

## SESJA III PIĄTEK 21.10, 11.45–13.20 MIAŻDŻYCA

13

### Zaburzenia gospodarki lipidowej w aspekcie oporności na klopidogrel

Renata Głowczyńska, Łukasz A. Małek, Mateusz Śpiewak,  
Krzysztof J. Filipiak, Maria Zawadzka-Byśko,  
Marcin Grabowski, Monika Szpotańska, Marek Rosiak,  
Grzegorz Opolski

I Katedra i Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna, Warszawa

**Wstęp:** W świetle najnowszych zaleceń Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego leczenie przeciwplatekcyjne stanowi ważną opcję terapeutyczną u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (OZW) poddawanych angioplastyce wieńcowej. Niestety istotnym problemem jest zjawisko oporności na klopidogrel.

**Cel:** Określenie wpływu zaburzeń gospodarki lipidowej na występowanie oporności na klopidogrel.

**Metodyka:** Badaniem objęto grupę 48 pacjentów (średnia wieku  $60,3 \pm 10,6$  lat; 31 mężczyźni) hospitalizowanych z powodu OZW. U wszystkich pacjentów wykonano badanie koronarograficzne i włączono do leczenia klopidogrel. Pomiędzy 5. a 9. dobą leczenia oceniano funkcję płytek po stymulacji adenylozyny-difosforanem (ADP) przy pomocy aparatu PFA-100. Kryteria wyłączenia stanowiły stosowanie antagonistów receptorów GP IIb/IIIa, choroby nowotworowe i hematologiczne.

**Wyniki:** U 13 (27,1%) pacjentów stwierdzono biochemiczną oporność na klopidogrel, definiowaną jako czas do powstania czopu pierwotnego (ang. *Collagen/ADP cartridge closure time*, CT) – CADP-CT < 133 s. Nie wykazano istotnych różnic demograficznych u pacjentów z prawidłową i upośledzoną odpowiedzią na lek. W obydwu grupach pacjentów obserwowano podobne wartości lipidogramu. Średni poziom frakcji LDL cholesterolu w badanej populacji wyniósł  $109,7 \pm 44,1$  mg/dL i był istotnie niższy u pacjentów wykazujących oporność na lek ( $96,2$  mg/dL vs  $115,1$  mg/dL;  $p=NS$ ). Wśród pacjentów z prawidłową odpowiedzią na leczenie przeciwplatekcyjne stwierdzono również wyższy odsetek osób z podwyższonym poziomem  $LDL \geq 100$  mg/dL ( $51,4\%$  vs  $38,5\%$ ;  $p=NS$ ). W analizie wieloczynnikowej niski poziom LDL, obok poziomu fibrynogenu i wieku, wiązał się z występowaniem klopidogrelooporności (*odds ratio* [OR]=0,97; 95% *confidence interval* [95% CI] 0,94–0,99;  $p=0,035$ ).

**Wnioski:** Wydaje się, iż poziom LDL może wpływać na funkcję płytek krwi w aspekcie odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne. Dotychczas ukazały się jedynie nieliczne doniesienia sugerujące możliwy związek zaburzeń gospodarki lipidowej ze zjawiskiem klopidogrelooporności.

14

### Aktywacja PPAR $\alpha$ modyfikuje skład kwasów tłuszczowych fosfolipidów mięśnia sercowego

M. Baranowski, J. Górski

Zakład Fizjologii, Akademia Medyczna, Białystok

Celem niniejszych badań było określenie wpływu aktywacji PPAR $\alpha$  na skład kwasów tłuszczowych (FA) fosfolipidów (FL) mięśnia sercowego szczura. Do doświadczeń użyto szczurów rasy Wistar, samców o masie 200–240 g. Zwierzęta podzielono na dwie grupy: 1. szczury karmione standardową paszą dla gryzoni (zawartość tłuszczu 2,8%), 2. szczury karmione dietą bogatą w tłuszcz (zawartość tłuszczu 34%) przez trzy tygodnie. Każdą grupę podzielono na dwie podgrupy: a) kontrolna, b) podgrupa, której przez dwa tygodnie podawano dożołądkowo WY-14643 (specyficzny aktywator PPAR $\alpha$ ) w dawce 3 mg/kg masy ciała/dzień. Skład kwasów tłuszczowych FL mięśnia sercowego oraz wolnych FA osocza krwi oznaczano za pomocą chromatografii gazowo-cieczowej.

