



Polish Heart Journal

KARDIOLOGIA POLSKA

Impact Factor: 0,523

Oficjalne czasopismo
Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego

Polish Cardiac Society
the Official Peer Review Journal
since 1957

Indexed in:

ISI Master Journal 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),
Polish Medical Library (GBL)

Listopad 2011, tom 69
November 2011, volume 69

SUPLEMENT III

Sekcja Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego

Prace poglądowe

- Endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne — co to takiego i jak to działa?
- Leczenie reperfuzyjne zawału wspomagane endogennymi mechanizmami kardioprotekcyjnymi
- Trening fizyczny jako skuteczny sposób ochrony serca przed niedokrwieniem
- Hartowanie serca w kardiologii
- Czy każde serce można zahartować? Wpływ wieku i chorób współistniejących
- Rola apelinu w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego i zaburzeniach metabolicznych
- Udział stresu oksydacyjnego w patogenezie nadciśnienia tętniczego — rola metylowanych arginin
- Pochodne 1,4-dihydropirydyny jako „struktury uprzywilejowane” i ich potencjał farmakologiczny
- Złożony profil odruchowej odpowiedzi na nurkowanie

Streszczenia

XVI Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK, Komitetu Nauk Fizjologicznych PAN
i Komitetu Patofizjologii Klinicznej PAN
24–26 listopada 2011 roku, Poznań

KARDIOLOGIA POLSKA

Polish Heart Journal

miesięcznik Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego

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

Indexed in: ISI Master Journal 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 Kulakowski

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

Sylwia 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.viamedica.pl
e-mail: kardiologiapolska@ptkardio.pl

konsultant ds. statystyki/statistical consultant

Marcin Dąda

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)
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
Jarosław Kasprzak
Krzysztof Narkiewicz
Tomasz Pasierski

członkowie rady naukowej/ scientific board members

Grażyna Brzezińska-Rajszyz
Andrzej Budaj
Stefan Chłopicki
Andrzej Cieśliński
Barbara Cybulska
Jarosław Drożdż
Jacek Dubiel
Ryszard Gryglewski
Włodzimierz Januszewicz
Zdzisława Kornacewicz-Jach
Jerzy Korewicki
Maria Krzemińska-Pakuła
Jerzy Kuch
Bogdan Lewartowski
Andrzej Lubiński
Bohdan Maruszewski
Grzegorz Opolski
Lech Poloński
Piotr Ponikowski
Witold Rużyłło
Andrzej Rynkiewicz
Stefan Rywik
Tomasz Siminiak
Janina Stepińska
Andrzej Szczeklik
Marek Sznajderman
Michał Tendera
Adam Torbicki
Wiesława Tracz
Maria Trusz-Gluza
Adam Witkowski
Henryk Wysocki
Tomasz Zdrojewski

wydawca/publisher



„Via Medica sp. z o.o.” sp.k.
ul. Świętokrzyska 73, 80-180 Gdańsk
tel. (58) 320 94 94, faks (58) 320 94 60
www.viamedica.pl, wap.viamedica.pl

redaktor prowadzący/publisher editor

Joanna Niezgoda

Kardiologia Polska (ISSN 0022-9032) jest czasopismem wydawanym 12 razy w roku. Opinie prezentowane w artykułach nie muszą być zgodne z opiniami redakcji.

Ceny prenumerat w 2011 r. (numery 8-12). Odbiorcy z Polski: indywidualni – 44 zł, instytucje – 131 zł. Odbiorcy z zagranicy: indywidualni – 41 euro, instytucje – 126 euro. Istnieje możliwość zamówienia pojedynczego numeru: tel. (58) 320 94 53, e-mail: prenumerata@viamedica.pl.

Wpłaty, z czytelnym adresem, należy przysyłać na konto: VM Media sp. z o.o. VM Group sp.k., Fortis Bank Polska SA Oddz. Gdańsk 24 1600 1303 0004 1007 1035 9150.

Za prenumeratę czasopisma przysługuje 5 punktów edukacyjnych.

Reklamy: Należy kontaktować się z działem reklam wydawnictwa „Via Medica sp. z o.o.” sp.k., ul. Świętokrzyska 73, 80-180 Gdańsk, tel. (58) 320 94 52, e-mail: dsk@viamedica.pl

Za treść reklam redakcja nie ponosi odpowiedzialności. Wszelkie prawa zastrzeżone, włącznie z tłumaczeniem na języki obce. Żaden fragment tego czasopisma zarówno tekstu, jak i grafiki nie może być wykorzystywany w jakiegokolwiek formie. W szczególności zabronione jest dokonywanie reprodukcji oraz przekładanie na język mechaniczny lub elektroniczny, a także utrwalanie w jakiegokolwiek postaci, przechowywanie w jakimkolwiek układzie pamięci oraz transmitowanie w formie elektronicznej, mechanicznej czy za pomocą fotokopii, mikrofilmu, nagrań, skanów bądź w jakiegokolwiek inny sposób, bez wcześniejszej pisemnej zgody wydawcy. Prawa wydawcy podlegają ochronie przez krajowe prawo autorskie oraz konwencje międzynarodowe, a ich naruszenie jest ścigane na drodze karnej.

instrukcja dla autorów/instruction for authors:

www.kardiologiapolska.pl

przysyłanie prac drogą elektroniczną/electronic submission:
kp.esom.viamedica.pl

Nakład 5400 egz.



POZnań*
* Miasto know-how

XVI Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK Komitetu Nauk Fizjologicznych PAN i Komitetu Patofizjologii Klinicznej PAN

24–26 listopada 2011 roku

Poznań

Patronat Honorowy

**Rektor Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
prof. dr hab. n. med. Jacek Wsocki**

Komitet Naukowy

Zarząd Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK

Przewodniczący:

prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska
dr hab. n. med. Marek A. Deja

Członkowie:

prof. dr hab. n. med. Zbigniew Baj
prof. dr hab. n. med. Andrzej Beręsewicz
prof. dr hab. n. med. Stefan Chłopicki
prof. dr hab. n. med. Krzysztof Gołba
prof. dr hab. n. med. Tadeusz F. Krzemiński
dr hab. n. med. Urszula Mackiewicz
dr hab. n. med. Michał Mączewski
dr n. med. Tomasz Roleder
dr hab. n. med. Tomasz Wierzba

Komitet Patofizjologii Klinicznej PAN

Przewodniczący:

prof. dr hab. n. med. Henryk Skarżyński
prof. dr hab. n. med. Waldemar Banasiak

Komitet Nauk Fizjologicznych PAN

Przewodniczący:

prof. dr hab. n. med. Ewa Szczepańska-Sadowska
prof. dr hab. n. med. Bohdan Lewartowski

Zakład Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych

Instytut Genetyki Człowieka PAN

prof. dr hab. n. med. Maciej Kurpisz
dr n. biol. Natalia Rozwadowska

I Klinika Kardiologii

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

dr hab. n. med. Ewa Straburzyńska-Migaj

Katedra Analizy Matematycznej i Numerycznej Politechnika Gdańska

dr n. ekonom. Krystyna Ambroch

Komitet Organizacyjny

Zakład Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych

Instytut Genetyki Człowieka PAN

ul. Strzeszyńska 32, 60–479 Poznań
tel: +48 61 657 92 02
e-mail: kurpimac@man.poznan.pl

Przewodniczący:

prof. dr hab. n. med. Maciej Kurpisz

Redakcja Suplementu:

prof. dr hab. n. farm. Ewa Chabielska
dr n. med. Agnieszka Zakrzaska

Członkowie:

dr n. biol. Natalia Rozwadowska
mgr Agnieszka Waclawska
mgr Tomasz Kolanowski
mgr Magdalena Boksa
mgr Anna Jarmuszewska

Słowo od Zarządu Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK

W porozumieniu z Redakcją *Kardiologii Polskiej* wprowadzono zasadę recenzowania prac poglądowych publikowanych w Suplemencie do *Kardiologii Polskiej* towarzyszącym Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Prace są recenzowane przez co najmniej 2 członków Rady Naukowej Suplementu.

Rada Naukowa Suplementu

Jędrzej Antosiewicz

Zbigniew Baj

Andrzej Beręsewicz

Włodzimierz Buczek

Ewa Chabielska

Stefan Chłopicki

Marek Deja

Aldona Dembińska-Kieć

Sławomir Dobrzycki

Krzysztof J. Filipiak

Krzysztof Gołba

Jan Górski

Tomasz Hirnle

Jacek Jawień

Leszek Kalinowski

Karol Kamiński

Jarosław D. Kasprzak

Ivan Kocic

Hanna Kozłowska

Tadeusz F. Krzemiński

Maciej Kurpisz

Bohdan Lewartowski

Urszula Mackiewicz

Barbara Malinowska

Artur Mamcarz

Michał Mączewski

Katarzyna Mizia-Stec

Andrzej Mogielnicki

Krzyszyna Pawlak

Grzegorz Raczak

Tomasz Siminiak

Ryszard T. Smoleński

Piotr Thor

Anetta Undas

Tomasz Wierzba

Wojciech Wojakowski

Spis treści/Contents

Prace poglądowe/Review articles

Mini-Symposium: „Serce samo potrafi się bronić przed niedokrwieniem — endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne”

Andrzej Beręsewicz

Endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne — co to takiego i jak to działa?

