolit tego szlaku – kwas 3-hydroksyantranilowy, hamuje produkcję CCL2 w hodowli komórek śródbłonna.

Cel: Zbadanie ewentualnych powiązań szlaku KYN-AA z układem CC-chemokin, uczestniczącym w pierwszej fazie powstawania zmian miażdżycowych u chorych z PNN leczonych zachowawczo.

Materiał i metody: Pomiaru układu CC-chemokin, KYN, AA i stosunku AA/KYN odzwierciedlającego aktywność kinureninazy dokonano w osoczu 43 chorych z PNN i 16 osób zdrowych.

Wyniki: Stężenia KYN, AA, AA/KYN, CCL4 były znacząco wyższe ($p < 0,001$), z kolei CCL5 były istotnie obniżone ($p < 0,001$) w grupie chorych z PNN w porównaniu z osobami zdrowymi. Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach CCL2 i CCL4 pomiędzy obu badanymi grupami. KYN pozytywnie korelowała z poziomem CCL2 i CCL4 (oba $p < 0,05$), natomiast AA z CCL2 ($p < 0,05$), CCL3 ($p < 0,001$) i CCL4 ($p < 0,01$). Stwierdzono ponadto dodatnią zależność pomiędzy stosunkiem AA/KYN a stężeniami CCL3 ($p < 0,001$), CCL4 i CCL5 (oba $p < 0,05$).

Wnioski: Uzyskane wyniki sugerują wzajemne powiązanie układu CC-chemokin ze szlakiem KYN-AA u chorych z PNN, a poprzez to udział szlaku kinureninowego w powstawaniu zmian miażdżycowych w tej populacji chorych.

ny receptor (suPAR), kompleksy plazmina/antyplazmina (PAP), odzwierciedlające aktywność układu fibrynolizy, i stężenie QA, zostały oznaczone w osoczu 50 chorych z różnym stopniem PNN i 16 osób zdrowych (grupa kontrolna).

Wyniki: Stężenia QA, uPA, suPAR, PAP, PAI-1 (wszystkie $p < 0,001$) i tPA ($p < 0,01$) były znacząco wyższe w grupie chorych z PNN w porównaniu z osobami zdrowymi. Poziom QA dodatnio korelował ze stężeniami suPAR ($p < 0,01$) i PAP ($p < 0,001$) w grupie chorych z PNN. W modelu regresji wielokrotnej stężenia QA i suPAR okazały się niezależnymi czynnikami wpływającymi na poziom PAP, odzwierciedlający aktywność układu fibrynolizy w tej populacji chorych.

Wnioski: Powyższe wyniki wskazują, że QA nasila aktywność układu fibrynolizy u chorych na PNN leczonych zachowawczo, co może się przyczyniać do zaburzeń układu hemostazy i rozwoju CVD u tych chorych.

594

Kwas chinolinowy a układ fibrynolizy u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych zachowawczo

Krystyna Pawlak¹, Dariusz Pawlak¹,
Agnieszka Buraczewska-Buczko¹, Michał Myśliwiec²

¹ Samodzielna Pracownia Farmakoterapii Monitorowanej, Uniwersytet Medyczny, Białystok

² Klinika Nefrologii i Transplantologii, Uniwersytet Medyczny, Białystok

Wstęp i cel: Zaburzenia układu fibrynolizy, jeden z mechanizmów powstawania choroby sercowo-naczyniowej (CVD), są często obserwowanym powikłaniem przewlekłej niewydolności nerek (PNN). Kwas chinolinowy (QA) jest jednym z końcowych produktów przemian tryptofanu w szlaku kinureninowym. Wzrost jego stężenia odpowiedzialny jest za hamowanie procesu erythropoezy u chorych na PNN. Nie ma natomiast danych na temat powiązania QA z układem fibrynolizy w tej grupie chorych.

Metody: Parametry układu fibrynolizy: tkankowy aktywator plazminogenu (tPA), inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), aktywator plazminogenu typu urokinazy (uPA) i jego rozpuszczal-

596

Wpływ ograniczenia mechanizmów wolnorodnikowych na odpowiedzi regulacyjne układu krążenia wywołane przez hipoksję u szczurów z nadciśnieniem tętniczym szczepu SHR

Tomasz Wierzbą, Krzysztof Malinowski, Zofia Zielska

Katedra i Zakład Fizjologii, Akademia Medyczna, Gdańsk

Cel: Ocena wpływu nitroksylowego antyoksydanta tempola na wywołaną hipoksją hipobaryczną (HIP) odruchową odpowiedź ciśnieniową (DMAP) i sercową (DHR) oraz autonomiczną regulację rytmu serca.

Metody: Badania wykonano na szczurach (N=12, 311–365 g) SHR i ich odpowiednikach normotensyjnych WKY z wyprowadzonymi liniami tętniczą i do rejestracji EKG, którym podawano tempol (0,2 mM/kg *p.o.* przez 7 dni), po czym umieszczano w komorze hipobarycznej, w której obniżano (20 min) ciśnienie powietrza o 100 mmHg i 200 mmHg. Podczas HIP i po jej zakończeniu (REO) rejestrowano ciśnienie tętnicze i EKG. Wpływ układu autonomicznego na serce oceniano przez analizę zmienności rytmu serca (HRV).

Wyniki: HIP i REO wywoływała wzrost MAP ze zwolnieniem HR, zgodnie z pierwotnym wzorcem odruchu na pobudzenie chemoreceptorów tętniczych. U szczurów SHR odpowiedzi DMAP i DHR były mniejsze, co odpowiada zredukowanej reaktywności na pobudzenie chemoreceptorów tętniczych. Tempol ograniczał odpowiedzi DMAP i DHR na HIP i REO, w mniejszym stopniu w grupie SHR niż WKY. U SHR HRV była mniejsza, co przejawiało się niższą całkowitą mocą widma (TP) i jej składowych: VLF, LF i HF. Większy LF/HF u SHR potwierdza wzmożony udział komponenty współczulnej w regulacji HR. W spoczynku tempol zmniejszał TP i LF/HF, w większym stopniu w grupie WKY niż SHR. U WKY i w mniejszym stopniu SHR efektem HIP była redukcja TP, VLF, LF i HF oraz wykładników HRV w domenie czasowej: pNN2.5, rMSSD, SD1 (Poincaré).

Tempo znośił supresję TP podczas HIP i zwiększał HRV podczas REO, co zwiększa możliwości regulacyjne ustroju. W grupie WKY podczas HIP i REO wzrastał wpływ układu współczulnego na serce (wzrost LF/HF, przy zmniejszeniu ilorazu SD1/SD2). Efekt ten nie występował u SHR, które wykazywały niskie spoczynkowe wartości rMSSD i SD1, a także spadek LF/HF w odpowiedzi na HIP i REO.

Wnioski: Wyniki badań wskazują na ograniczenie ośrodkowych mechanizmów kontroli rytmu serca oraz zakresu odpowiedzi hemodynamicznych na HIP i REO u szczurów SHR. Ograniczenie mechanizmów wolnorodnikowych wywiera złożony wpływ na mechanizmy regulacji krążenia. W warunkach spoczynkowych tempo ograniczało autonomiczną kontrolę rytmu serca i odpowiedź ciśnieniową i sercową na HIP i REO. Z drugiej strony, jak wskazuje analiza HRV, tempo znośił supresję autonomicznej regulacji rytmu serca wywołaną przez HIP. U szczurów SHR wpływ ograniczenia mechanizmów wolnorodnikowych był ilościowo mniejszy: zarówno w warunkach spoczynkowych, jak też podczas HIP. Potencjalnie korzystnym działaniem tempola u szczurów SHR, nieobserwowanym u ich odpowiedników normotensyjnych, było zmniejszenie udziału komponenty współczulnej regulacji rytmu serca podczas hipoksji.

Praca finansowana z grantów W-719, W-503 i A-7 Akademii Medycznej w Gdańsku.

597

Incydenty niedokrwienia i zaburzenia kurczliwości w sercach ze zwiększoną objętością późnorozkurczową. Wpływ aktywacji dehydrogenazy pirogronianowej

Agnieszka Skierczyńska, Andrzej Beręsewicz

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Wstęp: Niewydolne serca, z niejasnych powodów, mają zmniejszoną rezerwę wieńcową. W czasie wysiłku może to być przyczyną incydentów niedokrwienia i nasilenia istniejących zaburzeń kurczliwości miokardium w mechanizmie analogicznym do anginy wysiłkowej (ang. *demand-induced ischemia*, DII). Pośrednie i bezpośrednie aktywatory dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) zwiększają tolerancję wysiłku u osób z chorobą niedokrwinną serca i być może mogą być również skuteczne w leczeniu niewydolności serca.

Cel: Zbadanie czy: (1) sztuczne rozdęcie lewej komory serca powoduje spadek rezerwy wieńcowej; (2) zwiększone obciążenie serca z tak powiększoną komorą powoduje niedokrwienie typu DII i związane z tym zaburzenia kurczliwości miokardium; (3) zaburzeniom tym zapobiega aktywacja PDH za pomocą kwasu dwuchlorooctowego (DCA).

Materiał i metody: Izolowane serca szczurów były perfundowane metodą Langendorffa. W lewej komorze umieszczono lateksowy balon umożliwiający kontrolowane zwiększanie objętości/ciśnienia późnorozkurczowego (LVEDP) oraz pomiar ciśnienia komorowego i rytmu serca. Mierzono: przepływ wieńcowy, rezerwę wieńcową, zużycie tlenu (MVO_2), produkcję kwasu mlekowego oraz utlenianie glukozy i kwasów tłuszczowych przez serce. W tym ostatnim celu serca były perfundowane płynem zawierającym ^{14}C -glukozę (w procesie utleniania jest przekształcana w mierzony następnie znakowany $^{14}CO_2$) oraz 3H -kwas palmitynowy (w procesie utleniania jest przekształcany w znakowaną 3H_2O).

Wyniki: Wzrost LVEDP od 5 mmHg (grupa LVEDP-5) do 40 mmHg (LVEDP-40) w izolowanych sercach spowodował niewielki spadek przepływu wieńcowego i niemal całkowitą utratę rezerwy wieńcowej. W grupie LVEDP-5 dobutamina powodowała przyspieszenie rytmu serca, zwiększała ciśnienie komorowe, przepływ wieńcowy, MVO_2 oraz utlenianie glukozy i kwasów tłuszczowych, natomiast nie wpływała istotnie na sercową produkcję kwasu mlekowego. W grupie LVEDP-40 dobutamina powodowała prawidłowy wzrost rytmu serca, nie wpływała istotnie na ciśnienie komorowe, przepływ wieńcowy, MVO_2 , nieznacznie zwiększała utlenianie glukozy, nie wpływała na utlenianie palmitynianu oraz 2-krotnie zwiększała sercową produkcję kwasu mlekowego. Infuzja DCA w grupie LVEDP-40 powodowała 2-krotny wzrost utleniania glukozy, a dodatkowe obciążenie tych serc dobutaminą powodowało wzrost ciśnienia komorowego i brak wzrostu produkcji kwasu mlekowego.