Podanie WY-14643 doprowadziło do znacznych modyfikacji składu kwasów tłuszczowych FL serca. Zmiany te były w znacznym stopniu niezależne od udziału tłuszczu w diecie i objawiały się wzrostem wartości stosunku wielonienasyconych FA z grupy n6 do kwasów tłuszczowych z rodziny n3, zwiększeniem udziału procentowego jednonienasyconych FA oraz spadkiem udziału kwasu dokozaheksaenowego i eikozapentaenowego. W przypadku szczurów karmionych standardową paszą zmiany składu procentowego kwasów tłuszczowych FL mięśnia sercowego w znacznym stopniu pokrywały się z tendencjami zanotowanymi dla wolnych FA osocza. U zwierząt, którym podawano dietę bogatą w tłuszcz, nie obserwowano jednak takiej zależności.

Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski: podanie aktywatora PPAR $\alpha$  modyfikuje skład nienasyconych FA fosfolipidów mięśnia sercowego niezależnie od udziału tłuszczu w diecie. U zwierząt karmionych standardową paszą zjawisko to jest prawdopodobnie wynikiem zmiany składu wolnych FA osocza. W przypadku szczurów karmionych dietą bogatą w tłuszcz ma raczej miejsce bezpośredni wpływ aktywatora PPAR $\alpha$  na metabolizm nienasyconych FA w mięśniu sercowym.

15

## Żywność funkcjonalna w profilaktyce choroby niedokrwiennej serca: składniki tłuszczu mlekowego (CLA) przyczyniają się do ograniczenia intensywności procesów zapalnych w ludzkich makrofagach

Ewa Stachowska, Dariusz Chlubek

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

**Wstęp:** Fosfolipazy  $A_2$  są rodziną enzymów hydrolizujących uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych (sn-2) i lizofosfolipidów z cząstek glicerofosfolipidów. W komórkach ssaków występują dwie główne klasy fosfolipaz: cytoplazmatyczna (cPLA<sub>2</sub>) i zewnątrzwydzielnicza (sPLA<sub>2</sub>). Fosfolipazy dostarczają kwasu arachidonowego dla cyklooksygenaz – konstitutywnej COX-1 oraz indukowanej COX-2. W zmienionych miażdżycowo ścianach naczyń krwionośnych, w regionach bogatych w makrofagi zaobserwowano wzmożoną ekspresję izoformy II-A zewnątrzwydzielniczej sPLA<sub>2</sub>. W makrofagach sPLA<sub>2</sub>-IIa aktywowana poprzez mechanizm indukcji odgrywa kluczową rolę w zależnej od COX-2 syntezie prostaglandyn. Dodatkowo sPLA<sub>2</sub>-II-A, indukując lipolizę LDL, przyczynia się do zwiększonej retencji LDL w matrix proteoglikanowej ściany aorty. Udowodniono, że cPLA<sub>2</sub> biorą udział w aktywacji sPLA<sub>2</sub>-IIA poprzez wykorzystanie produktów 12/15 lipoksygenazy (12/15 LOX). Produkty lipoksygenazy (9-HODE, 13-HODE) odgrywają kluczową rolę w stymulacji szlaku kinaz MAP – biorącym udział w fosforylacji i aktywacji receptorów jądrowych PPAR $\gamma$ .

**Metody:** Makrofagi pochodzące z linii komórkowej THP-1 hodowano przez 48 godz. w medium zawierającym kwasy tłuszczowe o stężeniu 30  $\mu$ M: linolowy, (*cis* 9, *cis* 12 C18: 2) lub CLA: *cis* 9, *trans* 11 C 18: 2; *trans* 19, *cis* 12 C 18: 2. Po zakończeniu inkubacji mierzono aktywność cPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub> – IIA, ich ekspresję, a także aktywność 12/15 LOX, stężenie jej produktów (9-HODE, 13-HODE i 15-HETE) oraz stężenie PGE<sub>2</sub>. Badano także fosforylację na szlaku kinaz MAP oraz ekspresję receptorów jądrowych PPAR  $\gamma$ .

**Wyniki:** CLA zmniejszają aktywność obydwu szlaków cPLA<sub>2</sub>/ 12/15 LOX oraz sPLA<sub>2</sub>-IIA/COX-<sub>2</sub>. Hamowanie aktywności 12/15 LOX przyczynia się do zmniejszenia syntezy 9 i 13-HODE oraz ograniczenia fosforylacji na szlaku kinaz MAP. Zmniejszona fosforylacja kinaz MAP prowadzi do aktywacji receptorów jądrowych PPAR  $\gamma$  odpowiedzialnych w komórkach za stymulację procesów antymiażdżycowych we wczesnym stadium miażdżycy.