Endogenous cardioprotective mechanisms — what is it about and how does it work? S 59

Jarosław Zalewski, Jadwiga Nessler

Leczenie reperfuzyjne zawału wspomagane endogennymi mechanizmami kardioprotekcyjnymi

The endogenous cardioprotection during reperfusion in acute myocardial infarction S 67

Iwona Korzeniowska-Kubacka

Trening fizyczny jako skuteczny sposób ochrony serca przed niedokrwieniem

Physical training as an effective way to protect the heart against ischaemia S 75

Marek A. Deja, Marcin Malinowski

Hartowanie serca w kardiochirurgii

Conditioning the heart in cardiac surgery S 80

Maria Bilińska

Czy każde serce można zahartować? Wpływ wieku i chorób współistniejących

Can any heart be preconditioned? Influence of aging and comorbidities on cardioprotection. S 85

Varia

Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska, Katarzyna Czarzasta, Ryszard Gomółka, Ewa Szczepańska-Sadowska

Rola apelinu w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego i zaburzeniach metabolicznych

The role of apelin in pathogenesis of cardiovascular diseases and metabolic disorders S 89

Łukasz Klima, Katarzyna Stolarz-Skrzypek, Rafał Olszanecki, Kalina Kawecka-Jaszcz

Udział stresu oksydacyjnego w patogenezie nadciśnienia tętniczego — rola metylowanych arginin

The oxidative stress in pathogenesis of arterial hypertension — role of methylated arginines S 94

Michał Żorniak, Katarzyna Mitreęga, Tadeusz F. Krzemiński

Pochodne 1,4-dihydropirydiny jako „struktury uprzywilejowane” i ich potencjał farmakologiczny

Derivatives of 1,4-dihydropyridines as “privileged structures” and their pharmacological potential S 100

Tomasz H. Wierzba, Arkadiusz Ropiak

Złożony profil odruchowej odpowiedzi na nurkowanie

Complex profile of the reflex diving response S 104

Streszczenia/Abstracts S 115

Indeks autorów streszczeń/Index of abstract authors S 142

Endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne — co to takiego i jak to działa?

Endogenous cardioprotective mechanisms — what is it about and how does it work?

Andrzej Beręsewicz

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie

Reperfuja stanowi obecnie podstawową metodę leczenia zawału serca. Zabieg ten jest jedynym znanym sposobem ratowania niedokrwionego miokardium, ale równocześnie powoduje jego reperfuzyjne uszkodzenie, ograniczające korzystne efekty reperfuzji. Kardioprotekcja farmakologiczna skutecznie zmniejsza niepożądane efekty reperfuzji w modelach eksperymentalnych, ale nie ma dowodów na jej kliniczną skuteczność. Dlatego wielkie nadzieje wiąże się z możliwością klinicznego wykorzystania endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych, znanych jako *ischaemic preconditioning* i *ischaemic postconditioning*, odpowiednio hartowanie niedokrwieniem i hartowanie reperfużą. Coraz lepiej udokumentowana jest hipoteza, że hartowanie działa kardioprotekcyjnie, dlatego że zapobiega aktywacji przez reperfużę megakanala mitochondrialnego, który jest integratorem i ostatecznym mediatorem różnych mechanizmów reperfuzyjnego uszkodzenia.

Słowa kluczowe: reperfuzyjne uszkodzenie serca, kardioprotekcja, hartowanie niedokrwieniem, hartowanie reperfużą, megakanal mitochondrialny

Abstract

Reperfusion therapy is the primary treatment for acute myocardial infarction. Its infarct-limiting effectiveness is, however, limited by so called reperfusion-induced myocardial injury likely related to reperfusion-mediated opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). While pharmacologic cardioprotection has proved to effectively reduce infarct size in the experimental models its clinical usefulness is problematic. In this context, a clinical exploitation of endogenous cardioprotective mechanisms, known as *ischaemic preconditioning* and *ischaemic postconditioning*, emerges as an attractive therapeutic alternative. This is particularly so because *ischaemic pre- and post-conditioning* seem to afford cardioprotection by preventing reperfusion-induced deleterious opening of mPTP.

Key words: myocardial reperfusion injury, cardioprotection, *ischaemic preconditioning*, *ischaemic postconditioning*, mitochondrial permeability transition pore

Kardiol Pol 2011; 69, supl. III: 59–66

USZKODZENIE SERCA SPOWODOWANE NIEDOKRWIENIEM I REPERFUŻĄ

Źródłem energii zasilającej pracę mechaniczną pompy sercowej są w > 95% tlenowe przemiany glukozy i kwasów tłuszczowych zachodzące w mitochondriach. Dlatego produkcja ATP, a następnie czynność skurczowa miokardium w sposób krytyczny zależą od równowagi między aktualnym przepływem wieńcowym i zapotrzebowaniem na przepływ. W pa-

tologii ludzkiej występują liczne stany (tab. 1), w których zachodzi nierówność:

Przepływ wieńcowy < Zapotrzebowanie na przepływ

Wszystkie one są definiowane jako niedokrwienie miokardium, gdyż towarzyszy im uwalnianie z serca kwasu mlekowego (produkt glikolizy beztlenowej) oraz adenozyiny (pro-

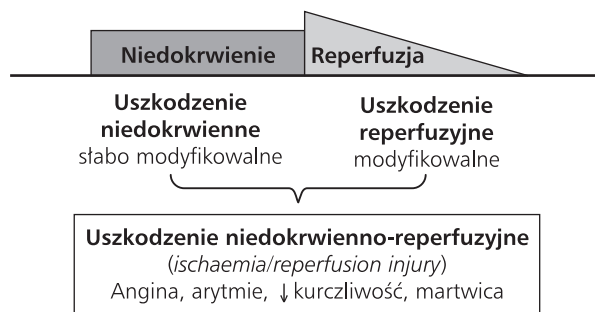
Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Andrzej Beręsewicz, Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01–813 Warszawa, tel: +48 22 569 38 40, faks: +48 22 569 38 49, e-mail: aberesew@cmkp.edu.pl

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

Tabela 1. Kliniczne postaci niedokrwienia

Niedokrwienia spoczynkowe	Niedokrwienia wysiłkowe
Zawał serca	Angina wysiłkowa
Spazm naczyniowy	Próba wysiłkowa
Niedokrwienia okołoproceduralne	
— plastyka wieńcowa	
— krążenie pozaustrojowe	
— transplantacja serca	



Rycina 1. Konceptja niedokrwienno-reperfuzyjnego uszkodzenia serca. Niedokrwienie i oddzielnie reperfuza są źródłem uszkodzenia. W warunkach klinicznych efekty te sumują się. Długość niedokrwienia jest główną modyfikowalną determinantą niedokrwienno-reperfuzyjnego uszkodzenia (i wtórnie uszkodzenia reperfuzyjnego). Kardioprotekcja, jeżeli w ogóle działa, skutkuje redukcją jedynie reperfuzyjnego uszkodzenia

dukt katabolizmu ATP). Jeżeli deficyt przepływu trwa odpowiednio długo, niedokrwienie skutkuje różnymi postaciami uszkodzenia mięśnia sercowego.

Kliniczne postaci niedokrwienia (tab. 1) kończą się najczęściej spontaniczną bądź indukowaną reperfuzyją, skutkującą przynajmniej częściowym powrotem równowagi między przepływem wieńcowym i zapotrzebowaniem na przepływ. Reperfuza stanowi jedyny znany sposób ratowania niedokrwionych komórek, ale jest równocześnie czynnikiem uszkadzającym i ostateczny wynik reperfuzyji jest sumą jej korzystnych efektów i efektów tzw. reperfuzyjnego uszkodzenia serca.

Uszkodzenia niedokrwienne i reperfuzyjne „w czystej postaci” dają się badać tylko w warunkach eksperymentu zwierzęcego. Natomiast w warunkach klinicznych z reguły spotyka się mieszanię efektów samego niedokrwienia i reperfuzyji. Dlatego w kontekście klinicznym mówimy o uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym (*ischaemia/reperfusion injury*) (ryc. 1).

Nasilenie niedokrwienno-reperfuzyjnego uszkodzenia jest wypadkową stopnia ograniczenia perfuzji wieńcowej oraz czasu trwania tego ograniczenia:

$$\text{Efekt niedokrwienia} = \% \text{ ograniczenia perfuzji wieńcowej} \times \text{czas niedokrwienia}$$

Dodatkowa komplikacja polega na tym, że uszkodzenie reperfuzyjne jest tym większe, im większe jest poprzedzające uszkodzenie niedokrwienne. Oznacza to, że obie postaci uszkodzenia zależą ostatecznie od czasu trwania i wielkości niedokrwienia.

W obrazie kliniczno-patofizjologicznym niedokrwienia dominują: ból wieńcowy, zaburzenia kurczliwości miokardium, zaburzenia rytmu, utrata równowagi energetycznej miokardium skutkująca rozkładem ATP, m.in. do AMP i adenozy, które stają się substancjami sygnałowymi. Adenozy wywołuje ból wieńcowy i powoduje rozszerzenie naczyń. Adenozynomonofosforan, poprzez kinazę AMP, przekierowuje metabolizm energetyczny komórek na produkcję ATP z glukozy. Od pewnego etapu niedokrwienia, miokardium ulega martwicy, która powoli postępuje od wsierdza do nasierdza. Niedokrwienie skutkuje dodatkowo zaburzeniami, które są substratem dla patologicznych procesów uruchamianych w miokardium dopiero w reperfuzyji. Najważniejsze z nich to: (i) niskie komórkowe poziomy ADP i AMP i wysokie fosforu nieorganicznego; (ii) zmiany w mitochondriach przygotowujące je do zwiększonej reperfuzyjnej produkcji anionorodnika nadciśnieniowego (O_2^-) i innych reaktywnych form tlenu (ROS) oraz (iii) kwasica komórkowa skutkująca komórkową akumulacją Ca^{2+} . Kulminacją tych procesów jest reperfuzyjna aktywacja megakanalu mitochondrialnego (mPTP, *mitochondrial permeability transition pore*), ostatecznie skutkująca reperfuzyjną śmiercią komórek.