Wnioski: Wzrost LVEDP ogranicza rezerwę wieńcową, co jest przyczyną niedokrwienia typu DII podczas zwiększonego obciążenia metabolicznego serca. DCA – bezpośredni aktywator PDH, zwiększa utlenianie glukozy, zmniejsza sercową produkcję kwasu mlekowego i poprawia kurczliwość niedokrwionego miokardium poprzez wzrost efektywności mechanicznej serca.

598

Sezonowy stres oksydacyjny i dysfunkcja śródbłonna w sercu świnki morskiej

Anna Konior, Emilia Klemenska, Andrzej Beręsewicz

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Wstęp: W grupie młodych, zdrowych ochotników wykazano (*Eur J Epidemiol* 2005; 20: 407) upośledzenie czynności śródbłonna (FMD) obecne jedynie w miesiącach letnich. Niewykluczone, że sezonowa dysfunkcja przyczynia się do znanego letniego wzrostu częstości incydentów sercowo-naczyniowych i zgonów sercowych.

Cel: (1) Prześledzenie miesiąc po miesiącu sezonowych zmian czynności śródbłonna w sercu świnki morskiej. (2) Zbadanie, czy sezonowa dysfunkcja śródbłonna w tym modelu ma związek z sezonową nadprodukcją anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) i związaną z tym zmniejszoną biodostępnością i/lub produkcją

tlenku azotu (NO). (3) Zbadanie udziału oksydazy NADPH, oksydazy ksantynowej (XO) i syntazy NO w zwiększonej sercowej produkcji $O_2^{\cdot-}$ stwierdzanej w lecie.

Materiał i metody: Serca świnki morskiej perfundowano metodą Langendorffa i mierzono: (1) przepływ wieńcowy; (2) zmiany przepływu wieńcowego pod wpływem acetylocholiny (ACh, miara naczyniorozszerzającej czynności śródbłonna); (3) sercową produkcję $O_2^{\cdot-}$ (metoda z cytochromem c) oraz azotynów i azotanów (miara produkcji NO), a także (*i.v.*) aktywność oksydazy NADPH i XO w homogenatach serca. Badania te prowadzono systematycznie miesiąc po miesiącu przez 2 kolejne lata kalendarzowe.

Wyniki: W okresie od czerwca do września, w porównaniu z okresem od października do maja, przepływ wieńcowy wzrósł o 60%, odpowiedź acetylocholina zmniejszyła się o 90%, produkcja $O_2^{\cdot-}$ wzrosła o 60%, a aktywność oksydazy NADPH i XO wzrosła odpowiednio o 100 i 35%, zmiany te były podobne u obu płci. Produkcja NO utrzymywała się na stałym poziomie w ciągu całego roku, jednakże proporcja azotyny/azotany, która w okresie od października do maja wynosiła 70/30%, w okresie od czerwca do września wynosiła tylko 25/75%. W okresie od czerwca do września dymutaza ponadtlenkowa, apocynina (inhibitor oksydazy NADPH) oraz allopurinol (inhibitor XO), ale nie L-NMMA (inhibitor NOS), normalizowały do wartości obserwowanych w okresie od października do maja sercową produkcję $O_2^{\cdot-}$, przepływ wieńcowy i proporcję azotyny/azotany.

Wnioski: Letnia dysfunkcja śródbłonna wieńcowego w sercu świnki morskiej: (1) nie zależy od płci zwierzęcia; (2) jest wynikiem sercowej nadprodukcji $O_2^{\cdot-}$ przez oksydazę NADPH i XO oraz (3) jest rezultatem zmniejszonej biodostępności NO przy niezminionej jego całkowitej produkcji.

599

Rola kompleksu czynnościowego SOD – oksydaza NADPH – oksydaza ksantynowa w utrzymaniu równowagi oksydacyjnej w izolowanym sercu świnki morskiej

Emilia Klemenska, Anna Konior, Andrzej Beręsewicz

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Wstęp: Wykazaliśmy, że anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) produkowany przez oksydazę ksantynową (XO) jest bezpośrednią przyczyną dysfunkcji śródbłonnej w niedokrwionym/reperfundowanym sercu świnki morskiej, a także w sercu poddanym działaniu endoteliny (ET-1). Wykazaliśmy ponadto, że aktywatorem XO w tych stanach jest oksydaza NADPH działająca poprzez $O_2^{\cdot-}$.

Cel: Weryfikacja hipotezy, że (1) oksydaza NADPH i XO aktywują się nawzajem, (2) poziom aktywności systemu oksydazy NADPH – XO zależy od komórkowego poziomu $O_2^{\cdot-}$, o którym decyduje komórkowa aktywność dymutazy ponadtlenkowej (SOD).

Materiał i metody: Izolowane serca świnki morskiej były perfundowane metodą Langendorffa w obecności lub nieobecności: (1) 2,5 mM NADPH – substratu dla oksydazy NADPH; (2) 20 mM hipoksantyny – substratu dla XO, oraz (3) 20 mM DETC (*diethyl-dithiocarbamic acid*) – inhibitora SOD. We wszystkich sercach mierzono sercową produkcję $O_2^{\cdot-}$ metodą z cytochromem c, zmiany przepływu wieńcowego pod wpływem acetylocholiny (ACh, miara naczyniorozkurczowej czynności śródbłonna) oraz aktywność oksydazy NADPH i XO w homogenatach serca.

Wyniki: NADPH, hipoksantyna i DETC w podobny sposób zwiększały sercową produkcję $O_2^{\cdot-}$, aktywność NADPH oksydazy oraz XO i w podobny sposób upośledzały reakcję naczyń wieńcowych na ACh.

Wnioski: Naczyniowa oksydaza NADPH i XO stanowią kompleks czynnościowy, w którym enzymy te aktywują się nawzajem w mechanizmie dodatniego sprzężenia zwrotnego. Aktywność tego kompleksu jest regulowana komórkowym poziomem $O_2^{\cdot-}$, który zależy od aktywności SOD. Badanie sugeruje dodatkową ważną rolę SOD (wymiatanie $O_2^{\cdot-}$ i hamowanie aktywności systemów produkujących $O_2^{\cdot-}$) w kontroli naczyniowego stresu oksydacyjnego i jego konsekwencji.

600

Wpływ hiperoksji na ciśnienie centralne u ludzi

Piotr Abramczyk, Anna Dobosiewicz, Maciej Siński, Joanna Bidiuk, Jacek Lewandowski

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Nadciśnienia Tętniczego i Angiologii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wstęp: Wykazano, że hiperoksja hamuje aktywność współczulną, ale jej wpływ na ciśnienie tętnicze nadal pozostaje niejasny. Analiza fali tętna pozwala na ocenę zmian ciśnienia tętniczego na poziomie aorty wstępującej i daje dokładniejszy wgląd w zmiany hemodynamiczne, na które składają się funkcja skurczowa serca oraz wielkość i szybkość fali odbitej.

Cel: Ocena wpływu hiperoksji na ciśnienie centralne u ludzi.

Materiał i metody: W badaniu wzięło udział 16 młodych zdrowych osób, u których rejestrowano kształt fali tętna na tętnicy promieniowej metodą tonometrii aplanacyjnej przed i po 10-minutowym oddychaniu mieszaną hiperoksygeną. Na podstawie analizy fali tętna (ang. *pulse wave analysis*, PWA) obliczono parametry ciśnienia centralnego w aorcie.

Wyniki: Hiperoksja nie zmieniła wartości ciśnienia tętniczego w aorcie, zwiększyła natomiast znamienne ciśnienie wzmocnienia ($-1,7 \pm 3,5$ vs $-0,5 \pm 2,5$ mmHg, $p=0,005$), wskaźnik wzmocnienia ($-6,5 \pm 13,3$ vs $-2,2 \pm 9,2\%$, $p=0,004$) oraz wydłużyła czas skurczu lewej komory ($324,3 \pm 16,4$ vs $331,7 \pm 17,7$ ms, $p < 0,01$).

Wnioski: Hiperoksja zmienia kształt aortalnej fali tętna prawdopodobnie w wyniku zwiększenia oporu obwodowego, który równoważy hamujący wpływ tlenu na chemoreceptory i aktywność współczulną.

601

Badanie poziomu ekspresji receptorów typu *scavenger* na monocytach u osób z rozpoznaną chorobą niedokrwinną serca

Michał Piechota, Robert Plewa

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

Wstęp: Receptory typu *scavenger* (receptory „zmiatające”) należą do dużej grupy białek obecnych na powierzchni m.in. monocytów i makrofagów. Receptory te odgrywają szczególną rolę w patogenezie miażdżycy jako białka odpowiedzialne za wiązanie modyfikowanych cząsteczek LDL na powierzchni monocytów i makrofagów. Powstałe w wyniku oksydacji bądź acetylacji lipoproteiny (oxLDL lub acLDL) są silnym czynnikiem zapalnym w ścianach tętnic oraz czynnikiem chemotaktycznym dla napływu monocytów. Monocyty ulegają aktywacji do makrofagów, które wyłapują modyfikowane LDL dzięki obecności na powierzchni błony komórkowej receptorów „zmiatających”, po czym gromadzą je wewnątrz komórki. Gromadząc nadmiar zmodyfikowanych lipoprotein, makrofagi przekształcają się w komórki piankowe stanowiące podstawowy element budulcowy płytki miażdżycowej. Badania przeprowadzone na modyfikowanych genetycznie myszach pozbawionych ekspresji receptora CD36, SR-A lub obydwu białek oraz prace, w trakcie których badano makrofagi osób z wrodzonym niedoborem CD36, potwierdziły ważną rolę receptorów w patogenezie miażdżycy. Stwierdzono też, iż brak receptorów CD36 i SR-A hamuje rozwój miażdżycy nawet przy stosowaniu diety o dużej zawartości tłuszczów nasyconych.

Cel: Ocena poziomu transkrypty genów receptorów *scavenger* CD36 i SR-A u chorych z rozpoznaną chorobą niedokrwinną serca oraz określenie wpływu atorwastatyny i simwastatyny na poziom ekspresji tych genów u chorych poddanych leczeniu. Na pracę składały się: izolacja RNA z krwi obwodowej oraz reakcja *real-time* PCR do określania poziomu ekspresji genów.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiła krew chorych z miażdżycą tętnic wieńcowych. Grupa badana liczyła 35 osób (w tym 18 kobiet) w wieku 45–80 lat (średnio 60 lat). Spośród całej grupy 10 chorych przeszło wcześniej zawał serca, u wszystkich stwierdzono też w badaniu koronograficznym co najmniej jedno istotne zwężenie (co najmniej 70%) głównych tętnic wieńcowych. Większość chorych została poddana zabiegowi angioplastyki wieńcowej lub zakwalifikowana do niego.