Praca finansowana z grantu KBN nr 15 POB 11723

16

## Badanie przydatności wyników oznaczeń HSCRP i IMA do oceny efektu suplementacji diety witaminami E i C u mężczyzn z czynnikami ryzyka miażdżycy oraz zaawansowaną miażdżycą naczyń obwodowych

J. Górska<sup>1</sup>, J. Hartwich<sup>1</sup>, D. Siedlecka<sup>1</sup>, A. Gruca<sup>1</sup>, M. Dolecki<sup>2</sup>, W. Drożdż<sup>2</sup>, M. Trzos<sup>2</sup>, A. Dembińska-Kieć<sup>2</sup><sup>1</sup>Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków<sup>2</sup>II Klinika Chirurgii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

**Wstęp:** Liczne prace dokumentują wysoką skuteczność działania przeciwzapalnego, przeciwmiażdżycowego i przeciwnowotworowego witamin antyoksydacyjnych. Natomiast ostatnie wyniki badań klinicznych z randomizacją wykazały wzrost częstości występowania incydentów sercowo-naczyniowych w wyniku długotrwałego przyjmowania witaminy E w dziennej dawce powyżej 400 IU [1]. Wyniki badań klinicznych są zatem sprzeczne i niezadowalające w kwestii ustalenia wytycznych dla suplementacji diety witaminami. Weryfikacja czynników warunkujących biodostępność i efektywność działania witamin może być pomocna w zmniejszeniu tych rozbieżności. Celem badania było: 1. sprawdzenie bezpośredniego wpływu posiłku na biodostępność spożywanych witamin E i C; 2. ustalenie, czy wynik testu hsCRP i IMA/alb, zmodyfikowanej albuminy – nowego osocznego wskaźnika niedokrwienia, w relacji z parametrami stresu oksydacyjnego i potencjału antyoksydacyjnego u badanych mężczyzn: zdrowych (K), z czynnikami ryzyka miażdżycy (CR) i z potwierdzoną miażdżycą (M), jest czynnikiem różnicującym pacjentów podatnych na terapię antyoksydantami.

**Pacjenci:** Do badania zakwalifikowano 109 mężczyzn po wyłączeniu osób z rozpoznaniem przebytych incydentów wieńcowych, hsCRP>10mg/l i cukrzycą. Za czynniki ryzyka w grupie CR uznano: nadwagę i/lub otyłość, nieprawidłową glikemię na czczo, palenie tytoniu, nadciśnienie tętnicze. W grupie M chorzy przebyli w przeszłości leczeni operacyjnie z powodu zaawansowanej miażdżycy naczyń obwodowych. Preparaty Caps Vitaminum E (*tocopheroli acetat*) oraz Drag. Monovitan C (*acidum ascorbicum*) były przyjmowane łącznie, w dziennej dawce odpowiednio 200 mg (2 x 100 mg) i 400 mg (2 x 200 mg). Tryb przyjmowania witamin to: 1. na czczo [tryb BP] i 2. w trakcie dwóch głównych posiłków [tryb ZP] przez okres 2 tygodni, po okresie wyptukania. Badanie przeprowadzono na zasadzie *cross over* – pacjent kontrolował sam siebie.

**Metody:** Oszacowano antropometryczne wskaźniki otyłości (BMI, WHR, % tkanki tłuszczowej), insulinooporności (HOMA-IR) i nadciśnienia, oznaczono hsCRP, IMA/alb, lipido-

gram i osoczowe parametry stresu oksydacyjnego (TBARS, LOOH, podatność LDL na oksydację/AUC LDL/) oraz potencjału antyoksydacyjnego (FRAP, wit. E/g lipidów i wit. C w osoczu, oporność oks. LDL, grupy SH albuminy (SH/alb), wskaźnik kompensacji redox  $RCI = \frac{FRAP}{LOOH/cholesterol} \times 100$ ).

