

Erytropoetyna w leczeniu niedokrwienia i niewydolności serca

Erythropoietin in the treatment of heart failure and ischemia

Bohdan Lewartowski

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Kardiologia Pol 2007; 65: 192-197

Wstęp

Erytropoetyna (EPO) jest glikoproteiną [1] o ciężarze cząsteczkowym 30,4 kD zbudowaną ze 165 aminokwasów. Jej gen został sklonowany i struktura ostatecznie ustalona w latach 1985–1986 [2, 3]. Erytropoetyna jest syntetyzowana i wydzielana głównie w nerkach [4] przez okołokanalikowe fibroblasty kory [5]. Głównym czynnikiem regulującym jej wydzielanie jest ciśnienie parcjalne tlenu we krwi tętnicy nerkowej [4]. Zasadnicze działanie EPO polega na pobudzaniu erytropoezy przez pobudzanie rozplemu i różnicowanie oraz hamowanie apoptozy erytroidalnych komórek progenitorowych szpiku. Rekombinowana ludzka EPO (rhEPO) jest lekiem z wyboru w leczeniu niedokrwistości chorych z niewydolnością nerek i w niektórych innych formach niedokrwistości. Jednakże, jak to zwykle bywa z odkrywanymi ciałami czynnymi, w toku dalszych badań okazało się, że ekspresja EPO zachodzi także poza nerki i że wywiera ona wiele działań poza komórkami linii erytropoetycznej. EPO jest produkowana również (aczkolwiek w znacznie mniejszych ilościach niż w nerkach) w neuronach i astrocytach ośrodkowego układu nerwowego oraz w wątrobie i w macicy, gdzie odgrywa rolę lokalnego czynnika parakrynnego [6]. Przez analogię do systemowego i tkankowych układów renina-angiotensyna, można by zaproponować terminy układowa EPO (wydzielana do krwi przez nerki) i tkankowa EPO.

W życiu płodowym, w którym EPO odgrywa zasadniczą rolę w proliferacji i różnicowaniu tkanek, re-

ceptory EPO (EPO-R) występują we wszystkich komórkach ustroju. W życiu pozapłodowym, w miarę dojrzewania tkanek, ich ekspresja ulega zahamowaniu. Jednak nadal występują one poza erytrocytarnymi komórkami progenitorowymi szpiku również w neuronach, mikrogleju i astrocytach ośrodkowego układu nerwowego, a także w komórkach śródbłonna i mięśni gładkich naczyń oraz w miocytach i fibroblastach serca [7, 8].

Na materiale zwierzęcym, a także w warunkach klinicznych wykazano, że rhEPO działa ochronnie w udarach mózgu [9] i w niedokrwieniu serca oraz ma korzystne działanie w niewydolności serca. Z tego powodu zainteresowanie EPO i liczba poświęconych jej prac szybko rośnie. Również w literaturze polskiej ukazały się dwie prace poglądowe [10, 11], w których przedstawiono właściwości i zastosowania kliniczne EPO do roku 2004. Z tego względu niniejsza praca została oparta głównie na pozycjach literatury z lat 2005–2007.

Badania przedkliniczne

Doświadczalne niedokrwienie serca

Autorzy wszystkich prac wykonanych na modelach zwierzęcych, z wyjątkiem jednej [12], donoszą o bardzo korzystnym wpływie EPO na pozawałowy stan serca.

Cztery tygodnie po podwiązaniu lewej tętnicy wieńcowej u psów [13] obszar zawatu był około

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Bohdan Lewartowski, Zakład Fizjologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel.: +48 22 569 38 40, faks: +48 569 37 12, e-mail: blew@cmkp.edu.pl

Praca wpłynęła: 3.01.2007. Zaakceptowana do druku: 17.01.2007.