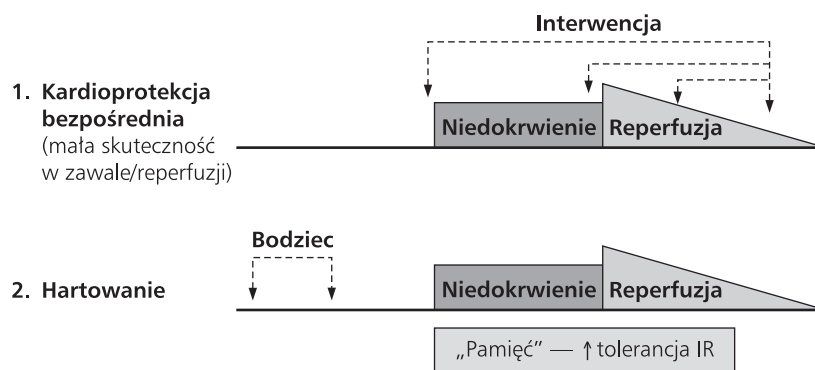
Na efekty reperfuzyji składają się:

- częściowa odbudowa czynności skurczowej miokardium i/lub ochrona kardiomiocytów przed śmiercią w wyniku niedokrwienia. Jest to działanie korzystne i reperfuza stanowi jedyny znany sposób ratowania niedokrwionych komórek;
- reperfuzyjne uszkodzenie miokardium — jego istnienia dowodzi fakt, że różne interwencje zastosowane tuż przed reperfuzyją zmniejszają rozległość zawału serca (MI) u zwierząt i ludzi. Wyróżnia się 4 typy zaburzeń reperfuzyjnych: (i) ogłuszenie mięśnia sercowego; (ii) reperfuzyjne zaburzenia rytmu; (iii) śmierć komórek w wyniku nekrozy i apoptozy oraz (iv) uszkodzenie śródbłonna, którego konsekwencjami są: akumulacja granulocytów w reperfundowanym obszarze i toksyczność z tym związana oraz *no-reflow phenomenon* — stan, w którym podczas reperfuzyji doszło do embolizacji mikrokrążenia, co ogranicza powrót perfuzji miokardium i korzyści reperfuzyji.

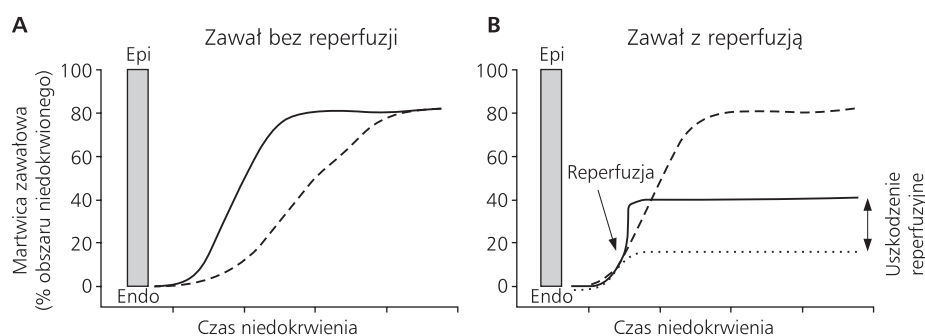
KARDIOPROTEKCJA NIEDOKRWIONEGO/REPERFUNDOWANEGO MIOKARDIUM

Wyróżnia się (ryc. 2):

- kardioprotekcję bezpośrednią, w której substancje o spodziewanym działaniu protekcyjnym są podawane przed,



Rycina 2. Schemat dwóch typów kardioprotekcji niedokrwionego/reperfundowanego miokardium (szczegóły w tekście)



Rycina 3. Schemat pokazujący hipotetyczną dynamikę postępu martwicy zawałowej od wsierdzia (Endo) do nasierdzia (Epi) oraz wpływ kardioprotekcji i reperfuzji na tę dynamikę i ostateczną wielkość martwicy; **A.** Kontrolny zawał (linia ciągła) i kardioprotekcja (linia przerywana). Kardioprotekcja zwalnia proces umierania miokardium, ale nie zmniejsza ostatecznej wielkości martwicy; **B.** Zawał bez reperfuzji (linia przerywana), reperfuzja (linia ciągła) i reperfuzja z kardioprotekcją (linia kropkowana). Zwraca uwagę fakt, że reperfuzja zmniejsza wielkość zawału o ok. 50% i że kardioprotekcja dodana do reperfuzji zmniejsza wielkość zawału o kolejne ok. 50%. Martwica zawałowa ratowana przez kardioprotekcję dodaną do reperfuzji jest miarą reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium

w trakcie lub po niedokrwieniu, z założeniem, że ich korzystne działanie dotyczy jedynie okresu, w którym mają one kontakt z miokardium;

- kardioprotekcję w mechanizmie „hartowania” miokardium — wykorzystuje się tu endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne polegające na tym, że pod wpływem pewnych bodźców (np. krótkotrwałe nieuszkodzające niedokrwienie) w miokardium pozostaje „pamięć” w postaci przedłużającego się w czasie okresu zwiększonej tolerancji miokardium na niedokrwienie/reperfuzję. Jeżeli kolejny incydent niedokrwienia/reperfuzji trafi na okres zwiększonej tolerancji, spowodowane nim uszkodzenie będzie mniejsze.

Intensywne poszukiwania sposobów ograniczania konsekwencji niedokrwienia/reperfuzji zaczęły się w 1974 r., kiedy to Braunwald i Maroko [1], na podstawie obserwacji, że rokowanie pacjentów z MI pogarsza się wraz z ilością utraconego miokardium, stworzyli hipotezę, że sposobem na poprawę rokowania mogłoby być leczenie nastawione na ograniczanie rozmiaru martwicy zawałowej. Mniej więcej w tym

samym czasie wykazano, że rozwój martwicy zawałowej jest procesem rozciągniętym w czasie (zaczyna się w warstwie podwsierdziowej i powoli postępuje w kierunku nasierdzia) (*wave-front phenomenon*) [2, 3] (ryc. 3), co pokazało, że istnieje dość długi przedział czasowy, w którym proponowane przez Braunwalda i Maroko [1] leczenie kardioprotekcyjne mogłoby być skuteczne. W kolejnych latach przebadano tysiące interwencji o potencjalnym działaniu kardioprotekcyjnym, głównie w zwierzęcych modelach MI. W 1980 r. ukazała się publikacja DeWooda i wsp. [4] dowodząca, że przyczyną MI jest niedrożność tętnicy wieńcowej spowodowana skrzepliną. W efekcie rozpoczął się okres trombolitycznego leczenia MI oraz fascynacji reperfuzją i jej konsekwencjami.

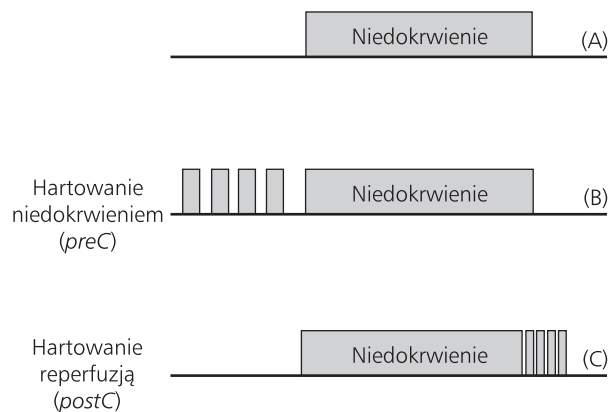
Badania dotyczące kardioprotekcji można podsumować w następujących punktach:

1. W modelach eksperymentalnych interwencje farmakologiczne lub metaboliczne o działaniu kardioprotekcyjnym jedynie zwalniają proces rozwoju martwicy zawałowej i nie wpływają na jej ostateczną wielkość (ryc. 3). Podobnie, nie ma dowodów na to, by któraś z tych in-

- terwencji działała korzystnie u pacjentów z MI bez reperfuzyj (badania sprzed ery trombolitycznego leczenia MI);
2. Reperfuzyja, wykonana odpowiednio wcześnie jest jedyną znaną interwencją ratującą niedokrwione komórki przed śmiercią, więc zgodnie z definicją jest interwencją o działaniu kardioprotekcyjnym. Zgodnie z hipotezą Braunwalda i Maroko [1], reperfuzyja, jeżeli skutkuje redukcją rozległości MI, poprawia rokowanie pacjentów z MI;
 3. Ostateczny wynik reperfuzyj stanowi sumę jej korzystnych i niekorzystnych efektów. Innymi słowy, spodziewany korzystny efekt reperfuzyj jest zwykle pomniejszany o skutki reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium (ryc. 3);
 4. W modelach zwierzęcych wykazano, że różne interwencje kardioprotekcyjne nacelowane wybiórczo na reperfuzyjne uszkodzenie (interwencje przeciwzapalne, antyrodnikowe, zapobiegające komórkowej akumulacji Ca^{2+} , hartowanie i inne), zmniejszają martwicę w niedokrwionym/reperfundowanym sercu nawet o 30–50% (ryc. 3) (przegląd literatury wg [5]);
 5. Badania kliniczne testujące możliwości farmakologicznego ograniczania reperfuzyjnego uszkodzenia serca w kontekście ostrych zespołów wieńcowych (OZW) zakończyły się spektakularnym niepowodzeniem, którego powody nie są jeszcze znane [5–7]. W efekcie w Stanach Zjednoczonych i Europie nie zarejestrowano dotąd żadnego leku przeznaczonego do ograniczania rozległości MI u pacjentów z OZW;
 6. Pozytywnymi przykładami skuteczności kardioprotekcji w warunkach klinicznych są jedynie kardioplegia w kardiochirurgii i ewentualnie skuteczność leków „wieńcowych” w leczeniu stabilnej choroby wieńcowej. Prawdopodobnie wynika to z tego, że kardioprotekcja farmakologiczna jest skuteczna u ludzi jedynie w postaciach łagodnego i/lub krótkotrwałego niedokrwienia;
 7. Ograniczanie reperfuzyjnego uszkodzenia serca pozostaje ciągle ważnym, choć niezrealizowanym celem terapeutycznym. Ostrożne nadzieje w tym względzie budzą wstępne doniesienia o klinicznej skuteczności endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych, w tym hartowania.