#### Wyniki:

1. Powyższe dawki witamin E i C nie zmieniły wartości ciśnienia tętniczego, stężeń lipidów, biochemicznych i antropometrycznych wskaźników insulinooporności (HOMA IR, BMI, % tk. tł., WHR) we wszystkich grupach badanych mężczyzn.
2. Ustalono, że tryb przyjmowania witamin z posiłkiem najefektywniej podwyższał ich zawartość w surowicy i to zarówno lipofilowego tokoferolu, jak i hydrofilowego askorbinianu.
3. Równoległe z większym wzrostem stężenia witamin we krwi zaobserwowano we wszystkich grupach znamienne wyższy procent zmiany wartości niektórych parametrów potencjału antyoksydacyjnego i stresu oksydacyjnego w trybie ZP vs BP.
4. Zbadano korelację uzyskanych po suplementacji w jednolitym już trybie – z posiłkiem, wartości hsCRP, IMA/alb z pozostałymi parametrami. Brak korelacji dla większości z nich oznaczał brak relacji przyczynowo-skutkowej. Wartości hsCRP po suplementacji korelowały znamienne dodatnio z IMA/alb po suplementacji, a znamienne ujemnie z uzyskanymi wartościami witE/lip. oraz SH/alb, sugerując przydatność tych testów w ocenie skuteczności działania witamin.

**Wnioski:** Zastosowanie łącznej suplementacji niską dawką witamin E i C w trybie z posiłkiem wzmacnia ich biodostępność. Efektem działania witamin był wzrost parametrów potencjału antyoksydacyjnego i obniżenie stresu oksydacyjnego w badanych grupach mężczyzn. Testy hsCRP i IMA/alb wydają się być przydatne w ocenie skuteczności działania witamin i kwalifikacji do ich zastosowania.

#### Piśmiennictwo

Lonn E, Bosch J, Yusuf S, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 293: 1338-47.

*Praca była finansowana z projektu MNiI WŁ/208/P/L*

17

## Podwyższone stężenia rozpuszczalnych selektyn są związane z obecnością mutacji genu receptora LDL

Andrzej Bolewski<sup>1</sup>, Robert Plewa<sup>2</sup>, Adam Szczepanik<sup>3</sup>, Henryk Wysocki<sup>3</sup>, Tomasz Siminiak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddział Kardiologii, Szpital Wojewódzki, Akademia Medyczna, Poznań

<sup>2</sup>Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna, Poznań

**Wstęp:** Mutacje występujące w obrębie genu kodującego receptor LDL (LDLr) mogą prowadzić do wad struktury i funkcji receptora, czego wynikiem może być podwyższony poziom cholesterolu. Mutacje te łączone są ze zwiększonym ryzykiem występowania miażdżycy i choroby wieńcowej. Liczne badania wykazały, iż procesy zapalne odgrywają kluczową rolę w patogenezie miażdżycy, a rozpuszczalne formy molekuł adhezyjnych traktowane są jako wskaźniki procesu zapalnego.

**Cel:** Ocena poziomów rozpuszczalnych form molekuł z grupy selektyn typu P, E i L u pacjentów z hipercholesterolemią z lub bez mutacji genu LDLr.

**Materiał i metody:** Grupa badana składała się z 34 kolejnych pacjentów z hipercholesterolemią (średni poziom cholesterolu  $294 \pm 44$  mg%; wiek  $58 \pm 14$ ; 13 kobiet) bez uprzedniego stosowania leczenia statynami. Kryteria wyłączenia: ostra zastoinowa niewydolność serca (NYHA IV), choroby endokrynologiczne i zapalne, choroby wątroby, dotychczasowe leczenie hipolipemizujące.

Ocena obecności mutacji LDLr została wykonana przy pomocy techniki analizy polimorfizmu konformacji pojedynczej nici DNA (SSCP) i bezpośredniego sekwencjonowania. Stwierdziliśmy 8 mutacji. Poziomy rozpuszczalnych (s) form selektyn zostały oznaczone przy pomocy komercyjnych testów ELISA (R&D Systems). Analizy statystyczne wykonano nieparametrycznym testem Mann-Whitney'a, a wartości przedstawiono jako średnią  $\pm$  SEM.

**Wyniki:** W grupie 34 kolejnych pacjentów z hipercholesterolemią stwierdzono 6 mutacji genu receptora LDL. Stężenia sP-selektyny i sE-selektyny były istotnie wyższe w grupie z mutacją niż w grupie bez (odpowiednio:  $87 \pm 12$  vs  $56 \pm 4$  ng/ml,  $p < 0,03$  i  $64 \pm 8$  vs  $35 \pm 3$  ng/ml,  $p < 0,006$ ). Nie stwierdzono różnic w poziomach sL-selektyny.

#### Wnioski:

Obecność mutacji genu receptora LDL może być związana z podwyższonym stężeniem rozpuszczalnych form P-selektyny i E-selektyny. Wzmożona aktywność prozapalna może być odpowiedzialna za zwiększone ryzyko rozwoju i progresji miażdżycy.