3-krotnie mniejszy u zwierząt, którym jednorazowo wstrzyknięto EPO natychmiast po podwiązaniu naczynia. U psów tych frakcja wyrzutowa lewej komory (LVEF) była znacznie większa niż u zwierząt kontrolnych, którym wytworzono zawał, ale EPO nie podawano. Jednorazowa iniekcja EPO w ciągu 1 godz. po podwiązaniu tętnicy wieńcowej u szczurów powodowała ograniczenie obszaru zawału badanego po 4–6 tygodniach o 15–50%, zahamowanie spadku EF i rozstrzeni lewej komory (LV) [14–20]. Podobne efekty EPO obserwowano u myszy, którym podwiązano tętnicę wieńcową [21, 22]. Zahamowanie ekspansji zawału i ograniczenie jego obszaru było prawdopodobnie skutkiem silnego hamowania przez EPO apoptozy. Wykazano to zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. EPO silnie hamowała apoptozę indukowaną staurosporyną w hodowlach kardiomiocytów [17, 20]. W doświadczalnym zawale LV u szczura jednorazowa dawka EPO powodowała zmniejszenie liczby komórek apoptotycznych w strefie zagrożenia o ok. 50% [14, 15, 18]. W strefie okołozawałowej i w zdrowych częściach komory obserwowano zwiększenie przepływu krwi i zwiększenie gęstości kapilar w wyniku nasilonej angiogenezy. Nasilenie angiogenezy było prawdopodobnie spowodowane pobudzeniem przez EPO uwalniania ze szpiku endotelialnych komórek progenitorowych, których liczba znacznie wzrastała we krwi obwodowej [13, 18, 22, 23]. Komórki te mogą pobudzać angiogenezę albo przez osiedlanie się w kapilarach i różnicowanie w kierunku komórek endotelium, albo przez wydzielanie cytokin proangiogenicznych. Możliwe, że poprawa perfuzji mięśnia sercowego powodowała również znaczne ograniczenie jego włóknienia [18].

Cytoprotekcyjne działanie EPO w zawale może również polegać na jej działaniu przeciwzapalnym. EPO blokowała u myszy z podwiązaną lewą tętnicą wieńcową pobudzenie ekspresji cytokin prozapalnych interleukiny (IL): IL-1 β , IL-6, TNF- α i TGF- β , jak również ograniczała uszkodzenie DNA (głównie mitochondrialnego) w wyniku stresu oksydacyjnego. Podobne wyniki otrzymano w hodowli miocytów płodowych poddanych działaniu H₂O₂ [21]. Funkcję wymiatacza wolnych rodników przypisuje EPO również Hirata [13]. Prawdopodobnie dzięki m.in. tym właściwościom EPO ma silny potęgujący efekt w stosunku do hartowania niedokrwieniem [24].

Powstało pytanie, czy EPO jest czynnikiem fizjologicznie regulującym czynność serca i jego reakcje na uszkodzenie, czy też jest to działanie o charakterze tylko farmakologicznym. Na pytanie to przekonująco odpowiadają wyniki uzyskane przez Tadę [25]. U myszy pozbawionych EPO-R w komórkach linii nie-

hematopoetycznych (tj. między innymi w miocytach i fibroblastach serca) stwierdzono po 30-minutowym zamknięciu tętnicy wieńcowej i reperfuzji większy rozmiar zawału, większy przerost serca, gorsze parametry hemodynamiczne LV i większe nasilenie apoptozy niż u myszy normalnych z zawałem. Tak więc endogenna EPO jest czynnikiem fizjologicznie ograniczającym uszkodzenie serca spowodowane niedokrwieniem, a jej podanie z zewnątrz ten efekt silnie wzmacnia.

Powstał również problem, czy EPO działa poprzez poprawę utlenowania serca na skutek zwiększenia liczby erytrocytów i zawartości Hb we krwi obwodowej, czy też wpływa ona bezpośrednio na struktury serca. Na to pytanie częściowo odpowiadają już wyniki Tady [25]. Dobrego narzędzia do zbadania tego zagadnienia dostarczyło zsyntetyzowanie karbamylowanej pochodnej EPO – CEPO, która nie działa na komórki progenitorowe linii erytroidalnej szpiku.