Wyniki: W grupie badanej wykazano podwyższony poziom ekspresji obydwu białek u większości chorych. Wzrost ekspresji mRNA receptora CD36 wyniósł 18–45%, natomiast wzrost ekspresji mRNA receptora SR-A wyniósł 53–118%, w stosunku do grupy kontrolnej.

Wnioski: Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, iż podwyższony poziom ekspresji receptorów odpowiedzialnych za gromadzenie modyfikowanych lipoprotein sprzyja powstawaniu komórek piankowych, a tym samym tworzeniu się blaszki miażdżycowej.

602

Practical use of the newest experimental model of atherosclerosis: apoE/LDLR – double knockout mice

Jacek Jawień¹, Mariusz Gajda²

¹ Katedra Farmakologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

² Katedra Histologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Background: Nowadays the best experimental model of atherosclerosis is connected with ‘gene – targeting’ method (Nobel Prize in Medicine 2007). By knockout of apolipoprotein E or/and LDL receptor in mice, there were created models which helped in establishing a new theory of atherosclerosis – as an inflammatory disease. Using these models it is also possible to investigate a putative anti-atherosclerotic effect of drugs. In 2004 we established in Krakow apoE/LDLR-double knockout mice model of experimental atherosclerosis. Then we checked several drugs.

Aim: Our working hypothesis was: antileukotriene drugs (five lipoxygenase activating protein inhibitors: MK-886 and BAYx1005 and LTs receptor antagonist – montelukast as well as anti-NF-κB drugs (PDTC and curcumin) ameliorate the development of atherosclerotic lesions.

Material and methods: 60 female 8-week-old apoE/LDLR – double knockout mice (n=10 in each group) were fed by Western diet (consisting of 21% of fat by weight and 0.15% of cholesterol by weight). Experimental groups received the same diet, mixed with: MK-886 in a dose of 30 mg/day/kg b.w., BAYx 1005 in a dose of 18.75 mg/day/kg b.w., montelukast in a dose of 30 mg/day/kg b.w., PDTC in a dose of 150 mg/day/kg b.w. and curcumin in a dose of 7.5 mg/day/kg b.w. At the age of 24 weeks these mice were sacrificed and plasma, hearts and aortas were taken.

Results: Measured by ‘en face’ method, the percentage of occupied by Sudan IV – stained surfaces were: 25.15% in control group, whereas in MK-886 – treated group 11.16%, in BAYx1005 group 15.16%, in montelukast group 17.23%, in PDTC group 15.63%, and in curcumin group 19.2%. Measured in 8 consecutive sections mean surfaces, occupied by oil red-O stained changes were: 455 494 μm² in control group vs. 263 042 μm² in MK-886 group, 277 107 μm² in BAYx1005 group, 303 599 μm² in curcumin group, 291 695 in PDTC group, and 299 201 μm² in montelukast group. All the differences were statistically significant.

Conclusions: To sum up, it was described for the first time that in apoE/LDLR - double knockout mice inhibition of FLAP, cysteinyl leukotrienes receptors as well as NF-κB decreases atherosclerosis.

604

Influence of aerobic training on adiponectin and leptin levels

Magdalena Kosydar-Piechna¹, Maria Bilińska¹,
Jadwiga Janas², Ryszard Piotrowicz¹

¹ Klinika i Zakład Rehabilitacji Kardiologicznej i Elektrokardiologii
Nieinwazyjnej, Instytut Kardiologii, Warszawa-Anin

² Instytut Kardiologii, Warszawa-Anin

Background: Adipose tissue is now recognized as an active endocrine organ and releases proteins termed adipokines including such hormones as leptin and adiponectin. Adiponectin has drawn much attention because of its insulinsensitizing and antiatherogenic actions. Leptin is the main factor linking obesity, increased sympathetic nervous system activity and hypertension. Weight loss and some drug therapies have influenced significantly a simultaneous increase in adiponectin and decrease in leptin levels, but the effects of physical activity (aerobic training) on adiponectin and leptin levels in patients with coronary artery disease are unknown.

Aim: This study was designed to examine the influence of aerobic training on adiponectin and leptin levels in patients with coronary artery disease.

Methods: Sixty-four males, mean age 55.6±6 years, at least 2 months after CABG, were randomized to either 6 weeks of aerobic training, three times a week, at 60-80% of maximal estimated heart rate (training group, TG, n=32) or to a control group (n=32). Exercise stress test was performed and body mass index (BMI), waist-to-hip ratio (WHR) and plasma levels of adiponectin and leptin were measured at the beginning and at the end of the study.

Results: Physical capacity increased significantly only in TG pts (max workload in METs from 7.7±1.4 to 8.2±1.4, p <0.05). There were no differences between the beginning and the end of the study in either group in BMI (respectively, TG 27.3±2.8 vs. 27.4±2.8 kg/m², NS; control group 28.0±3.2 vs. 28.4±3.6 kg/m², NS), in WHR (respectively, TG 1.02±0.05 vs. 1.01±0.05, NS; control group 1.03±0.05 vs. 1.03±0.06, NS), and in levels of adiponectin (TG 6.7±2.5 vs. 6.9±2.5 ng/ml, NS; control group 6.5±2.6 vs. 6.5±1.8 ng/ml, NS). The level of leptin was the same at the beginning and the end of study in TG (6.7±3.2 vs. 6.9±3.6, NS), but we observed a significantly increased level of leptin in the control group at the end of study in comparison to that observed at the beginning (respectively, 8.0±4.0 vs. 9.3±5.2, p <0.02).

Conclusions:

1. A short period of aerobic training improved the physical capacity, but it did not influence on BMI, WHR and the adiponectin level.
2. Aerobic training prevented an increase in leptin levels in patients who underwent such training.
3. These findings may support the hypothesis that exercise decreases leptin-resistance and improves signal transduction in the hypothalamus.

605

Możliwość zastosowania zaawansowanych metod echokardiograficznych oceny funkcji mięśnia sercowego u myszy z zawałem serca

Jarosław Kasprzak¹, Ewa Szymczyk¹, Piotr Lipiec¹,
Michał Plewka¹, Małgorzata Białas², Marta Olszewska²,
Karol Kamiński³, Maciej Kurpisz²

¹ Zakład Szybkiej Diagnostyki Kardiologicznej, II Katedra Kardiologii,
Uniwersytet Medyczny, Łódź

² Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

³ Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny, Białystok

Wstęp: Techniki echokardiograficzne są coraz powszechniej wykorzystywane do badania zwierząt doświadczalnych.

Cel: Ocena możliwości zastosowania i użyteczności różnych technik echokardiograficznych do analizy strukturalnych i funkcjonalnych zmian pojawiających się w zawałe mięśnia sercowego u myszy.

Materiał i metody: Do grupy badanej włączono 12 myszy, spośród których 3 przydzielono do podgrupy kontrolnej, a u pozostałych 9 indukowano zawał mięśnia sercowego poprzez podwiązanie naczyń wieńcowych. Wszystkie zwierzęta poddano znieczuleniu i zarejestrowano obrazy mięśnia sercowego przy użyciu sondy M12L w trybach: M-mode, obrazowania dwuwymiarowego (2D) w dwóch projekcjach (krótkiej i długiej przymostkowej osi serca) oraz doplera tkankowego. Dane były analizowane w trybie *off-line* przez dwóch niezależnych badaczy, którzy oceniali następujące parametry: grubienie przedniej i tylnej ściany lewej komory (aWT i pWT), amplitudę odkształcania oraz tempo regionalnego odkształcania ściany przedniej (aS/SR) i tylnej (pS/SR) mięśnia lewej komory, frakcję skracania (FS) oraz zmianę pola powierzchni (AC%).

Wyniki: Uzyskane obrazy pozwoliły na wiarygodną ocenę aWT, pWT, aS/aSR, pS/pSR, FS i AC%, odpowiednio w 50, 75, 91,6, 91,6, 75 i 66,6% przypadków. Średni czas badania dla WT, S/SR, FS i AC% wynosił odpowiednio 1,3±0,5, 1±0,5, 1±0,4 i 2±0,3 min.

Wnioski: Obliczenie amplitudy odkształcania oraz tempa regionalnego odkształcania jest metodą mniej czasochłonną i jednocześnie łatwiejszą w wykonaniu niż ocena grubienia ścian, frakcji skracania i zmiany pola powierzchni, dzięki czemu parametry te mogą być wykorzystywane do oceny strukturalnych i funkcjonalnych zmian w zawałe mięśnia sercowego u myszy.

606

Powtarzalność wyników uzyskiwanych za pomocą różnych technik echokardiograficznych przy ocenie funkcji mięśnia sercowego u myszy z zawałem serca

Ewa Szymczyk¹, Piotr Lipiec¹, Jarosław Kasprzak¹, Michał Plewka¹, Małgorzata Białas², Marta Olszewska², Karol Kamiński³, Maciej Kurpisz²

¹ Zakład Szybkiej Diagnostyki Kardiologicznej, II Katedra Kardiologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

² Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

³ Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny, Białystok

Wstęp: Istotnym problemem w wyborze metody diagnostycznej w badaniach naukowych jest uzyskanie wysokiej powtarzalności wyników.

Cel: Ocena powtarzalności wyników uzyskiwanych za pomocą różnych technik echokardiograficznych do analizy strukturalnych i funkcjonalnych zmian pojawiających się w zawałe mięśnia sercowego u myszy.

Materiał i metody: Grupę badaną stanowiło 12 myszy, które przydzielono do jednej z dwóch podgrup: (1) kontrolna – 3 myszy ze zdrowym mięśniem sercowym, oraz (2) badana – 9 myszy, u których indukowano zawał mięśnia sercowego poprzez podwiązanie naczyń wieńcowych. Przed przystąpieniem do badania echokardiograficznego każdą z myszy znieczulono. Do badań używano sondy M12L, uzyskano obrazy mięśnia sercowego w trybie: M-mode, echokardiografii dwuwymiarowej w krótkiej i długiej przymostkowej osi serca oraz doplera tkankowego. Dwóch niezależnych badaczy analizowało dane w trybie *off-line*, oceniając grubienie przedniej i tylnej ściany lewej komory (aWT i pWT), amplitudę odkształcania oraz tempo regionalnego odkształcania ściany przedniej (aS/SR) i tylnej (pS/SR) mięśnia lewej komory, frakcję skracania (FS) oraz zmianę pola powierzchni (AC%).

