

SESJA II

PIĄTEK 21.10, 10.10–11.30

ŚRÓDBŁONEK

7

Porównanie wpływu fluwastatyny i cholestyraminy na gęstość receptorów angiotensynowych AT1, stres oksydacyjny i czynność śródbłonka naczyniowego

Marek Kuliszek¹, Michał Mączewski², Grzegorz Styczyński³, Monika Duda², Andrzej Beręsewicz², Grzegorz Opolski¹

¹Katedra i Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna, Warszawa

²Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

³Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Nadciśnienia Tętniczego, Akademia Medyczna, Warszawa

Wstęp: Statyny, oprócz obniżenia stężenia cholesterolu LDL, powodują również zmniejszenie gęstości receptorów angiotensynowych AT1 (AT1R), zmniejszenie stresu oksydacyjnego oraz poprawę czynności śródbłonka. Celem obecnej pracy była pośrednia ocena, czy efekty te zależne są jedynie od obniżenia stężenia cholesterolu LDL, poprzez porównanie wpływu fluwastatyny i cholestyraminy na ww. parametry.

Metody: U 24 pacjentów z hipercholesterolemią (cholesterol LDL >130 mg/dL) nieleczonych hipolipemizująco oceniano: 1. lipidogram, 2. gęstość receptorów angiotensynowych AT1 na płytkach krwi, 3. stężenie F2-izoprostanów (marker stresu oksydacyjnego) oraz 4. rozszerzalność tętnicy ramiennej zależną od przepływu (*flow mediated dilation*, FMD – marker czynności śródbłonka). Pacjentów randomizowano do leczenia fluwastatyną (80 mg, tabletki o przedłużonym uwalnianiu, n=12) lub cholestyraminą (16 g, bid, lek hamujący wchłanianie kwasów żółciowych, n=12); 4 pacjentów przerwało leczenie z powodu działań niepożądanych). Badania wykonywano wyjściowo i po 8 tygodniach leczenia.

Wyniki: Fluwastatyna powodowała nieznacznie większą redukcję stężenia cholesterolu LDL niż cholestyramina (40% vs 29%). Terapii fluwastatyną towarzyszyło jednakże istotne obniżenie gęstości receptorów AT1 (48%: z 17,06 do 8,76 rec/płytkę, p<0,05) oraz stężenia F2-izoprostanów w surowicy krwi (34%: z 29,65 do 19,55 pg/ml, p<0,05) i nieznamiennie zwiększenie FMD (8%: z 8,82 do 9,52%, p=ns). W grupie cholestyraminy obserwowano znacznie mniejsze i nieistotne statystycznie obniżenie gęstości receptorów AT1 (18%: z 17,94 do 14,71 rec/płytkę, p=0,065), nie obserwowano zmian stężenia F2-isoprostanów (z 23,55 do 23,62 pg/ml, p=ns), FMD uległo nieznamiennemu zmniejszeniu (25%: z 9,70 do 7,20%, p=ns).

Wnioski: Wyniki badania sugerują, że fluwastatyna niezależnie od obniżenia stężenia cholesterolu LDL powoduje obniżenie gęstości receptorów AT1, zmniejszenie stresu oksydacyjnego i poprawia czynność śródbłonka. Cholestyramina, która również obniża stężenie cholesterolu LDL, nie wykazuje takich działań.

8

Wybrane markery uszkodzenia śródbłonka u chorych ze stabilną chorobą niedokrwienną serca i z przebyłym zakażeniem *Chlamydia pneumoniae*

D. Drobniak-Hetdak¹, W. Kolańska-Kloch¹, R. Rajtar¹, A. Furgata³, M. Kloch², B. Kieć-Wilk², A. Dembińska-Kieć²

¹II Klinika Kardiologii, Instytutu Kardiologii, Warszawa

²Zakład Biochemii Klinicznej, Katedra Biochemii Klinicznej, MIASTO

³Katedra Patofizjologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wprowadzenie: Przewlekłe subkliniczne zapalenie, manifestujące się podwyższonym poziomem markerów uszkodzenia śródbłonka oraz przebyta infekcja *Chlamydia pneumoniae*, wyrażająca się obecnością przeciwciał IgG, mogą predysponować do rozwoju miażdżycy.