Rekombinowaną ludzką EPO lub CEPO wstrzykiwano jednorazowo szczurom natychmiast po podwiązaniu lewej tętnicy wieńcowej [17]. W obu grupach zwierząt po 24 godz. apoptoza była w strefie ryzyka zahamowana w 50% w stosunku do szczurów z zawałem, które nie otrzymywały ani rhEPO, ani CEPO. W obu grupach (rhEPO i CEPO) 4 tygodnie po operacji powierzchnia blizny była 4 razy mniejsza niż u zwierząt kontrolnych. Skurczowa i rozkurczowa objętość LV oraz LVEF nie uległy zmianie, podczas gdy u nieleczonych zwierząt objętości komory zwiększyły się odpowiednio o 140% i 28%, a LVEF zmniejszyła się o więcej niż 50%. Nie było żadnej różnicy ilościowej pomiędzy ww. parametrami mierzonymi u zwierząt otrzymujących rhEPO lub CEPO. Rekombinowana ludzka EPO zwiększała hematokryt o 5,1%, natomiast CEPO nie miała na niego wpływu. Zarówno rhEPO, jak i CEPO hamowały apoptozę indukowaną w hodowli miocytów staurosporyną. W innej pracy [20], na szczurach, których tętnicę wieńcową zamykano na 40 min, CEPO podana w dawce 50 μ g/kg 5 min przed reperfuzją, a następnie 1 raz dziennie w ciągu 6 dni zmniejszała strefę zawału z 23% do 17%, zmniejszała objętość miocytów, zmniejszała ciśnienie rozkurczowe lewej komory i zwiększała odpowiedź na dobutaminę. Również i w tej pracy CEPO hamowała apoptozę wywoływaną w hodowli dojrzałych miocytów staurosporyną. Tak więc powyższe prace dostarczają przekonujących dowodów, że cytoprotekcyjne działanie EPO w doświadczalnym zawale jest wynikiem jej bezpośredniego działania na struktury mięśnia sercowego.

Nie bez znaczenia jest reżim czasowy podawania EPO. Porównanie wyników wielu prac zdaje się wska-

zywać na dwa okresy skuteczności EPO: wczesny i późny. We wczesnym okresie najskuteczniejsze jest podanie pojedynczej dawki w ciągu 1. godz. zawału lub tuż przed przewiązaniem tętnicy wieńcowej. Skuteczność szybko maleje z czasem, tak że po 12 godz. słabe efekty można osiągnąć tylko za pomocą bardzo wysokich dawek. Po 24 godz. jednorazowa dawka jest całkowicie nieskuteczna [13, 14, 16]. Podawanie EPO w ciągu 6 kolejnych dni [16] lub w ciągu 3 tygodni [18] po powstaniu zawału nie dawało lepszych efektów niż pojedyncza dawka w 1. dniu po przewiązaniu tętnicy.

Jednakże EPO podawana od 2. lub 6. tygodnia po zawale w ciągu następnych 4–6 tygodni powodowała ograniczenie rozstrzeni LV, znaczną poprawę parametrów hemodynamicznych oraz pobudzała angiogenezę [21, 22].

Wydaje się, że korzystne efekty EPO podawanej wczesnie po zawale wynikają głównie z hamowania apoptozy, natomiast w późnym okresie są wynikiem zwiększenia perfuzji mięśnia sercowego na skutek pobudzenia angiogenezę. Za tym ostatnim przemawia fakt, że w późnym okresie korzystne wyniki można osiągnąć, podając EPO tylko w dawkach powodujących zwiększenie liczby endotelialnych komórek progenitorowych szpiku we krwi obwodowej. Mniejsze dawki pozostają bez efektu [22].