Wyniki: Współczynnik korelacji między pomiarami aWT, pWT, aS/aSR, pS/pSR, FS i AC% uzyskanymi przez dwóch niezależnych badaczy wynosił odpowiednio $r=0,61$ ($p=0,04$), $r=0,93$ ($p<0,0001$), $r=0,98$ ($p<0,0001$), $r=0,88$ ($p=0,0002$), $r=0,61$ ($p=0,04$) i $r=0,76$ ($p=0,004$).

Wnioski: Obliczenie amplitudy odkształcania oraz tempa regionalnego odkształcania jest metodą łatwiejszą w wykonaniu niż ocena grubienia ścian, frakcji skracania i zmiany pola powierzchni, a przez to bardziej powtarzalną. Wysoka powtarzalność obliczeń utwierdza w przekonaniu, że metody te mogą być wykorzystywane w ocenie strukturalnych i funkcjonalnych zmian w zawałe mięśnia sercowego u myszy.

607

Human cardiac stem cells are present in severely damaged, ischemic myocardium

Michał Zembala¹, Piotr Wilczek¹, Tomasz Cichoń², Ryszard Smolarczyk², Roman Przybylski¹, Adam Sokal³, Stanisław Szala², Marian Zembala¹

¹ Department of Cardiac Surgery and Transplantology, Silesian Center for Heart Disease, Zabrze

² Maria Curie Skłodowska Institute of Oncology, Division of Molecular Biology, Gliwice

³ 1st Department of Cardiology, Silesian Center for Heart Diseases, Zabrze

Background: Functional restoration of the damaged heart presents a formidable challenge and developing strategies for treatment and prevention of ischemic heart failure remain of utmost priority. Cells capable of self-renewal and bearing the potential of plasticity have recently been proven to reside in the myocardium. These specific cardiac stem/progenitor cells (CSCs/CPCs) are multipotent and clonogenic, giving rise to cardiomyocytes, smooth muscle cells and endothelial cells in both in vivo and in vitro.

Aim: The aim of this study was to assess pool of CSC/CPCs present in severely damaged, ischemic human heart excised from patients undergoing cardiac transplantation.

Methods: Myocardial tissue samples were taken from the explanted hearts (right atrium, left atrium, left ventricular apex) under sterile conditions, immediately the heart had been removed from the recipient. Tissue samples were then minced and cultured in IMDM medium (standard conditions 5% CO₂ at 37°C). Culture medium was changed every 2-3 days. After the cells had grown to confluence they were detached by gentle enzymatic digestion and reseeded for expansions on fibronectin coated dishes. After the expansion cardiosphere forming cells were cultured on the PolyD-lisylne coated dishes, in cardiosphere-specific medium. Flow cytometry and fluorescent microscopic techniques were used to verify presence/absence of specific markers (c-kit, CD105, CD166, CD31 and CD166).

Results: After 2-3 weeks a monolayer of fibroblast like cells was generated from the adherent explants, over which small phase-bright cells migrated. After expansion of the primary culture, cells were reseeded on the polyD-lisylne coated dishes, on which cells formed cardiospheres. The size of the cardiospheres altered from 20 μm at the beginning to 180 μm after 1-2 weeks. Both in the in the primary and secondary culture cells were positive for c-kit, CD105 and CD166 but negative for endothelial (CD 31) myocardial and smooth muscle cell lineages. Hematopoietic cell markers were also not found.

Conclusions: Severely damaged, ischemic human heart still contains a pool of undifferentiated, multipotent cells. However, quantity of these cells may be insufficient for successful auto-repair to occur.

608

In vivo assessment of cardiac substrate utilisation by isotopomer analysis with mass spectrometry

Małgorzata Łangowska, Ryszard T. Smoleński

Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna, Gdańsk

Background: The healthy adult heart uses mainly fatty acids as its energy source but there is strong evidence that glucose could be a better substrate under ischemic conditions or in heart failure. The cardiac energy source is regulated at many levels and depends on several factors such as substrate availability, energy demands, oxygen supply. Progress of research in this field is limited by availability of methods to study substrate preference, particularly in vivo.

Aim: We aimed to develop procedure that applies stable isotopes analysis with mass spectrometry to delineate the amount of carbohydrates involved in the energy metabolism. **Methods:** To assess cardiac glucose utilization in vivo [1-13C] glucose was injected into male C57 mice. Then, after different time from injection hearts were removed and extracted and contribution of glucose to glycolysis and carbohydrate to TCA cycle was estimated by analysis of the enrichment of alanine and glutamate with 13C. To test ability of this method to detect changes in cardiac energy metabolism we used insulin.

Results: [13C] alanine increase from <2% to 35% of total alanine after [1-13C] glucose injection. After insulin injection before [1-13C] glucose administration [13C] alanine increased to 65%. [13C] Glutamate increased in present set of experiments up to 62% of total glutamate, above 13C enrichment of alanine, most likely as the consequence of 13C incorporation at several positions.

Conclusions: We conclude that analysis of cardiac substrate preference by mass spectrometric isotopomer analysis is promising technique to study in vivo metabolic changes but further improvement is necessary, particularly to obtain exact positional information for glutamate.

Cel: Ocena właściwości przeciwskurczowych tkanki okołonacyniowej (PVT) tętnicy piersiowej wewnętrznej (ITA) i jej wpływu na funkcję skurczową żyły odpiszczelowej (SV) oraz tętnicy promieniowej (RA).

Materiał i metody: Fragmenty ludzkiej ITA, SV oraz RA poddano badaniu w warunkach *in vitro*. W każdym doświadczeniu dwa fragmenty naczynia pozbawionego PVT badano w dwóch kąpielach tkankowych. Najpierw badano reaktywność ITA (n=10). Fragment ITA pobrany od jednego chorego szkieletowano i dzielono na dwa kawałki. Pierwszy inkubowano samodzielnie, drugi wraz z PVT pozostałą ze szkieletowania. Oba fragmenty poddawano jednoczesnemu działaniu wzrastających dawek serotoniny (10-9-10-4M). PVT przenoszono następnie z jednej kąpeli do drugiej i powtarzano protokół odpowiedzi na serotoninę. Ten sam protokół stosowano dla SV (n=12) i RA (n=8), używając PVT pozostałej ze szkieletowania ITA od tego samego chorego. Parametry analizy regresji uśrednionych krzywych dawka-efekt (Emax oraz $pD2 = -\log EC50$) porównywano testem t-Studenta.

Wyniki: Tkanka okołonacyniowa osłabiła siłę skurczu ITA [Emax 41±5 vs 20±3 mN, odpowiednio PVT (-) i PVT (+); $p < 0,001$]. Obecność PVT w kąpeli nie wpłynęła na wrażliwość (EC50) ITA na serotoninę, odpowiednio $pD2$: 6,2±0,3 i 5,8±0,3, $p=0,3$. Czynniki przeciwskurczowe wydzielane przez tkankę okołonacyniową ITA nie wpłynęły na funkcję skurczową żyły odpiszczelowej i tętnicy promieniowej. SV: Emax 91±6 vs 100±6 mN; $p=0,33$; RA: Emax 123±11 vs 128±13 mN, odpowiednio PVT (+) i PVT (-); $p=0,73$. Wrażliwość SV oraz RA nie uległa zmianie pod wpływem obecności PVT.

Wnioski: Tkanka okołonacyniowa ITA wydziela rozpuszczalny czynnik osłabiający siłę skurczu tętnicy, który może tym samym zapobiegać jej spazmowi. Czynniki ten nie wpływa na funkcję skurczową SV i RA, co może sugerować, że substancja ta jest specyficzna naczyniowo.

609

Tkanka okołonacyniowa tętnicy piersiowej wewnętrznej wydziela specyficzny naczyniowo czynnik przeciwskurczowy

Marcin Malinowski¹, Marek A. Deja¹, Krzysztof S. Gołba², Piotr Janusiewicz¹, Tomasz Roleder², Stanisław Woś¹

¹ II Klinika Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Górnośląski Ośrodek Kardiologii, SPSK Nr 7, Katowice

² Katedra i Klinika Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

610

Wpływ inhibitorów konwertazy angiotensyny na układ hemostazy u starych szczurów

Anna Gromotowicz¹, Andrzej Karp¹, Adrian Stankiewicz¹, Janusz Szmaj², Ewa Chabińska¹

¹ Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny, Białystok

² Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Wstęp: Inhibitory konwertazy angiotensyny (ACE-I) wykazują efekty plejotropowe, związane z działaniem ochronnym na śródbłonek, działaniem profibrynolitycznym, antykoagulacyjnym i przeciwplateletowym. Wykazano silny przeciwzakrzepowy efekt działania ACE-I u młodych i dorosłych szczurów, zależny m.in. od śródbłonkowego NO. Wiadomo, iż z wiekiem dochodzi do dysfunkcji śródbłonka związanej ze spadkiem biodostępności tlenu azotu (NO) i zmianami hemostazy. Powstaje pytanie, czy w starszym organizmie przeciwzakrzepowy efekt działania ACE-I jest równie silnie wyrażony?

Cel: Ocena przeciwzakrzepowego działania ACE-I u starych szczurów oraz określenie udziału czynników hemostazy i śródbłonkowego NO w mechanizmie działania ACE-I.

Materiał i metody: Badania wykonano na 18-miesięcznych szczurach szczepu Wistar. Zwierzętom podano: kaptopryl – ACE-I zawierający grupę –SH (KAP, 25 mg/kg), enalapryl – osoczowy ACE-I (ENA, 15 mg/kg), chinapryl – tkankowy ACE-I (CHIN, 3 mg/kg), VEH (5% roztwór gumy arabskiej), inhibitor śródbłonkowej syntazy NO (L-NAME, 30 mg/kg), prekursor NO – L-argininę (LA, 1000 mg/kg). Efekt przeciwzakrzepowy zbadano w modelu zakrzepicy żyłnej na podstawie pomiaru masy zakrzepu. Oceniono hemostazę pierwotną (adhezja płytek krwi do kolagenu). W osoczu oznaczono: stężenie czynnika tkankowego (TF), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1), czynnika von Willebrandta (vWF), stężenie aldehydu dimalonowego (MDA), metabolitów NO oraz w aorcie ekspresję syntazy NO (NOS).

Wyniki: Wykazano różnice parametrów wyjściowych w grupach kontrolnych starych szczurów i szczurów dorosłych (większa masa zakrzepu, podwyższone stężenia TF i PAI-1, obniżone stężenie t-PA i ekspresji NOS). KAP, ENA i CHIN nieznacznie redukowały masę zakrzepu u starych szczurów. Ani zahamowanie syntezy NO (L-NAME), ani pobudzenie syntezy NO (LA) nie zmieniało wpływu leków na masę zakrzepu. Leki istotnie obniżyły stężenie TF i PAI-1, najsilniej po CHIN. CHIN istotnie podwyższył poziom t-PA. Adhezję płytek krwi hamowały wszystkie ACE-I, najsilniejszy efekt wywierał CHIN. Leki nasilały ekspresję NOS w aorcie, nie zmieniając stężenia NO w osoczu. ACE-I istotnie zwiększały stężenie vWF i MDA w osoczu.