Cel pracy: Ocena stężeń wybranych markerów uszkodzenia śródbłonka u chorych ze stabilną chorobą niedokrwienną serca i z przebyłym zakażeniem *Chlamydia pneumoniae*.

Materiał i metodyka: Badaniem objęto 40 mężczyzn: 25 ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (ch.n.s.) potwierdzoną koronarograficznie oraz 15 zdrowych stanowiących grupę kontrolną, w wieku 37–53 lat z przebyłym zakażeniem *Chlamydia pneumoniae*: IgG >45 EIU u 100% (ch.n.s. oraz grupa kontrolna); IgA >12 EIU u 52% (ch.n.s.) vs 60% (grupa kontrolna). Z badania wyłaczono osoby otyłe, palące tytoń, z nadciśnieniem tętniczym, cukrzycą, aktywnym procesem zapalnym, schorzeniami autoimmunologicznymi i nowotworowymi. Markery uszkodzenia śródbłonka oznaczano około 6 miesięcy po skutecznym zabiegu angioplastyki tętnic wieńcowych. U wszystkich badanych oznaczono w surowicy krwi rozpuszczalne formy: TNF α , IL-6, VCAM-1, ICAM-1, TM (trombomodulina).

Wyniki: Średnie stężenie IL-6 było istotnie wyższe w grupie chorych z ch.n.s. w porównaniu z osobami zdrowymi (1,39±0,76 pg/ml vs 0,96±0,55 pg/ml; p=0,016). Podobnie średnie stężenie ICAM-1 było istotnie statystycznie wyższe w grupie osób z ch.n.s. w porównaniu z grupą kontrolną (293,6±70,57 ng/ml vs 213,29±43,34 ng/ml; p=0,0003). Wykazano istotnie statystycznie niższe średnie stężenie TM u chorych z ch.n.s. w porównaniu z osobami zdrowymi (32,69±7,86

ng/ml vs 42,09±7,56 ng/ml; p=0,0002). Stwierdzono wyższe średnie stężenia TNF α oraz VCAM-1 wśród osób z ch. n. s. w porównaniu z grupą kontrolną, ale badane różnice nie były istotne statystycznie.

Wnioski: Podwyższone markery uszkodzenia śródbłonka u chorych ze stabilną ch. n. s., z przebyłym zakażeniem *Chlamydia pneumoniae* oraz bez klasycznych czynników ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca, potwierdzają przyczynową rolę zapalenia w rozwoju miażdżycy.

9

Nanobakterie – przyczyna wapnienia struktur układu sercowo-naczyniowego?

¹Ryszard Kalawski, ²Adam Kaznowski

¹Oddział Kardiologii, Szpital Miejski im. J. Strusia, Poznań

²Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

Patomechanizm powstawania zwapnień struktur anatomicznych w układzie sercowo-naczyniowym jest nadal niejasny. Istnieją teorie wiążące powstawanie zwapnień z tłem immunologicznym, poprzez zaburzenia gospodarki mineralnej do teorii próbujących wyjaśnić to zjawisko zaburzeniami genetycznymi.

Przypadkowe odkrycie nanobakterii podczas analizy materiałów geologicznych zapoczątkowało poszukiwania jej obecności także w organizmach żywych. Nanobakterie są organizmami o wielkości 50–500 nanometrów. Lokuje je to pomiędzy bakteriami i wirusami. Zalicza się je do atypowych bakterii karłowatych (*dwarf bacteria*). Uznane są za najmniejsze organizmy zdolne do autonomicznej replikacji. Nanobakterie charakteryzują się odkładaniem apatytów węglowych (węglan fosforowo-wapniowy) w ścianie komórkowej, co jest kojarzone z patomechanizmem tworzenia zwapnień wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Namnaża się je w płynach stosowanych do hodowli komórkowych, w których wykazują powolny wzrost, tworząc biofilm. Wykazują właściwości cytotoksyczne. Charakteryzują się dużą odpornością na czynniki chemiczne i fizyczne.