Komórkowe szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez wiązanie EPO z jej receptorem

Cytoprotekcyjne działanie EPO jest wynikiem jej wiązania z EPO-R. Może on występować samodzielnie lub w kompleksie z homodimerem, tzw. wspólnym receptorem β (β cR), znanym również jako CD131. Działanie erytropoetyczne EPO nie wymaga obecności β cR, natomiast jej działanie cytoprotekcyjne realizowane jest wyłącznie przez wiązanie z kompleksem EPO β cR [26]. Kompleks ten aktywuje szereg szlaków przekazujących sygnały do jądra komórkowego. Początkowym ogniwem dwu z nich jest kinaza tyrozynowa JAK2. Fosforyluje ona przekaźnika sygnałów i aktywatora transkrypcji STAT 5, który hamuje ekspresję cytokin pozapalnych, aktywuje również kinazę trisfosfoinozytolu (PI3K), która z kolei aktywuje kinazę Akt, a ta w końcowym efekcie również hamuje ekspresję cytokin prozapalnych [27, 28]. Kinaza Akt ponadto unieczynnia kinazę syntazy glikogenu (GSK3- β), której aktywacja lub nadekspresja nasila apoptozę [24].

Kinaza trisfosfoinozytolu, poza aktywacją Akt, aktywuje również eNOS, przez co m.in. ogranicza stres oksydacyjny [28].

Jak się wydaje, ważnym czynnikiem ograniczającym uszkodzenie w czasie ischemii jest również akty-

wacja i translokacja do błonowej frakcji komórkowej proteinkinazy C (PKC ϵ) [19].

Dokładne schematy wymienionych powyżej szlaków sygnalizacyjnych i przedstawienie ich roli w przeroście i niewydolności serca zamieszczono m.in. we wcześniejszej pracy poglądowej autora [29].

Badania kliniczne

O ile w badaniach przedklinicznych zajmowano się głównie wpływem EPO na przebieg zawału, o tyle w badaniach klinicznych dominują prace dotyczące wyników leczenia EPO przewlekłej niewydolności serca.

Od 15 do 65% chorych (znaczące różnice w poszczególnych doniesieniach) z niewydolnością serca ma niedokrwistość definiowaną jako poziom Hb <12 g/L. W kilku badaniach klinicznych wykazano, że niedokrwistość jest niezależnym czynnikiem ryzyka zgonów i rehospitalizacji chorych z niewydolnością serca [30, 31]. Liczne badania tych chorych wskazują, że im większa jest niedokrwistość, tym cięższa niewydolność oceniana upośledzeniem rozkurczowej i skurczowej czynności komory, dusznością i męczliwością, tolerancją wysiłku, niższym ciśnieniem, większą częstością bicia serca i wyższym ciśnieniem zaklinowania w tętnicy płucnej. U chorych tych niewydolności serca towarzyszy szybko postępujące upośledzenie wydolności nerek [31].

Badania na modelach zwierzęcych zawału, przerostu i niewydolności wskazują, że uszkodzenie serca upośledza jego czynność znacznie silniej przy współistniejącej niedokrwistości.

Mechanizm uszkodzenia serca przez niedokrwistość

Upośledzenie ukrwienia tkanek prowadzi do rozszerzenia naczyń i spadku ciśnienia, co z kolei powoduje pobudzenie układu współczulnego, wydzielanie angiotensyny II (AT II) i przyspieszenie czynności serca. Na skutek tego niedokrwistość może być niezależnym czynnikiem powodującym przerost serca. Upośledzenie ukrwienia dotyczy również nerek, co prowadzi do stopniowego zaburzenia ich funkcji, do niewydolności włącznie. Niedokrwistość towarzyszy niewydolności serca szczególnie u chorych na cukrzycę.