Wyniki: Wyjściowe wartości parametrów hemostazy wskazują na dysfunkcję śródbłonka i stan nadkrzepliwości u starych szczurów. Badane ACE-I wykazują podobny, słaby efekt przeciwzakrzepowy u starych szczurów, związany głównie z wpływem leków na osoczowy układ krzepnięcia i fibrynolizy oraz działaniem przeciwplatekcyjnym, w mniejszym zaś stopniu z udziałem śródbłonkowego tlenu azotu. Chinapryl, tkankowy ACE-I, wykazywał najsilniejszy wpływ na układ hemostazy u starych szczurów.

robą wieńcową, niewydolnością serca i u dawców serca do transplantacji.

Cel: Optymalizacja zastosowania inhibitora AMPD w modelach *in vivo* i ocena jego zdolności do ochrony serca podczas eksperymentalnej hipoksji.

Metody: Wpływ inhibitora AMPD: 3-[2-(3-carboksy-4-bromo-5,6,7,8-tetrahydronaftyl) etylo]-3,6,7,8-tetrahydroimidazo [4,5]-[1,3] diazepin-8-ol (AMPDI) na aktywność AMPD został wstępnie zbadany z zastosowaniem wyizolowanej AMPD z ludzkiego mięśnia szkieletowego. Następnie oceniono wpływ AMPDI na drogi katabolizmu AMP w szczurzych kardiomiocytach poddanych stymulacji katabolizmu poprzez deoksyglukozę i oligomycynę w obecności inhibitora deaminazy adenozy. Optymalizacja podawania AMPDI w modelu *in vivo* została ustalona po dożylniej infuzji AMPDI myszom i ocenie akumulacji IMP w sercu po 5-minutowej ischemii. Ostatecznie wpływ AMPDI na niedokrwienie i martwicę mięśnia sercowego został zbadany przy użyciu myszy z knock-outem genów apoA i LDLr poddanych 5-minutowej ekspozycji na 5% tlen. Badano przebieg krzywej EKG podczas hipoksji i poziom troponiny I w osoczu po 24 godz. od hipoksji.

Wyniki: AMPDI zahamował wyizolowaną z mięśnia AMPD z $IC_{50}=0,51 \mu M$. W wyizolowanych miocytach poddanych stymulacji katabolizmu stosunek drogi rozpadu AMP przez 5' nukleotydazę (adenozyna) do drogi rozpadu AMP przez AMPD (IMP + inozyna) wzrósł z $1,83 \pm 0,17$ w kontroli do $9,14 \pm 0,29$ w obecności $0,3 \text{ mM}$ AMPDI. Nawet przy milimolowych stężeniach AMPDI nie było różnicy w sumie katabolitów, stężeniu NAD czy uwalnianiu LDH. Akumulacja IMP w sercach mysich poddanych 5-minutowej ischemii zmniejszyła się z $0,307 \pm 0,047 \mu mol/g$ suchej tkanki w kontroli do $0,102 \pm 0,002$ po infuzji *i.v.* 100 mg/kg AMPDI przez 30 min ($p < 0,05$). Podanie AMPDI w takiej samej infuzji u myszy apoA/LDLr (-/-) zmniejszyło cechy niedokrwienia widoczne w obrazie EKG podczas hipoksji i zmniejszyło stężenie troponiny I w surowicy z $0,26 \pm 0,01$ w kontroli do $0,20 \pm 0,02 \text{ ng/ml}$ w grupie traktowanej AMPDI ($p < 0,05$).

Wnioski: Badania te wykazały skuteczność AMPDI *in vivo* jako inhibitora AMPD, jednak dopiero w stężeniach znacznie wyższych niż w doświadczeniach z wyizolowanym enzymem. Zastosowanie AMPDI poprzedzające hipoksję spowodowało redukcję uszkodzenia miokardium, wykazując kardioprotekcyjne działanie farmakologicznego hamowania AMPD.

618

Wpływ zahamowania deaminazy AMP na ochronę serca przed hipoksją

Tomasz Borkowski¹, Ewa Słomińska¹, Czestawa Orlewska², Stefan Chtopicki³, Ryszard T. Smoleński¹

¹ Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna, Gdańsk

² Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Akademia Medyczna, Gdańsk

³ Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Katedra Farmakologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Wstęp: Liczne publikacje ostatnich lat wykazały, że mutacja genu deaminazy AMP 1 prowadzi do zmniejszenia aktywności deaminazy AMP (AMPD) i efektu kardioprotekcyjnego u osób z cho-

619

1-metylonikotynamid – endogenny metabolit nikotynamidu o działaniu przeciwmiażdżycowym

Łukasz Mateuszuk¹, T. I. Khomich², Mariusz Gajda³, Magdalena Łomnicka¹, Ewa Słomińska⁴, Ryszard T. Smoleński⁴, Stefan Chłopicki¹

¹ Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

² Instytut Farmakologii i Biochemii NAS, Grodno

³ Katedra Histologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

⁴ Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna, Gdańsk

Wstęp: 1-metylonikotynamid (MNA) był uważany za nieaktywny metabolit nikotynamidu i kwasu nikotynowego. W ostatnich latach wykazano aktywność biologiczną tego związku. MNA ma zdolność uwalniania prostacykliny ze śródbłonna naczyń krwionośnych, co skutkuje jego działaniem trombolitycznym, przeciwzakrzepowym (*Br J Pharmacol* 2007; 152: 230-9), przeciwzapalnym (*Eur J Pharmacol* 2008; 578: 332-8) i gastroprotekcynym (*J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326: 105-16) oraz hamuje rozwój dysfunkcji śródbłonna w modelach zwierzęcych hipertrójglicerydemii i cukrzycy (*Pharmacol Rep* 2008; 60: 127-38).

Cel: (1) Zbadanie wpływu egzogennej MNA na rozwój miażdżycy. (2) Zbadanie zmian aktywności enzymu N-metylotransferazy nikotynamidu w wątrobie u myszy miażdżycowych w toku rozwoju miażdżycy. (3) Zbadanie zmian poziomów endogennej MNA i jego metabolitów w przebiegu procesu miażdżycowego.

Materiał i metody: W badaniach wykorzystano myszy model miażdżycowy (myszy ApoE/LDLR^{-/-}). MNA podawany był przez 4 miesiące *p.o.* (100 mg/kg) w przedziale wiekowym 2–6 miesięcy. Analizowano rozwój blaszek miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty w sercu (metoda *cross-section*, barwienie Oil Red O) oraz ilość makrofagów w rejonie zmian miażdżycowych (barwienie IHC przeciw CD 68). Dodatkowo porównywano aktywność N-metylotransferazy nikotynamidu (NMMT) w wątrobie oraz mierzone stężenie MNA i jego metabolitów w osoczu u myszy miażdżycowych i kontrolnych (C57Bl/6J) w wieku 2, 3, 4 i 6 miesięcy wg opisanej uprzednio metodyki (*Biol Pharm Bull* 1993; 16: 304-6; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2006; 25: 1245-9).

Wyniki: U myszy dotkniętych miażdżycą zaobserwowano stopniowy rozwój blaszek miażdżycowych wewnątrz korzenia aorty, szczególnie zaznaczony między 2. a 3. miesiącem życia, osiągający maksimum w 6. miesiącu. Równolegle obserwowano wzrost akumulacji makrofagów wokół zmian miażdżycowych, świadczący o nasilonym stanie zapalnym. Wraz z progresją blaszek miażdżycowych stwierdzono stopniowe zwiększanie aktywności NMMT oraz odpowiadający mu wzrost stężenia endogennej MNA w osoczu.

Wnioski: U myszy ApoE/LDLR^{-/-} w toku rozwoju miażdżycy występuje aktywacja NMMT i zwiększenie wytwarzania endogennej MNA, a egzogennej MNA hamuje rozwój miażdżycy. Aktywność przeciwmiażdżycowa MNA najprawdopodobniej wynika z działania przeciwplatekcyjnego i przeciwzapalnego MNA zależnego od szlaku COX-2/PGI2 (*Br J Pharmacol* 2007; 152: 230-9).

620

Zmiany czynności śródbłonna w izolowanych sercach myszy apoE/LDLR^{-/-} w toku rozwoju miażdżycy

Paweł Gwóźdź¹, Bogusława Luzak², Łukasz Mateuszuk¹, Mariusz Gajda³, Cezary Watała², Stefan Chłopicki¹

¹ Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Katedra Farmakologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

² Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Uniwersytet Medyczny, Łódź

³ Katedra Histologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Wstęp: U chorych z hipercholesterolemią i miażdżycą występuje uogólniona dysfunkcja śródbłonna, zwiększona produkcja prostacykliny oraz aktywacja krążących płytek krwi. W mysich modelach miażdżycy dobrze opisana jest dysfunkcja śródbłonna aorty, niewiele natomiast wiadomo o czynności śródbłonna tętnic, w których nie występują zmiany miażdżycowe oraz o stanie aktywacji krążących płytek krwi.

Cel: Scharakteryzowanie zmian czynności śródbłonna oporowych naczyń wieńcowych oraz aktywacji krążących płytek krwi w toku rozwoju miażdżycy u myszy apoE/LDLR^{-/-}.

Materiał i metody: Czynność śródbłonna oporowych tętnic wieńcowych badano w modelu izolowanego serca wg Langendorffa u myszy apoE/LDLR^{-/-} przed rozwojem miażdżycy (miesiące) oraz w obecności minimalnych, umiarkowanych i zaawansowanych zmian miażdżycowych (odpowiednio 2, 4 i 6 miesięcy). Oceniano odpowiedzi naczyniorozszerzające: zależne od NO i PGI₂, wywołane odpowiednio przez bradykininę (Bk) i acetylocholinę (Ach); wywołane przez NO-donory SNAP, nitroprusydek sodu (SNP) i DEA/NO; zależne od aktywności śródbłonnej ADP/ATP-endonukleotydyazy, wywołane przez ADP i ATP; niezależne od czynności śródbłonna, wywołane przez adenozyne (Ado) i AMP. Dodatkowo oceniano stężenie 6-keto-PGF_{1α} w efluencie z izolowanego serca oraz aktywację krążących płytek krwi na podstawie cytometrycznego pomiaru ekspresji błonowej P-selektyny, CD40L oraz zaktywowanej formy Gp IIb/IIIa.