HARTOWANIE SERCA

Hartowanie jest formą kardioprotekcji z wykorzystaniem endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych (ryc. 2). W 1986 r. Murry i wsp. [8] wykonali sławny eksperyment, w którym grupie kontrolnej psów podwiązywali na 40 min tętnicę wieńcową, a w grupie badanej 40-minutowe niedokrwienie poprzedzali czterema 5-minutowymi epizodami niedokrwienia rozdzielonymi 5-minutowymi okresami reperfuzyj (ryc. 4A, B). Okazało się, że krótkie poprzedzające niedokrwienia/reperfuzyje skutkują drastyczną redukcją martwicy zawałowej (z 30% obszaru niedokrwionego w grupie kontrolnej do 7% w grupie badanej), mimo że niedokrwienie w grupie badanej trwało 50% dłużej. Autorzy nazwali to zjawisko



Rycina 4. Schemat klasycznego protokołu hartowania: (B) niedokrwieniem (*ischaemic preconditioning*) oraz (C) reperfuzyją (*ischaemic postconditioning*). Szczegóły w tekście

ischaemic preconditioning (*conditioning* — indukowanie oduruchu warunkowego). W polskiej literaturze funkcjonuje termin hartowanie (serca) niedokrwieniem (HN).

W 2003 r., w podobnym eksperymencie na psach, Zhao i wsp. [9] wykazali, że analogiczne działanie ograniczające rozległość MI jak HN ma także HR — hartowanie reperfuzyją (*ischaemic postconditioning*), tj. zabieg, w którym miokardium poddaje się działaniu krótkich incydentów niedokrwienia i reperfuzyj (w tym wypadku trzy 30-sekundowe niedokrwienia następujące w 30-sekundowych odstępach) na początku reperfuzyj, a nie przed niedokrwieniem (ryc. 4C).

Wykazano ponadto, że krótkie hartujące zamknięcie tętnicy pozasercowej (ramiennej, udowej etc.) skutkuje zwiększoną odpornością miokardium na uszkodzenie niedokrwienne/reperfuzyjne. Zjawisko to znane jest jako hartowanie na odległość (*remote preconditioning, preconditioning at a distance*).

W modelach eksperymentalnych wykazano, że trening fizyczny odnosi efekty sercowe analogiczne do HN (*exercise preconditioning, hartowanie wysiłkiem fizycznym*) [10].

W przypadku HN i HR wiadomo, że zabiegi te redukują martwicę w niedokrwionym/reperfundowanym miokardium poprzez zapobieganie reperfuzyjnej aktywacji mPTP i reperfuzyjnej komponentie uszkodzenia [11].

Najlepiej scharakteryzowano HN, o którym wiemy, że [12–14]:

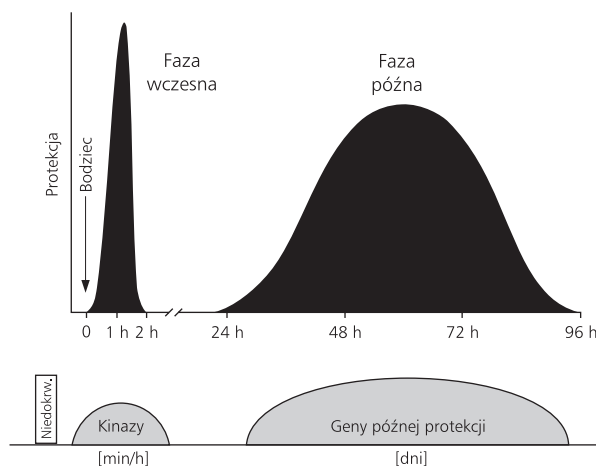
- jest endogennym i do tego niezwykle silnym mechanizmem cytoprotekcyjnym;
- występuje u wszystkich badanych dotąd ssaków, w tym u człowieka;
- dotyczy, obok miokardium, także innych narządów (mózg, nerka, żołądek, oko, wątroba);
- obok 4 epizodów niedokrwienia/reperfuzyj (patrz eksperyment Murry i wsp. [8]), wywołują je także inne bodźce wytrącające miokardium z równowagi energetycznej, w tym:

- pojedynczy epizod całkowitego niedokrwienia trwający 1,5–2,5 min,
 - 15-minutowa częściowa okluzja tętnicy wieńcowej,
 - krótkie okresy szybkiej stymulacji serca niewywołującej niedokrwienia,
 - krótkie okresy niedotlenienia,
 - krótkie epizody przeciążenia objętościowego komory,
 - 15-minutowy pobyt w środowisku o temperaturze 42°C (*heat shock*);
- redukcja martwicy zawałowej nie jest jedynym korzystnym efektem HN. Inne to [13]:
- wolniejszy spadek poziomu ATP i fosfokreatyny w niedokrwionym miokardium,
 - mniej zaburzeń rytmu w czasie niedokrwienia i reperfuzji,
 - szybsza i bardziej kompletna odbudowa skurczu mięśnia po reperfuzji,
 - redukcja apoptozy,
 - mniejsze reperfuzyjne uszkodzenie śródbłonka naczyń wieńcowych, w tym mniejsze uszkodzenie glikokaliksu śródbłonkowego, mniejsza ekspresja śródbłonkowych cząstek adhezyjnych oraz mniejsza adhezja granulocytów w reperfundowanym miokardium [15, 16],
 - mniejsze wykrzepianie w naczyniach wieńcowych zależne od płytek krwi;
- kardioprotekcja związana z HN ma przebieg dwufazowy (ryc. 5).

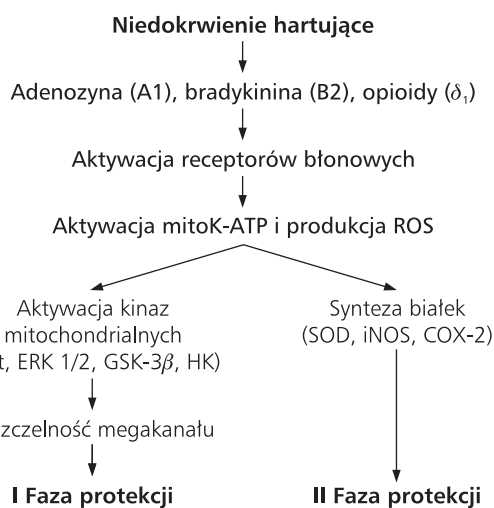
MOLEKULARNY MECHANIZM HARTOWANIA

Od dawna podejmuje się próby zastąpienia inwazyjnej i skomplikowanej technologicznie procedury HN hartowaniem farmakologicznym (zastąpienie hartowania lekiem). Skuteczność tych usiłowań jest ograniczona przez brak powszechnie akceptowanej hipotezy na temat molekularnego mechanizmu HN. Trudność wynika z tego, że w mechanizm HN jest zaangażowanych kilka równoległych ścieżek sygnalizacyjnych, że gatunki różnią się ich udziałem w mechanizmie kardioprotekcji i że niewiele wiadomo na temat ich udziału w mechanizmie hartowania u człowieka. Zgodnie z aktualną hipotezą, na komórkowy mechanizm HN składają się następujące elementy (ryc. 6):

- w wyniku hartującego niedokrwienia z miokardium uwalniają się substancje czynne wyzwalające proces hartowania, w tym adenozyina (działająca przez receptory A_1 i A_3), opioidy (receptor δ), bradykinina (receptory B_2) oraz noradrenalina (głównie w sercu szczura, receptory α) [17];
- substancje te, działając na odpowiednie receptory błonowe, inicjują wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnalizacyjne prowadzące do aktywacji kanału potasowego regulowanego stężeniem ATP zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (mitochondrialny kanał potasowy ATP-zależny, mitoK-ATP), która to aktywacja skutkuje niewielką mitochondrialną produkcją O_2^- i innych ROS [17, 18]. Substancjami aktywującymi mitoK-ATP



Rycina 5. Dwie fazy zwiększonej odporności miokardium na uszkodzające działanie niedokrwienia i reperfuzji spowodowane hartowaniem. Faza wczesna rozpoczyna się prawie natychmiast po bodźcu hartującym, trwa 1–2 h i jest spowodowana aktywacją tzw. kinaz białkowych wczesnej protekcji. Faza późna rozpoczyna się 24 h po bodźcu, trwa 3 doby i jest spowodowana aktywacją „genów późnej protekcji”



Rycina 6. Uproszczony schemat ścieżek sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za wczesną i późną fazę hartowania niedokrwieniem. Szczegóły w tekście

i naśladującymi działanie HN są diazoksyd i pinacydyl. Glibenklamid i inne pochodne sulfonilomocznika blokują mitoK-ATP i efekty HN [17, 18];

- mitochondrialne ROS aktywują ścieżki sygnalizacyjne, których efektorami są:
- kaskada mitochondrialnych kinaz efektorowych [kinazy wczesnej protekcji — RISK (*reperfusion injury salvage kinases*). Aktywacja RISK skutkuje „uszczelnieniem” mPTP w reperfuzji (kinazy zapobiegają reperfuzyjnej aktywacji mPTP), co stanowi ważny argument na rzecz

hipotezy o jego centralnej roli w mechanizmie reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium. Ważnymi elementami kompleksu kinaz RISK są: kinaza Akt, kinaza Erk 1/2, kinaza 3β syntazy glikogenu (GSK- 3β) oraz enzym glikolityczny heksokinaza (HK). Końcowymi efektorami kaskady są najpewniej HK i GSK- 3β i ten ostatni enzym prawdopodobnie fosforyzuje niezidentyfikowany dotąd komponent mPTP, co skutkuje zmniejszoną wrażliwością mPTP na czynniki aktywujące [19, 20]. Aktywacja RISK może się okazać atrakcyjnym celem działania interwencji kardioprotekcyjnych. Wskazuje na to fakt, że do aktywacji RISK dochodzi (przynajmniej w modelach eksperymentalnych) w wyniku działania takich interwencji kardioprotekcyjnych, jak HN, HR oraz podawanie razem z reperfuzją insuliny, erytropoetyny, peptydów natriuretycznych czy statyn [17].