Niedokrwistość w niewydolności serca spowodowana jest przede wszystkim niewydolnością nerek powstałą na skutek zaburzenia ich ukrwienia oraz upośledzeniem wchłaniania i dystrybucji żelaza. Ponadto niewydolne serce wydziela cytokiny, przede wszystkim TNF- α , który może hamować produkcję EPO w nerkach, hamować jej działanie w szpiku oraz

hamować wydzielanie żelaza z układu siateczkowo-śródbłonowego, tak że nie dociera ono do szpiku. Wiele badań wskazuje, że im wyższy poziom TNF- α u chorych z niewydolnością serca, tym niższy poziom Hb. Na skutek swego naczyniozwiązującego działania AT II upośledza ukrwienie nerek, a zmniejszenie ciśnienia parcjalnego tlenu w przestrzeni okołokanalikowej pobudza ekspresję i wydzielanie EPO. Inhibitory ACE, hamując produkcję AT II, hamują w ten sposób wydzielanie EPO, przyczyniając się do pogłębienia niedokrwistości u leczonych nimi chorych [31, 32]. Krańcowym rezultatem tych współzależności jest zespół sercowo-nerkowy. W zespole tym tworzy się błędne koło: ciężka niewydolność serca pogłębia niewydolność nerek, a niewydolność nerek pogarsza niewydolność serca. Jednym z zasadniczych ogniw tego błędnego koła jest zahamowanie ekspresji EPO w nerkach prowadzące do ciężkiej niedokrwistości i utraty cytoprotekcyjnego działania EPO zarówno w stosunku do serca, jak i nerek [7]. Dokładniejsza analiza tego zespołu i wyniki leczenia EPO wykraczają poza ramy tej pracy.

EPO w leczeniu przewlekłej niewydolności serca

Obecnie stosowane są w warunkach klinicznych trzy postacie EPO: epoetyna- α , epoetyna- β i darbepoetyna- β . Epoetyny są rekombinowanymi ludzkimi EPO. Ich połowiczny czas trwania w osoczu po podaniu dożylnym wynosi 6–8 godz. Darbepoetyna jest analogiem ludzkiej EPO o przedłużonym działaniu. Posiada ona znacznie silniejsze powinowactwo do EPO-R, a jej połowiczny czas trwania w osoczu wynosi ok. 48 godz. [32]. Dawkowanie tych preparatów było różne w różnych pracach, na ogół od 15 tys. do 30 tys. jednostek/tydzień w jednej lub w podzielonych dawkach, w ciągu kilku tygodni do kilku miesięcy. Zwykle leczenie za pomocą EPO wspomagane było podawaniem preparatów żelaza.

Do chwili zakończenia niniejszej pracy w różnych ośrodkach leczono za pomocą EPO w sumie ok. 400 chorych z przewlekłą niewydolnością serca, najczęściej w klasach III–IV NYHA. Chorzy ci mieli wyjściowo niedokrwistość (Hb <12 g/L). Uzyskiwano trwałe zwiększenie zawartości Hb [33–36], przesunięcie w klasach NYHA, zwiększenie LVEF [34] i wydolności fizycznej przejawiające się zwiększeniem maksymalnego zużycia tlenu i tolerancji wysiłku (wydłużenie czasu marszu) oraz poprawę komfortu życia [35], jak również zmniejszenie częstości hospitalizacji i zmniejszenie potrzeby stosowania leczenia moczopędnego [34]. W najnowszym, przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby i kontrolowanym place-

bo, wieloośrodkowym badaniu z randomizacją poświęconym badaniu wpływu darbepoetyny- α na wydolność fizyczną pacjentów z niewydolnością serca i niedokrwistością wyniki były mniej optymistyczne [36]. Mimo trwałej korekty niedokrwistości, zanotowano jedynie tendencję do wydłużenia czasu wysiłku, poprawę komfortu życia i zmniejszenie liczby rehospitalizacji, ale nie było wzrostu maksymalnego zużycia tlenu ani przesunięcia w klasach NYHA. Poprawie wydolności fizycznej stwierdzonej w badaniu Mancini i wsp. [35] nie towarzyszyło zwiększenie przepływu krwi przez pracujące mięśnie szkieletowe, z czego można wnosić, że przyczyną poprawy stanu chorych była korekta niedokrwistości. Takiego zdania są w zasadzie wszyscy autorzy cytowanych powyżej prac. Jednakże biorąc pod uwagę wielokierunkowe działanie EPO stwierdzone w badaniach przedklinicznych, można przypuszczać, że inne mechanizmy też mogą być istotne – np. pobudzenie angiogenezy w niewydolnym sercu mogłoby zwiększyć perfuzję mięśnia sercowego, poprawiając w ten sposób jego kurczliwość. Stwierdzenie ostatnio również u człowieka mobilizacji przez EPO endotelialnych komórek progenitorowych szpiku [37] czyni to przypuszczenie prawdopodobnym.