Prawdopodobny patomechanizm powstawania zwapnień struktur anatomicznych w układzie sercowo-naczyniowym, tzn. zastawek serca, naczyń tętniczych, w tym również naczyń wieńcowych, jest następujący. Po zakażeniu bakterie wnikają do komórek nabłonkowych, wytwarzają biofilm jako czynnik ochronny i adhezyjny. Namnażają się wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo, wytwarzając jako jedyne żywe prokariotyczne organizmy biogeny węglan apatytu. Prowadzi to do dalszego uszkodzenia komórek nabłonkowych i ich wapnienia.

Do wykrywania zakażeń nanobakteryjnych używa się metod pośrednich i bezpośrednich, takich jak mikroskopia elektronowa, namnażanie w płynnych podłożach stosowanych do

hodowli komórek lub w hodowlach komórkowych, spektroskopię do wykrywania węglanu apatytu czy też testy immunoenzymatyczne ELISA do detekcji przeciwciał antynanobakteryjnych w surowicy krwi.

Podjęto próby określania wrażliwości nanobakterii na różne leki: chemioterapeutyki i antybiotyki. Istnieją próby skojarzonego leczenia zakażeń nanobakteryjnych antybiotykami i EDTA (chelaterapia) w oczekiwaniu na skuteczniejszą ingerencję w gospodarkę mineralną.

Doniesienia o ścisłym związku obecności nanobakterii ze złogami wapnia w strukturach anatomicznych układu sercowo-naczyniowego skłoniła nas do zainteresowania się tym problemem. Eksperyment polegał na poddaniu analizie zwapniałych odpadowych materiałów uzyskiwanych podczas operacji kardiologicznych. Były to usunięte zwapniałe zastawki serca oraz zwapniała błona wewnętrzna naczyń wieńcowych usunięta (endarterektomia) podczas pomostowania aortalno-wieńcowego.

Pobrany materiał poddawany był homogenizacji i odpowiedniej filtracji, a następnie posiewany na specjalne podłoża do hodowli komórek. We wszystkich przypadkach (16) po wielotygodniowej hodowli tak spreparowanych zastawek aortalnych uzyskano wynik pozytywny, uzyskując biofilm o mlecznym zabarwieniu na dnie butelki hodowlanej. W mikroskopie odwróconym widoczne były depozyty kryształów. Podobne wyniki uzyskano w czterech przypadkach na pięć zastawek mitralnych oraz dodatni wynik posiewu zwapniałej błony wewnętrznej naczyń wieńcowych. Badania te traktujemy jako wprowadzające do dalszych bardziej dogłębnych analiz tego interesującego problemu.

10

Mikrocząstki śródbłonka we krwi obwodowej u pacjentów po wykonaniu planowej angioplastyki wieńcowej

Grzegorz Piotrowski¹, Barbara Cebula², Maciej Kośmider¹, Zenon Gawor¹, Tadeusz Robak², Piotr Smolewski²

¹Oddział Kardiologii i Chorób Wewnętrznych, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika, Łódź

²Klinika Hematologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

We krwi obwodowej krążą fragmenty uwolnionego śródbłonka (EMP – *endothelial microparticles*). Trwa dyskusja na temat sposobu ich tworzenia się. W pracy podjęto próbę oceny, czy EMP tworzą się w wyniku uszkodzenia śródbłonka (jak to dzieje się podczas PTCA), czy powstają w końcowym etapie dezintegracji komórek śródbłonka ulegających apoptozie.

Materiał i metody: W osoczu ubogopłytkowym uzyskanym od 16 pacjentów (9 mężczyzn i 7 kobiet) w wieku 54±17 lat oznaczono odsetek EMP przed i 30 min po zabiegu PTCA meto-

dą cytometrii przepływowej. Identyfikacji EMP dokonano w oparciu o ekspresję antygenów na komórkach śródbłonka CD31 (PECAM-1) oraz CD51 ($\alpha_v\beta_3$, *vitronectin receptor*). U wszystkich pacjentów wykonano PTCl z powodu krytycznej zmiany w naczyniu wieńcowym, która dawała objawy kliniczne. Dla odróżnienia EMP od płytek krwi oznaczono ekspresję antygeny CD31, który występuje na płytkach krwi (CD31+/CD42+), a nie występuje na EMP (CD31+/CD42-). Oceniano także stężenie krążących EMP wykazujących koekspresję antygenów CD51 i CD31 charakteryzujących EMP (CD51+/CD31-).