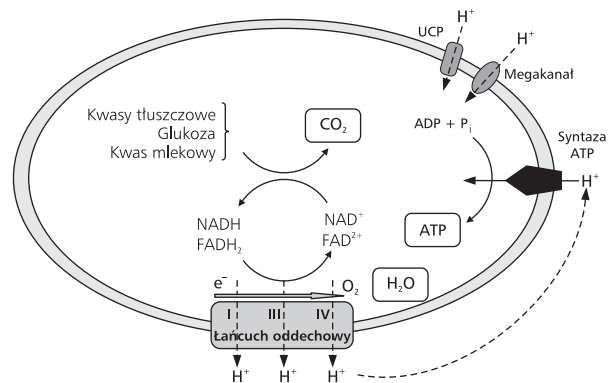
- geny licznych białek, w tym indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS) i mitochondrialnej izoformy dymutazy ponadtlenkowej (MnSOD), co prawdopodobnie jest ważnym elementem mechanizmu późnej fazy kardioprotekcji [21].

MITOCHONDRIALNY MEGAKANAL INTEGRATOREM MECHANIZMÓW REPERFUZYJNEGO USZKODZENIA I MIEJSCEM DZIAŁANIA RÓŻNYCH FORM HARTOWANIA

Mitochondria stanowią ok. 30% objętości kardiomiocytów, produkują w procesie fosforylacji oksydacyjnej > 95% ATP dostępnego w kardiomiocytach, ale równocześnie mogą stanowić przyczynę uszkodzenia, w tym związanego z reperfuzją.

Fosforylacja oksydacyjna jest procesem, w którym enzymy oksydoredukcyjne, związane z wewnętrzną błoną mitochondrialną i tworzące tzw. łańcuch oddechowy (składający się z kompleksów mitochondrialnych I, II, III i IV) (ryc. 7):

- transportują elektrony z NADH i $FADH_2$ poprzez kolejne kompleksy mitochondrialne I–IV i w kompleksie IV (oksydaza cytochromowa) dochodzi do tzw. 4-elektronowej redukcji O_2 i powstania wody, a wyzwolona energia służy do syntezy ATP (niewielka część elektronów „wycieka” z łańcucha oddechowego na poziomie kompleksów I, II i III i reagując z O_2 , skutkuje produkcją toksycznego anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-). Produkcja O_2^- znacząco rośnie w reperfundowanych mitochondriach/komórkach) [22];
- przenoszą H^+ z NADH/ $FADH_2$ obecnych w macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej, co sprawia, że wewnątrz mitochondriów ma potencjał ujemny w stosunku do potencjału na zewnątrz mitochondriów (w cytoplazmie komórek), że stężenie H^+ w macierzy jest mniejsze niż w przestrzeni międzybłonowej i że wobec tego istnieje gradient elektrochemiczny H^+ ($\Delta\Psi_m$) faworyzujący ich przechodzenie z powrotem do macierzy mitochondrialnej [22];



Rycina 7. Schemat tlenowych przemian substratów energetycznych i fosforylacji oksydacyjnej. Produktem spalania kwasów tłuszczowych, glukozy i kwasu mlekowego są zredukowane kofaktory NADH i $FADH_2$. Łańcuch oddechowy związany z wewnętrzną błoną mitochondrialną przenosi z NADH i $FADH_2$: (i) elektrony na O_2 (przez kompleksy I–IV) oraz (ii) protony do przestrzeni międzybłonowej (kompleksy I, III i IV), co buduje gradient elektrochemiczny H^+ w poprzek wewnętrznego błony ($\Delta\Psi_m$). H^+ wracają do macierzy przy udziale kompleksu syntazy ATP zgodnie z $\Delta\Psi_m$, czemu towarzyszy fosforylacja ADP do ATP. Aktywacja mitochondrialnych białek rozprzęgających (UCP) i/lub megakanalu rozładowuje $\Delta\Psi_m$, co skutkuje konsumpcją O_2 bez produkcji ATP, czyli stanem rozprzęgania fosforylacji oksydacyjnej

- transportuje H^+ , zgodnie z $\Delta\Psi_m$ i przy udziale syntazy ATP z przestrzeni międzybłonowej z powrotem do macierzy, czemu towarzyszy fosforylacja ADP do ATP (elektrochemiczny gradient H^+ jest źródłem energii dla syntezy ATP) [22].

Istnieje ścisłe sprzężenie transportu elektronów z NADH/ $FADH_2$ na O_2 w łańcuchu oddechowym, transportu H^+ do przestrzeni międzybłonowej oraz procesu fosforylacji ADP do ATP. Dlatego o wielkości mitochondrialnej produkcji ATP decydują: (i) wielkość $\Delta\Psi_m$, który jest pochodną dostępności NADH/ $FADH_2$ oraz O_2 , a także (ii) poziomy ADP i fosforu nieorganicznego (P_i) w macierzy mitochondrialnej, które zależą od wielkości zużycia ATP w aparacie kurczliwym. Produkcja ATP zwalnia, kiedy maleje dostępność zredukowanych kofaktorów, O_2 i/lub ADP i P_i [22].

Na wielkość $\Delta\Psi_m$ wpływają różne białka wewnętrznej błony mitochondrialnej tworzące w niej kanały jonowe lub pory. W tym kontekście szczególne zainteresowanie budzą megakanal mitochondrialny (mPTP) i białka rozprzęgające (UCPs, *uncoupling proteins*). Tworzone przez nie kanały/pory umożliwiają napływ H^+ do macierzy, co skutkuje zmniejszeniem $\Delta\Psi_m$ i produkcji ATP, mimo że mitochondria ciągle konsumują O_2 . Jest to stan określany jako rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej, któremu na poziomie całego serca towarzyszy spadek efektywności mechanicznej mięśnia sercowego (normalna konsumpcja O_2 i mniejsza produkcja ATP).

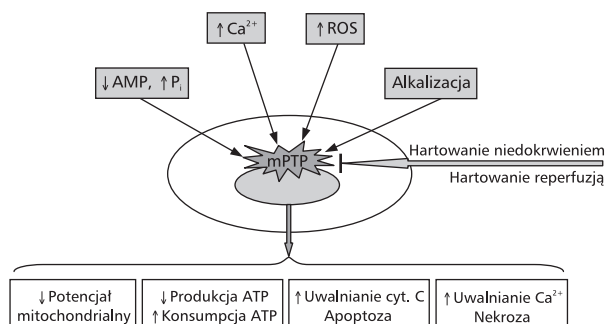
Dodatkowo, przy braku $\Delta\Psi_m$ lub kiedy jest on niewielki, reakcja katalizowana przez syntazę ATP odwraca się i enzym zamiast produkować ATP, rozkłada go do ADP i P_i [22]. W niedokrwionym miokardium wykazano, że syntaza ATP pracująca w odwróconym trybie konsumuje ATP powstający poza mitochondriami w procesie glikolizy [23].

Aktywacja mPTP następuje głównie pod wpływem zwiększonych stężeń jonów Ca^{2+} . W wewnętrznej błonie mitochondrialnej powstaje wtedy nieselektywny por (kanał), przez który mogą przechodzić do i z mitochondrium substancje o ciężarze do 1,5 kDa, w tym jony H^+ , Ca^{2+} , cytochrom c i inne. Skład białkowy mPTP i jego rola fizjologiczna są ciągle przedmiotem kontrowersji. Dość pewne są natomiast następujące fakty [20, 24, 25]:

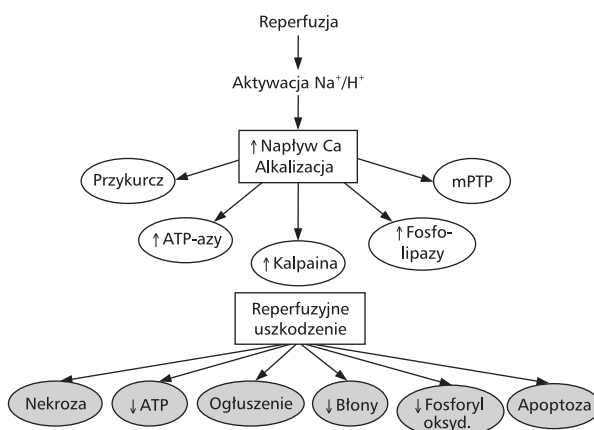
- regulatorem mPTP jest białko cyklofilina-D, związane z wewnętrzną błoną mitochondrialną [11, 24, 26];
- jony Ca^{2+} , wiążąc się z cyklofiliną-D, aktywują mPTP [11, 24, 26];
- lek cyklosporyna-A, który wiąże się z cyklofiliną-D, przeciwdziała aktywacji mPTP przez Ca^{2+} i inne czynniki [11, 24, 26];
- nieodwracalna aktywacja mPTP jest prawdopodobną końcową przyczyną reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium. Z badań eksperymentalnych wiadomo, że do takiej aktywacji dochodzi w pierwszych minutach reperfuzji (izolowane serce szczura) [20] i że jest katastrofalna w skutkach dla dotkniętego nią mitochondrium, a następnie całej komórki, gdyż powoduje [11, 24–26] (ryc. 8):
 - rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej i utratę komórkowych zasobów ATP (produkcja ATP maleje, a mitochondria stają się konsumentem ATP powstałego w innych nieuszkodzonych mitochondriach i/lub w procesie glikolizy),
 - obrzęk mitochondriów, pęknięcie ich zewnętrznej błony i przedostawanie się z przestrzeni międzybłonowej do cytoplazmy cytochromu c i innych białkowych aktywatorów apoptozy,
 - uwalnianie do cytoplazmy dużych ilości jonów Ca^{2+} , co ma działanie toksyczne (ryc. 9), m.in. skutkujące nekrozą.