Autorowi niniejszej pracy znana jest tylko jedna publikacja [37] opisująca wyniki stosowania EPO w ostrym zawału u ludzi. Jednorazowa dawka 300 μ g darbepoetyny- α u 22 pacjentów z pierwszym zawałem leczonym pierwotną koronaroplastyką powodowała w ciągu 72 godz. nieistotny wzrost hematokrytu i ok. 3-krotny wzrost ilości endotelialnych komórek progenitorowych szpiku we krwi obwodowej. Niepożądanych efektów nie obserwowano. Po 4 mies. od zawału nie było różnicy w EF pomiędzy grupą otrzymującą darbepoetynę i grupą kontrolną.

Ponadto w 2006 r. rozpoczęto, sponsorowane przez Narodowy Instytut Zdrowia w Bethesda, wieloośrodkowe, przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby, kontrolowane placebo badanie z randomizacją nad wpływem EPO na wielkość zawału i przemodelowanie LV pacjentów z pierwszym, dużym zawałem.

Potencjalne szkodliwe efekty uboczne EPO

Wprawdzie w żadnej z cytowanych powyżej prac nie stwierdzono objawów ubocznych działania EPO, uniemożliwiających jej dalsze stosowanie, ale niektóre jej właściwości skłaniają do ostrożności. Mianowicie u dializowanych chorych z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych EPO stwierdzono większą częstość zakrzepów i zawałów, co mogło być spowodowane jej bezpośrednim wpływem na płytki krwi oraz zagęszczeniem krwi na skutek wzrostu hemato-

krytu. Z tego powodu ogranicza się wzrost hematokrytu u tych chorych do 30% [32].

Drugim potencjalnym szkodliwym działaniem EPO jest wzrost tętniczego ciśnienia krwi na skutek jej obkurczającego wpływu na mięśnie gładkie naczyń.

Podsumowanie

Badania przedkliniczne przekonująco dowodzą, że EPO działa zdecydowanie cytoprotekcyjnie na miocyty serca oraz że pobudza ona angiogenezę. Te wyniki budzą nadzieję, że EPO może się stać skutecznym lekiem w zawale i niewydolności serca. Dotychczasowe, dość skąpe badania kliniczne zdają się tę nadzieję wzmacniać, ale dla sprawdzenia skuteczności EPO konieczne są dalsze wieloośrodkowe, w pełni zobjektywizowane badania na znacznie większych niż do tej pory grupach pacjentów.