Wyniki: W oporowych tętnicach wieńcowych myszy apoE/LDLR^{-/-} jawne upośledzenie zależnej od NO odpowiedzi naczyniorozkurczowej wywołanej przez Bk było obecne dopiero u zwierząt 6-miesięcznych. W stosunku do myszy kontrolnych, u miesięcznych apoE/LDLR^{-/-} odpowiedź na Bk, SNAP, DEA/NO i Ach była wzmożona. U 2–6-miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-} odpowiedź na SNP była wzmożona, na SNAP i DEA/NO niezmienną, odpowiedź na Ach była obniżona przy zwiększonej podstawowej produkcji 6-keto-PGF_{1α}, zależnej od COX-2. Odpowiedzi wywołane przez Ado, AMP, ADP i ATP były wzmożone u 1–2-miesięcznych myszy apoE/LDLR^{-/-}, a składowa odpowiedź na ADP zależna od receptorów P2 była zmniejszona. W każdej grupie wiekowej ekspresja płytkowej CD40L była zwiększona, przy niezmiennym poziomie ekspresji P-selektyny i zaktywowanej formy Gp IIb/IIIa.

Wnioski: W oporowych tętnicach wieńcowych myszy apoE/LDLR^{-/-} przed rozwojem miażdżycy śródbłonna produkcja NO wydaje się zwiększona, a jej upośledzenie występuje dopiero na etapie zaawansowanych zmian miażdżycowych w aorcie. Podstawowe wytwarzanie PGI₂ zależne od COX-2 rośnie w początkowym etapie rozwoju miażdżycy i pozostaje podwyższone. Wydaje

się też, że aktywność proagregacyjnego ADP jest zmniejszona, a przeciwplatek adenyzy zwiększona. Pomimo wzmożonej aktywności przeciwplatek przekazników śródbłonna, krążące płytki krwi wykazują cechy aktywacji.

621

Próby farmakologicznej korekcji dysfunkcji skurczowej i rozkurczowej w niewydolności serca u myszy $Tg\alpha q^{*44}$

Mirostaw Woźniak¹, Łukasz Drelicharz¹, Urszula Tyrankiewicz², Sylwia Heinze-Paluchowska², Magdalena Jabłońska², Tomasz Skórka², Stefan Chłopicki¹

¹ Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Katedra Farmakologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

² Zakład Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej, Instytut Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk, Kraków

Wstęp: Dotychczasowa ocena skuteczności farmakoterapii w niewydolności serca (NS) skierowana była głównie na korekcję zaburzeń kurczliwości (oceniając w badaniu echokardiograficznym) oraz na poprawę kliniczną. Wciąż niewiele jest jednak badań oceniających wpływ leków „kardiologicznych” na czynność rozkurczową mięśnia sercowego w toku rozwoju niewydolności serca. Co istotne, zaburzenie czynności rozkurczowej mięśnia sercowego może odgrywać główną rolę w rozwoju i progresji NS, koreluje z nasileniem objawów NS i jest niezależnym czynnikiem rokowniczym w NS. Istnieje więc pilna potrzeba oceny skuteczności farmakoterapii NS pod kątem korekcji nie tylko zaburzeń czynności skurczowej, ale również rozkurczowej mięśnia sercowego.

Cel: Ocena wpływu „klasycznej” farmakoterapii NS za pomocą ACE-I (peryndopryl) i antagonisty receptora aldosteronowego – ARA (kanrenon) oraz „niestandardowej” terapii w NS – lekami przeciwplatekowymi (klopidogrel, aspiryna) na progresję NS w mysim modelu NS.

Materiał i metody: W badaniach postużyliśmy się unikatowym modelem NS myszy transgenicznych $Tg\alpha q^{*44}$ (*J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1477-91; *Basic Res Cardiol* 2008; 103: 417-30) oraz oryginalnie opracowaną metodyką pomiarów czynności skurczowej i rozkurczowej mięśnia sercowego *in vivo* (z wykorzystaniem techniki MRI). Myszy $Tg\alpha q^{*44}$ w różnym wieku (10–16 miesięcy) były leczone przez 2 miesiące odpowiednio peryndoprylem (2 mg/kg/dobę), kanrenonem (20 mg/kg/dobę) lub klopidogrelem (10 mg/kg/dobę) i aspiryną (10 mg/kg/dobę). Czynność mięśnia sercowego – frakcja wyrzutowa (FAC), dynamika skurczu (ER), dynamika rozkurczu (FR) – oceniano przed i po 2-miesięcznym leczeniu.

Wyniki: Peryndopryl i kanrenon opóźniły progresję niewydolności serca, czego nie obserwowano podczas terapii przeciwplatekowej. Co ciekawe, tylko kanrenon, ale nie peryndopryl, wyraźnie hamował progresję dysfunkcji rozkurczowej mięśnia sercowego u myszy $Tg\alpha q^{*44}$.

Wnioski: ACE-I (peryndopryl) i ARA (kanrenon) hamują progresję NS, jednak mechanizmy odpowiedzialne za korzystny efekt ACE-I i ARA w leczeniu NS wydają się odmienne i wskazują na szczególne korzyści ze stosowania ARA w dysfunkcji rozkurczowej mięśnia sercowego. Jednocześnie wydaje się, że hamowanie aktywacji płytek krwi (przez leki przeciwplatekowe) nie wpływa na progresję NS u myszy $Tg\alpha q^{*44}$.

622

Ocena siły ochronnego działania morfiny na czynność ludzkiego mięśnia sercowego w okresie reoksygenacji modyfikowana ingerencją w układ tlenkowo-azotowy

Tomasz Roleder¹, Krzysztof S. Gołba¹, Marek A. Deja², Marcin Malinowski², Jolanta Biernat¹, Stanisław Woś²

¹ Katedra i Klinika Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

² II Katedra i Klinika Kardiochirurgii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Cel: Ocena wpływu nieselektywnego agonisty receptorów opioidowych (morfiny) na czynność niedokrwionych fragmentów ludzkiego mięśnia sercowego modyfikowana za pomocą nieselektywnego inhibitora syntazy tlenu azotu (NG-monometylo L-argininy, LNMMA) i donora tlenu azotu (S-nitroso-N-acetylpenicillaminy, SNAP).

Materiał i metody: Badanie prowadzono na fragmentach mięśniówki prawego przedsionka pobranych w czasie zabiegu pomostowania naczyń wieńcowych u chorych bez cech niewydolności serca. Fragmenty mięśniówki ludzkiego serca poddawano hipoksji (60 min) i reoksygenacji (60 min). Przebieg reoksygenacji modyfikowano podaniem w poszczególnych grupach: 100 μmol morfiny, 100 μmol LNMMA razem z 100 μmol morfiny, 100 μmol LNMMA razem z 100 μmol morfiny i 100 μmol SNAP. Badanie przeprowadzono jednocześnie na 2 beleczkach, z których jedna stanowiła kontrolę. W kolejnych grupach beleczki poddawano protokołowi kontrolowanej reoksygenacji (trzykrotnie 1 min reoksygenacja z następczą 1 min hipoksją) lub stymulowano jedynie w warunkach tlenowych (sham 120 min). W okresie przed niedotlenieniem i w czasie reoksygenacji rejestrowano amplitudę (Amax) skurczu.

Wyniki: Wyniki przedstawiano jako procentową wartość względem poziomu wyjściowego. Podanie morfiny chroniło funkcję skurczową niedotlenionego miokardium w stopniu mniejszym niż kontrolowana reoksygenacja (sham: 51, 49±2,4%; kontrola: 28,70±2,8%, modyfikowana reoksygenacja: 49,60±2,1%; morfina: 39,13±2,8%; *p < 0,05 vs kontrola). Podanie 100 μmol LNMMA razem z 100 μmol morfiny oraz jednoczesne podanie 100 μmol LNMMA, 100 μmol morfiny i 100 μmol SNAP w okresie reoksygenacji nie miało wpływu na czynność skurczową niedokrwionego miokardium (kontrola: 28,70±2,8%; morfina + LNMMA:

33,8±2,6*; morfina + LNMMA + SNAP: 31,39±2,8%*; *p >0,05 vs kontrola).

Wnioski: Siła ochronnego działania morfiny w okresie reoksygenacji ludzkiego mięśnia sercowego jest istotnie słabsza od kontrolowanej reoksygenacji. Efekt ochronny morfiny jest niwelowany podaniem nieselektywnego inhibitora syntazy tlenu azotu – LNMMA. Zahamowanie czynności ochronnej morfiny przez LNMMA utrzymuje się pomimo podania donora tlenu azotu – SNAP.

623

Podwójna blokada układu renina-angiotensyna-aldosteron a parametry hemostazy szczura z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym

Adrian Stankiewicz¹, Anna Gromotowicz¹, Janusz Szemraj², Urszula Osmólska¹, Joanna Mikita¹, Ewa Chabielska¹

¹ Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny, Białystok

² Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Wstęp: Wyniki badań klinicznych wskazują, iż dołączenie antagonisty receptora aldosteronowego do standardowej terapii niewydolności serca (m.in. ACE-I) redukuje śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych, u podłoża której może leżeć proces zakrzepowy. Nie ma jednak dowodów świadczących o korzystnym wpływie podwójnej blokady układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) na proces hemostazy.

Cel: Ocena wpływu podwójnej blokady układu RAA na parametry hemostazy szczura z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym.

Materiał i metody: Wykonano badania oceniające wpływ pojedynczego i łącznego podania spironolaktonu (SPIRO, 20 mg/kg) – antagonisty receptora aldosteronowego, i chinaprylu (CHIN, 3 mg/kg) – ACE-I, na układ hemostazy u szczura z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym (2K-1C). Nadciśnienie wywołano podwiązaniem lewej tętnicy nerkowej. Indukcja nadciśnienia trwała 6 tygodni. W celu oceny rozwoju nadciśnienia oraz efektu hipotensyjnego leków wykonano pomiar ciśnienia tętniczego krwi metodą pośrednią. Wykazano działanie hipotensyjne leków we wszystkich grupach zwierząt. Oznaczono stężenie aldosteronu w surowicy. W badaniach wykorzystano model zakrzepicy żylniej. Efekt przeciwzakrzepowy oceniano na podstawie zmian częstości występowania i masy zakrzepu. Badano wpływ leków na hemostazę pierwotną (adhezja płytek krwi do kolagenu i czas krwawienia). W osoczu oznaczono: stężenie czynnika tkankowego (TF), tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1), inhibitora fibrynolizy aktywowanego trombiną (TAFI) oraz nadtlenu wodoru (H₂O₂).

Wyniki: Wykazano, iż SPIRO obniżał stężenia TF, PAI-1 oraz TAFI, lecz nie zmieniał stężenia t-PA w osoczu. Podobny kierunek

zmian obserwowano po podaniu CHIN, lek ten obniżał także stężenie t-PA. CHIN istotnie statystycznie silniej w porównaniu ze SPIRO zmniejszał stężenie TF, PAI-1 i TAFI. Największy spadek stężenia TF, PAI-1, t-PA oraz TAFI zaobserwowano po łącznym podaniu leków. Tylko łącznie podane leki zmniejszyły częstość formowania oraz masę zakrzepu żylnego. SPIRO i CHIN hamowały istotnie adhezję płytek krwi. Nie zaobserwowano istotnych zmian w stężeniu aldosteronu po podaniu leków pojedynczo oraz łącznie. Wykazano ponadto istotny statystycznie spadek stężenia w osoczu H₂O₂, również najsilniejszy po łącznym podaniu SPIRO i CHIN.