Za udziałem mPTP w mechanizmie reperfuzyjnego uszkodzenia przemawiają badania eksperymentalne [11, 26] i kliniczne [27] pokazujące, że blokowanie cyklofiliny-D za pomocą cyklosporyny-A (w warunkach klinicznych jedna iniekcja cyklosporyny-A tuż przed reperfuzją) redukuje wielkość martwicy zawałowej o 30–50%.

W mPTP spotykają się i sumują różne procesy, które tradycyjnie obciążano odpowiedzialnością za powstawanie reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium. Wśród nich najważniejsze to związane z reperfuzją: (i) obciążenie komórek Ca^{2+} (ryc. 9); (ii) zwiększona komórkowa produkcja ROS i stres oksydacyjny (tzw. reperfuzyjny paradoks tlenowy); (iii) spadek komórkowego stężenia ATP i ADP, a także wysokie stężenie fosforu nieorganicznego (P_i) oraz (v) reperfuzyjne wy-



Rycina 8. Centralna rola megakanala mitochondrialnego (mPTP) w mechanizmie reperfuzyjnego uszkodzenia miokardium. Alkalizacja kardiomiocytów w reperfuzji umożliwia działanie aktywatorów mPTP, w tym Ca^{2+} i ROS. Konsekwencją nieodwracalnej aktywacji mPTP jest katastrofa energetyczna komórki, a także jej apoptoza i/lub nekroza. Różne formy hartowania przeciwdziałają reperfuzyjnej aktywacji mPTP, co ma działanie kardioprotekcyjne



Rycina 9. Procesy aktywowane przez toksyczną akumulację Ca^{2+} w reperfundowanych komórkach i zmiany czynnościowe z tym związane. Wzrost komórkowego Ca^{2+} w reperfuzji jest wtórny do reperfuzyjnej alkalizacji przestrzeni pozakomórkowej, aktywacji wymiennika Na^+/H^+ , obciążenia kardiomiocytów Na^+ i dokomórkowego napływu Ca^{2+} przez wymiennik Na^+/Ca^{2+} . Toksyczność Ca^{2+} wiąże się m.in. z „trwonieniem” ATP przez ATP-azy, aktywacją proteaz (kalpainy) i fosfolipaz, a także aktywacją mPTP, która zwiększa dodatkowo poziom Ca^{2+} w cytoplazmie [7, 25]

plukiwanie H^+ z zakwaszonego niedokrwionego miokardium (tzw. reperfuzyjny paradoks pH) (przegląd literatury wg [5]). Każdy z wymienionych mechanizmów ma swój indywidualny mechanizm toksyczności (ryc. 9), ale wszystkie są także czynnikami skutkującymi szkodliwą aktywacją mPTP. Klasyczne aktywatory mPTP to czynniki wymienione w punktach (i)–(iii), które są częściowo obecne już w czasie niedokrwienia. Jednak ich stymulującemu działaniu na mPTP zapobiega wtedy niskie komórkowe pH. Reperfuzyjna alkalizacja mio-

kardium usuwa ten blok, a dodatkowo reperfuzja zwiększa obecność aktywatorów. Coraz powszechniejsze jest obecnie przekonanie, że endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne, znane jako hartowanie, działają poprzez zapobieganie reperfuznej aktywacji mPTP (ryc. 8) [11, 24–26].

Na obecność hartowania w sercu człowieka wskazują: (1) badania eksperymentalne na fragmentach ludzkiego miokardium; (2) obserwacje sugerujące, że bóle wieńcowe, które sygnalizują fakt niedokrwienia miokardium, paradoksalnie zwiększają tolerancję serca na kolejne dłuższe niedokrwienia oraz (3) nowe obserwacyjne prace kliniczne sugerujące: (a) skuteczność HN w ograniczeniu okołoproceduralnego uszkodzenia miokardium (HN jest nieprzydatne w leczeniu MI, gdyż wymaga zastosowania bodźca hartującego przed niedokrwieniem, ryc. 4B) oraz (b) skuteczność HR, hartowania na odległość i „mimetyków” hartowania używanych jako uzupełnienie leczenia reperfuzyjnego MI.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

- Braunwald E, Maroko PR. The reduction of infarct size — an idea whose time (for testing) has come. *Circulation*, 1974; 50: 206–209.
- Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 1977; 56: 786–794.
- Reimer KA, Jennings RB. The “wavefront phenomenon” of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest*, 1979; 40: 633–644.
- DeWood M, Spores J, Notske R et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1980; 303: 897–902.
- Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 2007; 357: 1121–1135.
- Downey JM, Cohen MV. Why do we still not have cardioprotective drugs? *Circ J*, 2009; 73: 1171–1177.
- Hausenloy DJ, Baxter G, Bell R et al. Translating novel strategies for cardioprotection: the Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res Cardiol*, 2010; 105: 677–686.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986; 74: 1124–1136.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 285: H579–H588.
- Kavazis AN. Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med*, 2009; 39: 923–935.
- Hausenloy DJ, Ong SB, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. *Basic Res Cardiol*, 2009; 104: 189–202.
- Przyklenk K, Kloner RA. Ischemic preconditioning: exploring the paradox. *Prog Cardiovasc Dis*, 1998; 40: 517–547.
- Beręsewicz A. Hartowanie niedokrwieniem — endogenny mechanizm kardioprotekcyjny. *Ann Diagn Paediatric Pathol*, 2003; 7: 37–43.
- Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Jiang R, Zatta AJ, Dobson GP. Preconditioning and postconditioning: innate cardioprotection from ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol*, 2007; 103: 1441–1448.
- Beręsewicz A, Czarnowska E, Mączewski M. Ischemic preconditioning and superoxide dismutase protect against endothelial dysfunction and endothelium glycocalyx disruption in the post-ischemic guinea-pig hearts. *Mol Cell Biochem*, 1998; 186: 87–92.
- Kurzelewski M, Czarnowska E, Mączewski M, Beręsewicz A. Effect of ischemic preconditioning on endothelial dysfunction and granulocyte adhesion in isolated guinea-pig hearts subjected to ischemia/reperfusion. *J Physiol Pharmacol*, 1999; 50: 617–628.
- Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Fail Rev*, 2007; 12: 181–188.
- Murphy E, Steenbergen C. Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annu Rev Physiol*, 2007; 69: 51–67.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*, 2007; 12: 217–234.
- Miura T, Tanno M, Sato T. Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis. *Cardiovasc Res*, 2010; 88: 7–15.
- Bolli R. Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007; 292: H19–H27.
- Wojtczak L, Zabłocki K. Mitochondria in cell life, death and disease. *Postepy Biochem*, 2008; 54: 129–141.
- Rouslin W, Erickson JL, Solaro RJ. Effects of oligomycin and acidosis on rates of ATP depletion in ischemic heart muscle. *Am J Physiol*, 1986; 250: H503–H508.
- Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans*, 2010; 38: 841–860.
- Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*, 2010; 87: 406–423.
- Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*, 2010; 105: 151–154.
- Piot C, Croisille P, Staat P et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2008; 359: 473–481.

Leczenie reperfuzyjne zawału wspomagane endogennymi mechanizmami kardioprotekcyjnymi

The endogenous cardioprotection during reperfusion in acute myocardial infarction

Jarosław Zalewski^{1, 2}, Jadwiga Nessler^{1, 2}

¹Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Kraków

²Klinika Choroby Wieńcowej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Streszczenie

Najbezpieczniejsza i najskuteczniejsza terapia reperfuzyjna w ostrym zawałe serca polega na bezzwłocznym wykonaniu pierwotnej angioplastyki wieńcowej połączonej z odessaniem skrzepliny z nasierdziowego odcinka i implantacji stentu w miejsce odpowiedzialne za incydent w osłonie leków przeciwplateletowych i przeciwzakrzepowych. Niestety, u dużego odsetka pacjentów model ten nie gwarantuje dobrego odległego wyniku klinicznego ani poprawy funkcji lewej komory. Mimo bezsprzecznych korzyści związanych z reperfuzją, naukowcy dysponują dowodami na to, że jej początkowa faza prowadzi do dodatkowego uszkodzenia wcześniej niedokrwionego obszaru, a zatem końcowy efekt stanowi wypadkową korzyści i zniszczenia, jakie wiążą się z falą reperfuzji. Badania doświadczalne wskazują, że hartowanie reperfuzją polegające na kilku cyklach naprzemiennie występujących krótkich epizodów reperfuzji i niedokrwienia bezpośrednio po zakończeniu fazy niedokrwienia, a przed rozpoczęciem fazy reperfuzji, ogranicza strefę zawału. Komórkowym efektem tego procesu odpowiedzialnym za działanie ochronne są mitochondrialne megakanaly. Wciąż brak klinicznego potwierdzenia skuteczności zarówno procesu hartowania reperfuzją, jak i farmakoterapii naśladującej hartowanie z udziałem cyklosporyny w randomizowanych, wieloośrodkowych badaniach klinicznych z odpowiednio zaprojektowanym punktem końcowym. Dotychczas większość klinicznie przebadanych preparatów naśladujących endogenną kardioprotekcję, takich jak m.in. adenozyne, erytropoetyna, inhibitor kinazy białkowej C- δ , przedsionkowy peptyd natriuretyczny, atorwastatyna czy nikorandil, okazała się nieskuteczna. Czas pokaże, czy hartowanie reperfuzją i jego naśladowanie spełnią pokładane nadzieje i znajdą uznanie w zaleceniach dotyczących leczenia zawału.