Piśmiennictwo

- Kuratowska Z, Lewartowski B, Lipiński B. Chemical and biologic properties of an erythropoietin-generating substance obtained from perfusates of isolated anoxic kidneys. *J Labor Clin Med* 1964; 64: 226-37.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; 313: 806-10.
- Lai PH, Everett R, Wang FF, et al. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1986; 261: 3116-21.
- Kuratowska Z, Lewartowski B, Michalak E. Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood* 1961; 18: 527-34.
- Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 1993; 44: 1149-62.
- Coussons PJ, Baig S, Fanutti C, et al. Novel tissue remodelling roles for human recombinant erythropoietin. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 1129-30.
- Jie KM, Verhaar MC, Cramer MJ, et al. Erythropoietin and the cardiorenal syndrome: cellular mechanisms on the cardiorenal connectors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: F932-F944.
- Schwartzenberg S, Ben-Shoshan J, Keren G, et al. The role of erythropoietin in myocardial protection: potential mechanisms and applications. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006; 4: 41-50.
- Ehrenreich H, Hassenblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002; 8: 495-505.
- Książek P, Książek A. Czy ludzką rekombinowaną erytropoetynę (rHuEPO) można uważać za lek kardiologiczny? *Przegl Lek* 2005; 62 Suppl 2: 22-5.
- Snopek G, Popielarz-Grygalewicz A, Dąbrowski M. Erytropoetyna – czy nowe możliwości w leczeniu niewydolności serca? *Postepy Hig Med Dosw* (online) 2005; 59: 358-61.
- Hale SL, Sesti C, Kloner RA. Administration of erythropoietin fails to improve long-term healing or cardiac function after myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 211-5.
- Hirata A, Minamino T, Asanuma H, et al. Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 176-84.
- Moon C, Krawczyk M, Ahn D, et al. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11612-7.
- Moon C, Krawczyk M, Paik D, et al. Cardioprotection by recombinant human erythropoietin following acute experimental myocardial infarction: dose response and therapeutic window. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005; 19: 243-50.
- Moon C, Krawczyk M, Lakatta EG, et al. Therapeutic effectiveness of a single vs multiple doses of erythropoietin after experimental myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20: 245-51.
- Moon C, Krawczyk M, Paik D, et al. Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 999-1005.
- Nishiya D, Omura T, Shimada K, et al. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci* 2006; 101: 31-9.
- Hanlon PR, Fu P, Wright GL, et al. Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *FASEB J* 2005; 19: 1323-5.
- Fioridaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2046-51.
- Li Y, Takemura G, Okada H, et al. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 684-94.
- Prunier F, Pfister O, Hadri L, et al. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H522-9.
- van der Meer P, Lipsic E. Erythropoietin: repair of the failing heart. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 185-6.
- Nishihara M, Miura T, Miki T. Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H748-55.
- Tada H, Kagaya Y, Takeda M, et al. Endogenous erythropoietin system in non-hematopoietic lineage cells

- plays a protective role in myocardial ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 466-77.
26. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 14907-12.
27. Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 2005; 100: 397-403.
28. Feng Q. Beyond erythropoiesis: The anti-inflammatory effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 615-7.
29. Lewartowski B, Mackiewicz U. Komórkowe szlaki przekazywania sygnałów w przeroście i niewydolności serca. *Kardiologia Polska* 2006; 64 Suppl VI: S591-600.
30. Szachniewicz J, Petruk-Kowalczyk J, Majda J, et al. Anaemia is an independent predictor of poor outcome in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2003; 90: 303-8.
31. Silverberg DS, Wexler D, Blum M, et al. Erythropoietin in heart failure. *Semin Nephrol* 2005; 25: 397-403.
32. Tang YD, Katz SD. Anemia in chronic heart failure: prevalence, etiology, clinical correlates, and treatment options. *Circulation* 2006; 113: 2454-61.
33. Cleland JG, Sullivan J.T, Ball S, et al. Once-monthly administration of darbepoetin alfa for the treatment of patients with chronic heart failure and anemia: a pharmacokinetic and pharmacodynamic investigation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 155-61.
34. Silverberg DS, Wexler D, Blum M, et al. Effects of treatment with epoetin beta on outcomes in patients with anaemia and chronic heart failure. *Kidney Blood Press Res* 2005; 28: 41-7.
35. Mancini DM, Katz SD, Lang CC, et al. Effect of erythropoietin on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 294-9.
36. Ponikowski P, Anker SD, Szachniewicz J, et al. Effect of darbepoietin alfa on exercise tolerance in anemic patients with symptomatic chronic heart failure: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2006 (w druku, tekst udostępniony przez Autora).
37. Lipsic E, van der Meer P, Voors AA, et al. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; 20: 135-41.