Wyniki: Stężenie EMP (CD31+/CD42-) przed PTCA wynosiło $2,59 \pm 1,19\%$, natomiast po PTCA $3,64 \pm 2,86\%$. Odsetek EMP (CD51+/CD31+) wynosił przed i po PTCA odpowiednio $0,21 \pm 0,22\%$ i $0,28 \pm 0,29\%$. W obydwu przypadkach wzrosty stężenia EMP po PTCl nie były istotne statystycznie.

Wnioski:

1. Zabieg PTCA nie powoduje istotnego wzrostu liczby krążących EMP.
2. Prawdopodobnie krążące we krwi EMP nie pochodzą z miejsc mechanicznego uszkodzenia śródbłonka, lecz są wykładnikiem dezintegracji komórek śródbłonka ulegających apoptozie. Proces ten prawdopodobnie nasilony jest w przypadku dysfunkcji śródbłonka.

11

Wpływ zahamowania działania aldosteronu przez kanrenon na fenotyp niewydolności serca u myszy $Tg\alpha q^{*44}$

Ł. Drelicharz, S. Chłopiński

Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Katedra Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

W świetle współczesnych badań aldosteron jawi się jako jeden z podstawowych czynników w patologii układu krążenia. Szczególne znaczenie aldosteronu w patologii niewydolności serca wykazały liczne badania eksperymentalne i kliniczne, ale dopiero badania RALES i EPHEsus w sposób jednoznaczny potwierdziły, że zastosowanie antagonistów aldosteronu daje wymierne korzyści pacjentom z niewydolnością serca.

Celem naszych badań była analiza zmian zachodzących w niewydolnym sercu pod wpływem 4-miesięcznego leczenia antagonistą receptora aldosteronowego – kanrenonem, u myszy transgenicznym ($Tg\alpha q^{*44}$) z nadekspresją aktywnej podjednostki $g\alpha q$ w kardiomiocytach.

Badania prowadzono u 16-miesięcznych myszy $Tg\alpha q^{*44}$. Grupę badaną stanowiły myszy $Tg\alpha q^{*44}$ leczone przez 4 miesiące (od 12. miesiąca życia) kanrenonem (dodawanym do wody pitnej, w dawce 20 mg/kg/dz). Jako kontrolę stosowano myszy nieleczone $Tg\alpha q^{*44}$, w tym samym wieku. Analizę czynności krążenia wieńcowego prowadzono przy użyciu mo-

delu izolowanego serca myszy (wg Langendorffa). Oceniano odpowiedzi naczyniorozszerzające zależne od śródbłonkowego NO (bradykinina [BK], adenozylna [Ad], *reaktywną hypereimię*) zależne od śródbłonkowej PGI_2 (acetylocholina [Ach]) i odpowiedzi naczyniorozszerzające niezależne od śródbłonka (SNAP). Ponadto w efluencie z naczyń wieńcowych oznaczano poziom stabilnego metabolitu PGI_2 , 6-keto- $PGF_{1\alpha}$. Analizowano również zastój w krążeniu małym, oceniając współczynnik sucha – mokra masa płuc oraz zmiany makroskopowe serc, oceniając współczynnik masa komór – masa ciała.

Leczenie kanrenonem zmniejszyło nieznacznie śmiertelność myszy $Tg\alpha q^{*44}$ w porównaniu do grupy nieleczonej. Podobnie, odpowiedzi naczyniorozszerzające zależne od śródbłonkowego NO były nieznacznie większe w grupie leczonej. Nie obserwowano żadnych różnic makroskopowych serc oraz różnic w zastoiu w krążeniu małym. Wielkość produkcji PGI_2 w sercach obu grup była porównywalna.