Słowa kluczowe: ostry zawał serca, pierwotna angioplastyka wieńcowa, hartowanie reperfuzją, mitochondrialny megakanal

Abstract

A prompt primary percutaneous coronary intervention with aspiration thrombectomy and subsequent stent implantation at the culprit lesion combined with optimal anti-platelet and anti-thrombotic pharmacotherapy is the safest and most effective reperfusion strategy. Unfortunately, this therapy does not guarantee always a good, long-term clinical outcome and left ventricular function recovery. Despite the unquestionable benefit of reperfusion, we have evidence that its initial phase leads to additional damage at the area at risk, so the final effect is the compromise between benefits and destruction, which come with the reperfusion wavefront. Experimental studies suggest that postconditioning with several very brief cycles of ischaemia alternating with reperfusion applied immediately after relief of a prolonged epicardial occlusion is associated with the infarct size limitation. The cellular protective effect of postconditioning seems to be related to prevention of mitochondrial permeability transition pore activation. We have still to wait for confirmation of the clinical effectiveness of both postconditioning as well as pharmacotherapy that mimics postconditioning effects (e.g. with cyclosporine) in a randomised, multicenter clinical trial with properly designed endpoint. To date, most clinically tested agents that induced endogenous cardioprotection such as adenosine, erythropoietin, protein kinase C- δ inhibitor, atrial natriuretic peptide, atorvastatin and nicorandil were failed to reduce infarct size. Time will tell whether postconditioning and therapy that it mimics meet expectation and find place in the recommendations concerning management of acute myocardial infarction.

Key words: acute myocardial infarction, primary percutaneous coronary intervention, postconditioning, mitochondrial permeability transition pore

Kardiol Pol 2011; 69, supl. III: 67–74

Adres do korespondencji:

dr n. med. Jarosław Zalewski, Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, ul. Prądnicka 80, 31–202 Kraków, tel: +48 12 626 08 08, e-mail: jzalewski@szpitaljp2.krakow.pl

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

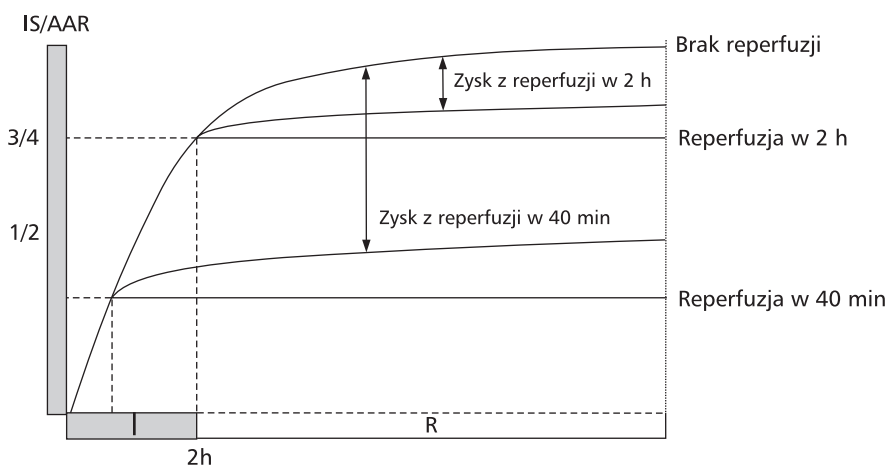
WSTĘP

Pęknięcie blaszki miażdżycowej lub owrzodzenie powierzchni śródbłonka w obrębie nasierdziowego odcinka tętnicy wieńcowej z następczym wytworzeniem skrzepiny zamykającej światło naczynia, a rzadziej postępujące, krytyczne zwężenie miażdżycowe, skurcz naczynia lub mikrozatorowość są odpowiedzialne za powstanie zawału serca (MI). Podczas fazy niedokrwienia tempo i rozległość martwicy są pochodnymi stopnia rozwoju krążenia obocznego [1], poprzedzającej niedokrwienie indukcji endogennych mechanizmów ochronnych [2], czasu niedokrwienia [3] i rozległości strefy zagrożonej zawałem [4]. Bez przywrócenia przepływu wieńcowego proces martwicy postępuje szybko, od najwrażliwszej na niedokrwienie warstwy podwierzdziowej w kierunku nasierdza, obejmując w pierwszych 2 h 70–80% strefy ryzyka, a po upływie 3–6 h prowadząc do powstania pełnościennej martwicy [1, 3, 4]. Ponad wszelką wątpliwość najpierw wykazano w badaniach doświadczalnych, a następnie potwierdzono wielokrotnie w obserwacjach klinicznych, że bezwzględna reperfuza stanowi najskuteczniejszy sposób ograniczenia wszystkich konsekwencji MI. Mimo bezsprzecznie korzystnego działania procesu reperfuzy, badacze dysponują dowodami na to, że jej początkowa faza wywołuje dodatkowe niekorzystne efekty we wcześniej niedokrwionym obszarze, dlatego końcowy efekt jest wypadkową korzyści i zniszczenia, jakie wiążą się z falą reperfuzy (ryc. 1) [5]. Te dwa oblicza reperfuzy sprawiają, że laboratoria badawcze i ośrodki kliniczne sprawdzają metody umożliwiające optymalizację reperfuzy poprzez kliniczne wykorzystanie mechanizmów endogennej kardioprotekcji. W efekcie optymalna reperfuza powinna stanowić korzystny bilans między uszkodzeniem, jakie w ogóle wiąże się z niereperfundowanym niedokrwieniem, a szkodą podczas reperfuzy z zastosowaniem wszyst-

kich klinicznie sprawdzonych, w tym również endogennych, sposobów kardioprotekcji.

REKOMENDOWANA TERAPIA REPERFUZYJNA

Wytyczne towarzystw kardiologicznych europejskiego [6] i amerykańskich [7] mówią, że u pacjentów z bólem/dyskomfortem w klatce piersiowej utrzymującym się < 12 h i towarzyszącym uniesieniem odcinka ST lub ostrym blokiem lewej odnogi pęczka Hisa należy zastosować terapię reperfuzyjną (klasa zaleceń: I, poziom wiarygodności: A; tab. 1). Reperfuzyję trzeba również rozważyć po upływie 12 h od początku objawów u chorych z klinicznymi i/lub elektrokardiograficznymi dowodami na postępujące niedokrwienie (IIa, C). Jeśli warunki logistyczne na to pozwalają i czas od pierwszego kontaktu pacjenta z lekarzem do napełnienia balonu w tętnicy wieńcowej nie przekroczy 2 h, a w przypadku osób z wczesną (pierwsze 2 h) prezentacją rozległego MI — 90 min, to w pierwszej kolejności zaleca się reperfuzyję metodą pierwotnej angioplastyki wieńcowej (PCI) polegającą na mechanicznym udrożnieniu tętnicy wieńcowej (I, A). Niezależnie od czasu opóźnienia związanego z transportem, pierwotna PCI jest wskazana zawsze u chorych we wstrząsie i z przeciwwskazaniami do terapii fibrynolitycznej (I, B). Jeśli kryteria czasowe dla wykonania pierwotnej PCI z powodu niedostępności pracowni hemodynamicznej są nieosiągalne, to zwłoka czasowa jest nieuzasadniona i wówczas należy rozpocząć leczenie trombolityczne (I, A) o dużym powinowactwie do fibryny (I, B), najszybciej jak to możliwe, nawet już w ambulansie (IIa, A). W razie nieskutecznego leczenia fibrynolitycznego stwierdzonego klinicznie lub na podstawie niedostatecznej normalizacji uniesienia odcinka ST (< 50%), gdy obraz kliniczny i EKG wskazują na rozległy MI, należy rozważyć wykonanie ratunkowej PCI do 12 h od wystąpienia pierwszych objawów



Rycina 1. Czas niedokrwienia i reperfuza a strefa zawału. Wielkość strefy zawału (IS) zależy od czasu trwania fazy niedokrwienia (I) i skuteczności reperfuzy (R). W pierwszych 2 h niedokrwienia strefa zawału rozwija się najszybciej. Każda reperfuza po okresie niedokrwienia dłuższym niż 10–20 min wiąże się z dodatkowym uszkodzeniem, niemniej im wcześniej jest ona przeprowadzona, tym większy obszar zagrożonego niedokrwieniem miokardium (AAR) zostaje uratowany przed nieodwracalnym uszkodzeniem