Wnioski: Podwójna blokada układu RAA antagonistą receptora aldosteronowego i inhibitorem konwertazy angiotensyny prowadzi do znacznego ograniczenia rozwoju zakrzepicy żylniej u szczurów z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym. Złożony mechanizm przeciwzakrzepowego działania leków jest zależny od nasilenia fibrynolizy, zahamowania krzepnięcia i adhezji płytek krwi oraz redukcji stresu oksydacyjnego.

624

Farmakologiczna modulacja aktywności śródbłonkowej endoteliny 1 i prostacykliny w modelu nadciśnienia płucnego wywołanego przez monokrotalin

Andrzej Fedorowicz¹, Maria Walczak², Joanna Szymura-Oleksiak², Justyna Dzieża³, Tomasz Skórka³, Stefan Chłopicki¹

¹ Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

² Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

³ Instytut Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk, Kraków

Wstęp: W naszych dotychczasowych badaniach wykazaliśmy, że dysfunkcja śródbłonka w krążeniu płucnym obejmująca wzrost wytwarzania endoteliny 1 (ET-1) oraz spadek wydzielania prostacykliny (PGI₂) poprzedza rozwój nadciśnienia płucnego wywołanego przez monokrotalin (MCT) u szczurów.

Cel: Zbadanie wpływu na rozwój dysfunkcji śródbłonka i nadciśnienia płucnego antagonisty receptora ETA, podawanego w monoterapii lub wraz z MNA. MNA jest związkami, który ma zdolność stymulacji wytwarzania PGI₂ w śródbłonku.

Materiał i metody: W celu wywołania nadciśnienia płucnego szczurom rasy Wistar (200 g) podawano MCT (60 mg/kg s.c.). Dwa-dzieścia cztery godziny po podaniu zwierzęta podzielono na 4 grupy: grupę nieleczoną (M), grupę leczoną antagonistą receptora ETA (TBC, 45 mg/kg/dobę, ME), grupę leczoną antagonistą receptora ETA oraz MNA (TBC 45 mg/kg/dobę + MNA 100 mg/kg/dobę, MEM). Po upływie 14 i 28 dni przeprowadzono ocenę zmian morfometrycznych, zapalnych oraz czynnościowych.

Wyniki: Leczenie antagonistą receptora ETA przedłużało przeżycie zwierząt (mediany: 30,5 vs 25 dni, odpowiednio ME vs M,

$p=0,075$), zmniejszało przerost prawej komory ($0,068\pm 0,012$ vs $0,088\pm 0,06$, odpowiednio ME vs M), nie wpływało jednak na podwyższone ciśnienie podstawowe w tętnicy płucnej (PAP) mierzone w modelu izolowanych płuc w 4. tygodniu po podaniu MCT. Terapia antagonistą ETA przeciwdziałała rozwojowi dysfunkcji śródbłonna ocenianej na podstawie potęgowania HPV przez L-NAME (300 mM) ($\Delta\text{PAP}=9,78\pm 1,751$ vs $\Delta\text{PAP}=25,33\pm 5,22$ oraz $\Delta\text{PAP}=5,22\pm 4,003$ vs $\Delta\text{PAP}=19,62\pm 1,255$, odpowiednio grupa M vs grupa ME 2 tygodnie oraz 4 tygodnie po podaniu MCT). W grupie MEM uzyskano dodatkowe zahamowanie przerostu prawej komory w 4. tygodniu po podaniu MCT ($0,056\pm 0,005$) w stosunku do grupy ME. Także w grupie MEM zanotowano w pełni zachowaną czynność śródbłonkowego NO w 2. tygodniu po podaniu MCT (potęgowanie HPV przez L-NAME $\Delta\text{PAP}=38,29\pm 1,767$ vs $31,45\pm 4,33$, odpowiednio MEM vs kontrola). Jednak w 4. tygodniu po podaniu MCT czynność śródbłonkowego NO w grupach ME i MEM była podobna.

Wnioski: W modelu nadciśnienia płucnego wywołanego przez MCT leczenie antagonistą receptora ETA hamuje progresję zmian czynnościowych i morfometrycznych. Łączna terapia antagonistą ETA i MNA poprawia parametry czynnościowe we wczesnych etapach oraz parametry morfometryczne w późnych etapach rozwoju nadciśnienia płucnego w stosunku do leczenia jedynie za pomocą antagonisty ETA.

Indeks autorów streszczeń

Abramczyk Piotr	377	Jabłońska Magdalena	384
Baj Zbigniew	374	Janas Jadwiga	379
Balak Wojciech	365	Janczarska Katarzyna	372
Balwierz Adriana	367, 368	Janusiewicz Piotr	381
Baranowska Marta	365	Jawień Jacek	378
Bartuś Magdalena	371	Józkowicz Alicja	368
Beręsewicz Andrzej	376, 377	Kamiński Karol	371, 379, 380
Białas Małgorzata	368, 379, 380	Karp Andrzej	381
Bidiuk Joanna	377	Kasprzak Jarosław	379, 380
Biernat Jolanta	384	Kawalec Wanda	366
Bilińska Maria	379	Khomich T. I.	382
Bissinger Andrzej	374	Kieć-Wilk Beata	368, 369, 372
Bonda Tomasz	371	Klemenska Emilia	372, 376, 377
Borkowski Tomasz	382	Kolasińska-Kloch Wiesława	366
Brudek Magdalena	366	Konior Anna	376, 377
Buczko Włodzimierz	367	Kosydar-Piechna Magdalena	379
Buraczewska-Buczko Agnieszka	375	Kotlinowski Jerzy	368
Burchardt Paweł	373	Kovalchuk Olga	371
Chabielska Ewa	381, 385	Kowalewska Anna	374
Chłopiński Stefan	371, 382, 383, 384, 385	Kozieradzka Anna	370
Chmura-Skirińska Antonina	371	Kozłowska Hanna	365
Cichoń Tomasz	380	Kozuch Marcin	371
Czarnowska Elżbieta	366	Kramkowski Karol	367
Czech Urszula	367	Krupka Marcin	368
Członkowski Andrzej	373	Kurpisz Maciej	368, 379, 380
Deja Marek A.	381, 384	Lackowska Bożena	368
Dembińska-Kieć Aldona	366, 367, 368, 372	Lewandowski Jacek	377
Dobosiewicz Anna	377	Lewartowski Bohdan	372
Dowgwiłłowicz-Nowicka Małgorzata	370	Link Rafał	373
Drelicharz Łukasz	384	Lipiec Piotr	379, 380
Drobniak-Hełdak Dominika	366	Lubiński Andrzej	374
Dulak Józef	368	Luzak Bogusława	383
Dzieża Justyna	385	Łangowska Małgorzata	381
Erschow Sergej	370	Łomnicka Magdalena	382
Fedorowicz Andrzej	385	Mac Lean Margaret R.	365
Filipiak Krzysztof J.	373	Mackiewicz Urszula	372
Fischer Philipp	370	Makowski Marcin	374
Frączek Monika	368	Malinowska Barbara	365
Gajda Mariusz	378, 382, 383	Malinowski Krzysztof	375
Gołba Krzysztof S.	381, 384	Malinowski Marcin	381, 384
Goździcka-Józefiak Anna	373	Małkowski Andrzej	371
Górska Joanna	366	Małyszka Piotr	369
Grabowicz Włodzimierz	374	Marchel Michał	373
Grajkowska Wiesława	366	Maruszewski Bohdan	366
Gromotowicz Anna	381, 385	Masiarek Konrad	374
Grotowski Tomasz	373	Mateuszuk Łukasz	382, 383
Grycewicz Tomasz	374	Mączewski Michał	372
Gwóźdź Paweł	383	Mencel Joanna	371
Hartwich Jadwiga H.	366	Mikita Joanna	385
Heinze-Paluchowska Sylwia	384	Mogielnicki Andrzej	367
Hilfiker-Kleiner Denise	370	Musiak Włodzimierz	371
Huczek Zenon	373	Myśliwiec Michał	374, 375

Nowak Witold	373	Sokal Adam	380
Olszewska Marta	379, 380	Stanisławska Iwona	371
Opolski Grzegorz	373	Stankiewicz Adrian	381, 382
Orlewska Czesława	382	Stapel Britta	370
Osmólska Urszula	385	Szala Stanisław	380
Partyka Łukasz	368, 369	Szelachowska Małgorzata	371
Pawlak Dariusz	367, 374, 375	Szemraj Janusz	381, 385
Pawlak Krystyna	374, 375	Szepietowska Barbara	371
Piechota Michał	378	Szewczyk Adam	371
Piotrowicz Ryszard	379	Szymczyk Ewa	379, 380
Plewa Robert	378	Szymura-Oleksiak Joanna	385
Plewka Michał	379, 380	Śliwa Agnieszka	368, 372
Polus Anna	367, 368	Tarchalska-Kryńska Bożena	373
Postuła Marek	373	Turska-Kmieć Anna	366
Przybylski Roman	380	Tyrankiewicz Urszula	384
Rajtar Renata	366	Walczak Maria	385
Raźny Urszula	369	Watała Cezary	383
Roleder Tomasz	381, 384	Wątor Łukasz	369
Rozwadowska Natalia	368	Wierzba Tomasz	375
Serafin Agnieszka	373	Wilczek Piotr	380
Siminiak Tomasz	373	Winnicka Maria	371
Sinkiewicz Władysław	365, 369, 370	Woś Stanisław	381, 384
Siński Maciej	377	Woźniak Mirosław	384
Skierczyńska Agnieszka	376	Zembala Marian	380
Skórka Tomasz	384, 385	Zembala Michał	380
Słomińska Ewa	382	Zielska Zofia	375
Smolarczyk Ryszard	380	Ziótkowska Lidia	366
Smoleński Ryszard T.	381, 382	Zschemisch Nils H.	370
Smorąg Ireneusz	374		