Podsumowując, blokowanie działania aldosteronu myszy $Tg\alpha q^{*44}$ z niewydolnością serca ma niewielki wpływ na śmiertelność oraz czynność śródbłonka naczyń wieńcowych. Sugerujemy, że niewielkie tylko efekty leczenia kanrenonem na fenotyp niewydolności serca u myszy $Tg\alpha q^{*44}$ związane są z tym, że nie hamowano równocześnie działania angiotensyny II na naczynia wieńcowe i mieśnię sercowe. Dopiero łączne zastosowanie inhibitorów ACE (lub antagonistów receptora AT_1) i antagonistów receptora aldosteronowego może dawać pełną ochronę układu sercowo-naczyniowego przed uszkadzającym działaniem układu renina-angiotensyna-aldosteron.

12

Modyfikacja odpowiedzi zapalnej wśród chorych z ostrym zespołem wieńcowym pod wpływem zastosowania tirofibanu

P. Kałmucki, M. Majewski, A. Bolewski, W. Rafiński, T. Siminiak

Akademia Medyczna, Oddział Kardiologii, Szpital Wojewódzki, Poznań

Wstęp: Aktywacja granulocytów obojętnochłonnych (PMN) w przebiegu ostrego zespołu wieńcowego (OZW) może być wywołana zarówno uwalnianiem mediatorów z niedokrwionego mięśnia sercowego, jak i wynikać z bezpośrednich, nie do końca poznanych interakcji pomiędzy płytkami krwi i granulocytami.

Metody: Do badania włączono 39 pacjentów z rozpoznaniem OZW bez uniesienia ST w wieku od 49 do 85 lat (średnio 63,7 lat). Ocenie poddano wpływ dodatkowego zastosowania inhibitora płytkowego receptora IIb/IIIa tirofibanu (19 pacjentów), w stosunku do rutynowego leczenia przeciwkrzepliwego (20 chorych) obejmującego: aspirynę, kłopidogrel i enoxaparynę na stopień ekspresji molekuł adhezyjnych na

powierzchni PMN pod wpływem osocza badanych pacjentów, pobieranego: w momencie przyjęcia na oddział, po 4, 24, 48 godz. i w dniu wypisu.

Wyniki: W grupie pacjentów leczonych bez tirofibanu odnotowano istotny statystycznie wzrost ekspresji CD18 ($40,42 \pm 6,53$ vs $44,36 \pm 7,199$; $p=0,0414$) na powierzchni kontrolnych PMN pod wpływem osocza pobranego w 4 godz. od przyjęcia na oddział w stosunku do wartości wyjściowych, a następnie istotny spadek ekspresji tego antygenu ($44,36 \pm 7,199$ vs $40,50 \pm 7,059$; $p=0,0492$) pod wpływem osocza pobranego w 24 godz. od przyjęcia. Ekspresja L-selektyny na powierzchni PMN pod wpływem osocza pobranego w ostatnim dniu pobytu szpitalnego wyniosła ($61,09 \pm 5,856$) i była istotnie wyższa w porównaniu do wartości odnotowanych w momencie przyjęcia ($46,44 \pm 3,277$), po 4 ($44,62 \pm 1,729$), i 48 godz. ($47,60 \pm 2,459$), co wskazuje na złuszczenie się CD62L do 48 godz. od czasu przyjęcia. Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w poziomach CD11b. Wśród pacjentów, którym podano tirofiban odnotowano zahamowanie wystąpienia, obserwowanego w pierwszej grupie, wzrostu ekspresji CD18 na PMN pod wpływem osocza pobranego w 4 godz. Zastosowanie tirofibanu prowadziło do zmniejszenia ekspresji CD11b na granulocytach ($584,9 \pm 27,19$ vs $659,5 \pm 28,05$; $p=0,0375$) pod wpływem osocza uzyskanego po 4 godz. od przyjęcia w stosunku do wartości wyjściowych. Podanie tego leku powodowało również zahamowanie złuszczenia się L-selektyny z powierzchni PMN. Badania in vitro nie wykazały bezpośredniego wpływu leku na PMN.

Wnioski: U chorych z OZW bez uniesienia ST podanie inhibitora IIb/IIIa prowadzi do zmiany aktywacji PMN.