18

## Progresja miażdżycy w unikatowym mysim modelu miażdżycy (myszy ApoE/ldlr<sup>-/-</sup>)

Magdalena Franczyk<sup>1</sup>, Jacek Jawień<sup>2</sup>, Mariusz Gajda<sup>3</sup>, Leszek Wojnar<sup>4</sup>, Paweł M. Pisulewski<sup>1</sup>, Stefan Chłopcicki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Żywnienia Człowieka, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza, Kraków

<sup>2</sup>Zakład Farmakologii Doświadczalnej Katedry Farmakologii Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

<sup>3</sup>Katedra Histologii Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

<sup>4</sup>Zakład Komputerowej Analizy Obrazu, Instytut Informatyki Stosowanej, Politechnika Krakowska, Kraków

być wykorzystywany do oceny wpływu czynników żywieniowych i farmakologicznych na progresję i regresję zmian miażdżycowych.

W miejsce klasycznych modeli zwierzęcych miażdżycy, takich jak np. króliki karmione dietą aterosogenną, do badań nad patogenезą i farmakologią miażdżycy coraz częściej stosowane są myszy zmodyfikowane genetycznie, takie jak np. myszy ApoE<sup>-/-</sup>. Ostatnio stworzono nowy, unikatowy model myszy miażdżycy (myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>). Ten szczep myszy pozbawiony jest zarówno apolipoproteiny E, jak i receptora dla LDL. Celem tej pracy była ocena zaawansowania zmian miażdżycowych w aorcie u myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>. Badania przeprowadzono na zwierzętach w wieku 2, 4, 6 i 8 miesięcy, karmionych dietą standardową. Wykonano analizę zmian miażdżycowych metodą wzdłużną *en face* w rozciętej podłużnie całej aorcie oraz metodą poprzeczną *cross-section* w początkowym odcinku aorty wstępującej. Do analizy *en face* aorty w całości, od łuku, poprzez aortę piersiową i brzuszную aż do rozdwojenia biodrowego, były utrwalone w 4% roztworze formaldehydu w PBS, następnie rozcięte wzdłużnie i barwione Sudanem IV. Analizę ilościową *en face* zmian miażdżycowych przeprowadzono metodą automatyczną za pomocą specjalnie opracowanej metody. Do analizy *cross-section* serca zamrożone były w -80°C w żelu OCT, a seryjne skrawki poprzecznie przekrojonego korzenia aorty wybarwiono czerwieńią oleistą (*oil red O*). Do oceny brano pod uwagę 8 skrawków pobranych co 100 µm, rozpoczynając od miejsca, gdzie wszystkie trzy płatki zastawki aortalnej były widoczne pod mikroskopem. Analiza powierzchni zmian miażdżycowych *cross-section* w korzeniu aorty była oceniana metodą półautomatyczną.

Już u 2-miesięcznych myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> stwierdzono zmiany miażdżycowe, których nasilenie zwiększało się wraz z wiekiem myszy. U myszy w wieku 2, 4, 6 i 8 miesięcy powierzchnia zmian miażdżycowych w aorcie ocenianej *en face* wynosiła odpowiednio 0,64±0,10; 6,95±1,30; 15,10±1,30 i 23,72±0,95 (powierzchnia zmian % powierzchni aorty). Analogiczne wartości dla analizy *cross-section* początkowego odcinka aorty wynosiły 13118±7976; 300303±14585; 599548±42586 i 803612±139476 µm<sup>2</sup>.

Stężenie cholesterolu całkowitego dla myszy w wieku 2, 4, 6 i 8 miesięcy wynosiło odpowiednio: 20,86±0,47; 14,77±0,97; 21,33±0,82 i 24,50±1,06 mmol/l, stężenie frakcji LDL odpowiednio: 18,10±1,50; 11,41±1,82; 14,62±1,24 i 14,45±1,86 mmol/l, frakcji HDL odpowiednio: 2,77±0,15; 2,56±0,17; 3,14±0,06 i 3,11±0,46 mmol/l. Stężenie trójglicerydów wynosiło odpowiednio 1,56±0,08; 0,90±0,08; 1,56±0,11 i 1,46±0,04 mmol/l.

Podsumowując, myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> karmione dietą standardową rozwijają hipercholesterolemię i progresywnie rozwijające się zmiany miażdżycowe, których nasilenie jest większe niż u myszy ApoE<sup>-/-</sup>. Analiza zmian miażdżycowych u myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> stwarza szereg trudności metodycznych, które zostaną przedstawione. Pomimo tego, myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> stanowią doskonały zwierzęcy model miażdżycy, który może