NOTATKI

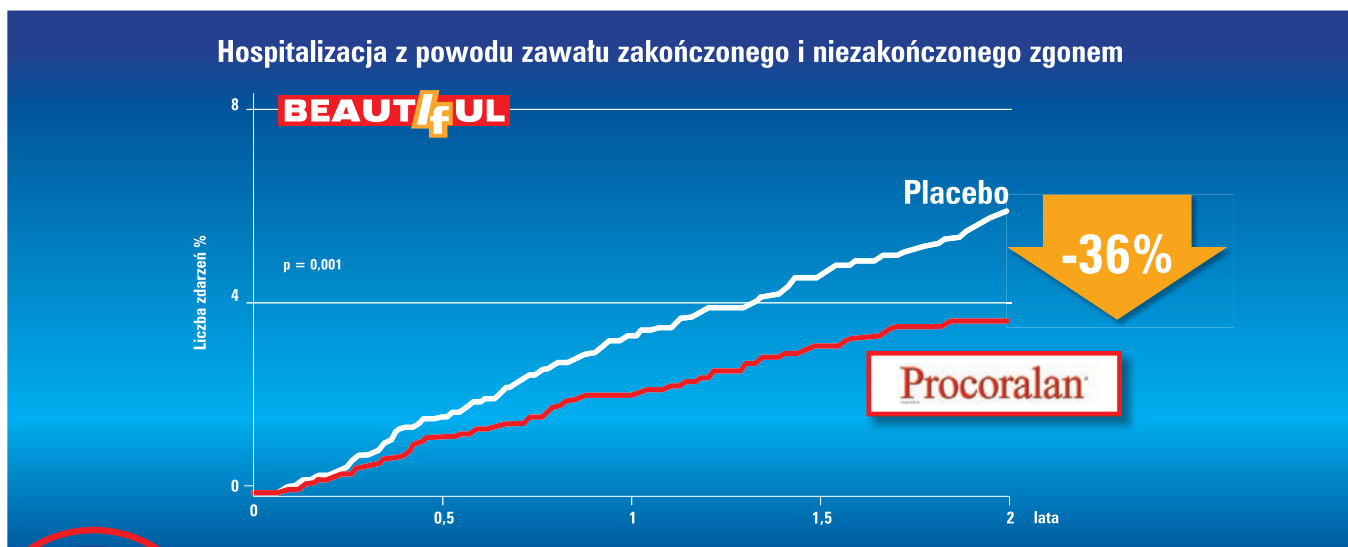
NOTATKI

Procoralan®

Iwabradyna

SERCE WOLNE... OD ZAWAŁU

Zmniejsza liczbę zawałów serca i rewaskularyzacji u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową i HR \geq 70 uderzeń/min*



REFUNDACJA!
ODPŁATNOŚĆ
30%

● Redukcja rewaskularyzacji

30%

p = 0,016

● Redukcja wszystkich zdarzeń wieńcowych

22%

p = 0,009



1 tabletki 2 x dziennie

PROCORALAN® (Iwabradyna), tabletki powlekane.

Skład: 1 tabl. powlekana zawiera 5 mg iwabradyny (co odpowiada 5,390 mg chlorowodoru iwabradyny) lub 7,5 mg iwabradyny (co odpowiada 8,085 mg chlorowodoru iwabradyny). **Działanie:** iwabradyna jest lekiem o swoistym działaniu zmniejszającym częstość pracy serca poprzez wybiórcze i swoiste działanie na prąd I_r rozrusznika serca, który kontroluje samodzielną depolaryzację węzła zatokowego w okresie rozkurczu i reguluje częstość pracy serca. Lek działa wyłącznie na węzeł zatokowy i nie ma wpływu na czas przewodnictwa w przedsionkach, węzeł przedsionkowo-komorowy lub komorach serca, ani na kurczliwość mięśnia sercowego lub przepływy krwi. **Przeciwwskazania:** nadwrażliwość na iwabradynę lub którąkolwiek substancję pomocniczą. Częstość pracy serca w spoczynku przed leczeniem poniżej 60 uderzeń/min. Wstrząs kardiogeny. Świeży zawał mięśnia sercowego. Ciężkie niedociśnienie (< 90/50 mm Hg). Ciężka niewydolność wątroby. Zespół chorego węzła zatokowego. Blok zatokowo-przedstonkowy. Pacjenci z niewydolnością serca III i IV* wg klasyfikacji NYHA, z powodu braku danych. Konieczność stosowania stymulatora serca. Niestabilna dławica piersiowa. Blok przedsionkowo-komorowy III*. Jednoczesne stosowanie z silnymi inhibitorami cytochromu P450 3A4, takimi jak: azolowe pochodne przeciwgrzybicze (ketokonazol, itraconazol), antybiotyki makrolidowe (klarytromycyna, erytromycyna podawana doustnie, jozamycyna, telitromycyna), inhibitory proteazy HIV (nefawir, rytonawir) i nefazodon. Ciężka i okres karmienia piersią. **Srodki ostrożności:** nie zaleca się stosowania iwabradyny u pacjentów z migotaniem przedsionków lub innymi zaburzeniami rytmu serca zakłócającymi czynność węzła zatokowego, u pacjentów z blokiem przedsionkowo-komorowym II*. Nie należy rozpoczynać leczenia iwabradyną u pacjentów z częstością pracy serca w spoczynku wynoszącą przed leczeniem poniżej 60 uderzeń/min. Nie należy jednocześnie stosować iwabradyny w skojarzeniu z lekami z grupy antagonistów kanałów wapniowych zmniejszających częstość pracy serca. Należy zachować ostrożność u pacjentów bez objawów dysfunkcji lewej komory serca oraz pacjentów z niewydolnością serca II* wg klasyfikacji NYHA. Nie zaleca się stosowania iwabradyny bezpośrednio po wystąpieniu udaru mózgu. Iwabradyna wpływa na czynność siatkówki – należy rozważyć odstawienie leczenia w przypadku nieoczekiwanego pogorszenia wzroku; należy zachować ostrożność u pacjentów z barwnikowym zwyrodnieniem siatkówki. Tabletki zawierają laktozę – pacjenci z rzadką dziedziczną nietolerancją galaktozy, niedoborem laktazy Lappa lub zespołem złego wchłaniania glukozy-galaktozy nie powinni stosować leku. Należy unikać stosowania iwabradyny u pacjentów z wrodzonym zespołem długiego odstępu QT lub przyjmujących leki wydłużające odstępek QT. Należy zachować ostrożność podczas stosowania iwabradyny u pacjentów z umiarkowaną niewydolnością wątroby. Należy zachować ostrożność podczas stosowania iwabradyny u pacjentów z ciężką niewydolnością nerek (klirens kreatyniny < 15 ml/min). Preparat nie jest zalecany u dzieci i młodzieży. Lek jest przeciwwskazany w ciąży i w okresie karmienia piersią. **Działania niepożądane:** zaburzenia oka: bardzo często (> 1/10) – zaburzenia widzenia opisywane jako przemijające wrażenia widzenia silnego światła w ograniczonej części pola widzenia, zazwyczaj wywołane przez nagłe zmiany natężenia światła (na ogół występują w ciągu pierwszych 2 miesięcy leczenia, w późniejszym okresie mogą się powtarzać, na ogół opisywano zaburzenia widzenia jako lekkie lub o umiarkowanym nasileniu, wszystkie zaburzenia widzenia w postaci wrażenia widzenia silnego światła ustępowały w czasie leczenia lub po jego zakończeniu); często (> 1/100, < 1/10) – niewyraźne widzenie. Zaburzenia serca i naczyń: często (> 1/100, < 1/10) – bradykardia, blok przedsionkowo-komorowy I*, dodatkowe skurcze komorowe, niezbyt często (> 1/1000, < 1/100) – kołatania serca, dodatkowe skurcze komorowe. Podczas badań klinicznych zgłaszane następujące zdarzenia występowały z podobną częstością jak w grupie otrzymującej porównywalny lek i/lub prawdopodobnie były związane z chorobą podstawową: niestabilna dławica piersiowa, zaostrzenie dławicy piersiowej, migotanie przedsionków, niedokrwienie mięśnia sercowego, zawał mięśnia sercowego, często skurcz komorowy. Zaburzenia żołądkowo-jelitowe: niezbyt często (> 1/1000, < 1/100) – nudności, zaparcia, biegunka. Zaburzenia ogólne: często (> 1/100, < 1/10) – ból głowy głównie w pierwszym miesiącu leczenia, zawroty głowy prawdopodobnie związane z bradykardią; niezbyt często (> 1/1000, < 1/100) – zawroty głowy pochodzenia błędnikowego, duszność, kurcze mięśniowe. Badania: niezbyt często (> 1/1000, < 1/100) – zwiększenie stężenia kwasu moczowego, eozynofilia, zwiększone stężenie kreatyniny we krwi. **Dawkowanie i sposób podawania:** doustnie; zalecana dawka początkowa 5 mg 2 razy na dobę (rano i wieczorem). Po 3-4 tyg. leczenia dawka może być zwiększona do 7,5 mg 2 razy na dobę, w zależności od odpowiedzi terapeutycznej. Jeżeli w czasie leczenia długotrwale zmniejsza się częstość pracy serca w spoczynku poniżej 50 uderzeń/min lub pacjent odczuwa objawy związane z bradykardią, dawkowanie należy stopniowo zmniejszyć do 2,5 mg 2 razy na dobę. Leczenie należy przerwać, jeżeli częstość pracy serca utrzymuje się poniżej 50 uderzeń/min lub utrzymują się objawy bradykardii. U pacjentów w wieku podeszłym należy rozważyć zastosowanie mniejszej dawki początkowej leku – 2,5 mg 2 razy na dobę; dawkę można zwiększać w razie potrzeby. **Nazwa i adres podmiotu odpowiedzialnego:** Les Laboratoires Servier, 56 rue Garnier, 92200 Neuilly sur Seine, Francja. **Adres korespondencyjny:** Servier Polska Sp. z o.o., 01-248 Warszawa, ul. Jana Kazimierza 10, tel. (22) 594 90 00, fax (22) 594 90 10. Internet: www.servier.pl, e-mail: info@pl.netgrs.com. Pozwolenie na dopuszczenie do obrotu wydane przez Komisję Wspólnot Europejskich nr: EU/1/05/316/003, EU/1/05/316/010. Produkt leczniczy wydawany na receptę. Pełna informacja o leku znajduje się w ulotce dołączonej do opakowania. Należy zapoznać się z właściwościami leku przed jego zastosowaniem.

Maksymalna detaliczna cena urzędowa wynosi odpowiednio: 212,40 PLN dla leku Procoralan® 5 mg; 213,81 PLN dla leku Procoralan® 7,5 mg. Odpłatność dla pacjenta wynosi maksymalnie: 53,72 PLN dla leku Procoralan® 5 mg; 64,14 PLN dla leku Procoralan® 7,5 mg. **MATERIAŁ KIEROWANY WYŁĄCZNIE DO OSÓB UPRAWNIENIOWYCH DO WYSTAWIANIA RECEPT.**

Fox K, et al. Ibradine and cardiovascular events in stable coronary artery disease and left ventricular systolic dysfunction a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2006; 327:801-816

* Kryteria włączenia: udokumentowana choroba wieńcowa, dysfunkcja skurczowa lewej komory, rytm zatokowy z HR > 60 u/min.

W wytycznych ESC od 2006