Tabela 1. Klasy zaleceń i poziomy wiarygodności

Klasa zaleceń	Procedura/terapia	Poziom wiarygodności	Pochodzenie danych
I	Korzystna, przydatna i skuteczna	A	≥ 2 badania z randomizacją lub metaanalizy
II	Dane niejednoznaczne		
Ila	Raczej przydatna i skuteczna	B	1 badanie z randomizacją lub duże badania bez randomizacji
Ilb	Brak danych na przydatność i skuteczność		
III	Nieprzydatna/nieskuteczna	C	Opinie ekspertów

(IIa, A). W ostrej fazie MI każdy pacjent powinien niezwłocznie otrzymać 150–325 mg kwasu acetylosalicylowego (I, B), 600 mg kłopidogrelu (I, C) i heparynę (I, C) lub bivalirudynę (IIa, B) w dawce dostosowanej do masy ciała. Systematyczny przegląd badań z randomizacją pokazał, że abciximab podany w ramach wspomagającej przeciwplatekowej terapii podczas pierwotnej PCI (IIa, A) zmniejszał śmiertelność 30-dniową (2,4% v. 3,4%, $p < 0,05$) oraz po 6–12 miesiącach (4,4% v. 6,2%, $p = 0,01$), zmniejszał ryzyko ponownego MI (1,0% v. 1,9%, $p = 0,03$), jednocześnie nie wpływając na częstość wystąpienia udaru krwotocznego (0,61% v. 0,62%, $p = 0,62$) i innych poważnych powikłań krwotocznych (4,7% v. 4,1%, $p = 0,36$). Podobnych korzystnych dla abciximabu zależności nie wykazano w odniesieniu do fibrynolizy. Ostatnio wykazano, że abciximab podany przed PCI w grupie pacjentów nasyconych kłopidogrelem nie przynosi dodatkowej korzyści klinicznej i nie zmniejsza strefy MI. Torowana PCI polegająca na podaniu farmakologicznej reperfuzji (fibrynoliza z lub bez inhibitora receptora GP IIb/IIIa) i niezależnie od jej wyniku wykonaniu przezskórnej interwencji nie jest obecnie zalecana.

Aktualnie intensywnie bada się rolę systemów umożliwiających zmniejszenie ładunku skrzepliny w nasierdziowym odcinku podczas pierwotnej PCI. W dużym badaniu klinicznym TAPAS wykazano, że zaaspirowanie skrzepliny przed PCI wiązało się z lepszą reperfuzją tkankową i wyższym wskaźnikiem przeżycia po roku w porównaniu z konwencjonalną PCI (3,6% v. 6,7%, $p = 0,02$) (IIb, B). W przeprowadzonym następnie systematycznym przeglądzie badań z randomizacją [8] potwierdzono, że to manualna trombektomia aspiracyjna zmniejsza śmiertelność podczas pierwotnej PCI, ale nie trombektomia mechaniczna ani systemy zapobiegające embolizacji. Należy jednak pamiętać, że zasadniczy wpływ na rezultat tych metaanaliz miał wynik największego badania TAPAS. W zapobieganiu i leczeniu zespołu braku reperfuzji podczas pierwotnej PCI zaleca się aspirację skrzepliny (IIa, B) lub podanie abciximabu (IIa, B). Wyniki najnowszych badań dotyczących odległej obserwacji pacjentów z MI z uniesieniem odcinka ST (STEMI) wskazują, że stenty pokryte lekami antyproliferacyjnymi zmniejszają ryzyko ponownych interwencji i nawrotu zwężenia w porównaniu ze stentami meta-

lowymi, bez istotnego wpływu na ryzyko zakrzepicy w stenocie, ponownego MI, udaru czy zgonu [9].

Podsumowując, obecnie najskuteczniejsza i najbezpieczniejsza terapia reperfuzyjna w ostrym MI polega na bezzwłocznym wykonaniu pierwotnej PCI, w trakcie której w pierwszym etapie zostaje odessana skrzeplina z nasierdziowego odcinka, a następnie zabezpiecza się miejsce odpowiedzialne za incydent stentem w osłonie leków przeciwplatekowych (kwasu acetylosalicylowego i tienopyrydyny) oraz przeciwzakrzepowych (heparyny/bivalirudyny). Niestety u dużego odsetka pacjentów model ten nie gwarantuje dobrego wyniku odległego ani w odniesieniu do twardych klinicznych punktów końcowych, ani do poprawy funkcji lewej komory; dlatego są badane nowe farmakologiczne i niefarmakologiczne strategie mające wspomóc proces reperfuzji.

HARTOWANIE REPERFUZJĄ

Definicja

Hartowanie reperfuzją (*postconditioning*, HR) to proces polegający na wykonaniu kilku cykli naprzemiennie występujących krótkich epizodów reperfuzji i niedokrwienia między fazą niedokrwienia (I) i reperfuzji (R) [10]. Warunkiem *sine qua non* dla zaistnienia HR jest wykonanie pierwszego hartującego cyklu krótkiego epizodu R/I bezpośrednio po zakończeniu fazy niedokrwienia. Ten relatywnie prosty mechaniczny manewr ma być sygnałem włączającym biologiczne i molekularne endogenne mechanizmy ochronne znajdujące się w obrębie reperfundowanego miokardium. Jego prosta konstrukcja jest atrakcyjna z medycznego punktu widzenia, gdyż łatwo ją przenieść na grunt kliniczny, szczególnie podczas pierwotnej PCI u pacjentów z ostrym MI [11–14].

Protokół HR i jego konsekwencje

Hartowanie reperfuzją skutecznie ogranicza strefę MI (IS) w modelu I/R zarówno u małych (mysz, szczur [15–17]), jak i dużych (królik [18, 19], pies [10, 19, 20], świnia [21]) zwierząt doświadczalnych. Aby proces HR był efektywny, należy spełnić kilka warunków dotyczących przede wszystkim czasu trwania fazy niedokrwienia, okresu między końcem fazy niedokrwienia a reokluzją podczas pierwszego cyklu hartują-

Tabela 2. Badania eksperymentalne dotyczące hartowania reperfuzyj

Gatunek	Czas I/R [min]	Liczba cykli HR	Czas cykli HR [s]	IS/AAR w grupach HR v. kontrolna	Efekt przeciwwzawałowy	Piśmiennictwo
Pies	60/180	3	30/30	15 ± 2% v. 25 ± 3%	↓40%	[10]
Pies	90/360	4	60/60	12 ± 5% v. 37 ± 5%	↓65%	[20]
Świnia	30/180	4	30/30	38 ± 5% v. 27 ± 5%	Brak efektu	[25]
Świnia	60/180	4	30/30	37 ± 4% v. 34 ± 8%	Brak efektu	[21]
		8	30/30	10 ± 1% v. 34 ± 8%	↓70%	
Królik	30/180	4 lub 6	30/30	20 ± 3% v. 35 ± 3%	↓43%	[18]
Królik	30/180	4	30/30	39 ± 7% v. 56 ± 4%	↓30%	[19]
Królik	30/180	4	30/30	35 ± 6% v. 29 ± 4%	Brak efektu	[i]
		4	60/60	45 ± 4% v. 42 ± 6%		
Królik	30/120	4	30/30	25 ± 3% v. 33 ± 2%	↓24%	[24]
		6	10/10	10 ± 3% v. 33 ± 2%	↓70%	
Szczur	30–45/120	4 × 10/10; 4 × 20/20; 8 × 30/30; 20 × 10/10			Brak efektu	[ii]
Szczur	20/30	3, 6	10/10	40 ± 3% v. 53 ± 2%	↓25%	[16]
Szczur	30/180	3	10/10	40 ± 2% v. 52 ± 3%	↓25%	[15]

I — niedokrwienie; R — reperfuzyja; IS/AAR — wskaźnik strefa zawału/strefa niedokrwienia; HR — hartowanie reperfuzyj; [i] Hale SL, Mehra A, Leeka J, Kloner RA. Postconditioning fails to improve no reflow or alter infarct size in an open-chest rabbit model of myocardial ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*, 2008; 294: H421–H425; [ii] Dow J, Kloner RA. Postconditioning does not reduce myocardial infarct size in an in vivo regional ischemia rodent model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2007; 12: 153–163

cego, czasu trwania faz hartującego cyklu i liczby cykli hartujących (tab. 2). Optymalny czas trwania fazy niedokrwienia dla zadziałania HR zależy od modelu doświadczalnego i np. u szczura wynosi 30–45 min, a gdy przekroczy 60 min, ochronne działanie HR zostaje znacznie ograniczone [22]. Również zbyt krótki czas fazy niedokrwienia w modelu MI u szczura czy świni spowodował, że HR nie przynosiło spodziewanego efektu [23]. Utratę przeciwwzawałowych właściwości HR obserwowano także wtedy, gdy czas od zakończenia fazy niedokrwienia do pierwszej okluzji cyklu hartującego, np. w sercu królika, był dłuższy niż 10 min [18], a w sercu szczura przekraczał 1 min [15].

Ze względu na różnice międzygatunkowe nie udało się stworzyć jednego protokołu dla HR. Z większości dotychczas zakończonych badań wynika, że im mniejsze zwierzę doświadczalne, tym krótsze powinny być cykle hartujące. W pierwszym badaniu dedykowanym HR Zhao i wsp. [10] porównywali skuteczność hartowania niedokrwieniem (*ischemic preconditioning*, HN) i hartowania reperfuzyj w modelu MI u psa. Po okresie 60-minutowego niedokrwienia zastosowano 3 cykle hartujące o 30-sekundowej okluzji i 30-sekundowej reperfuzyj (zapis w skróconej formie 30 s/30 s), które w porównywalny sposób do HN ograniczyły strefę MI o 40%, zmniejszyły nagromadzenie neutrofilów w strefie zagrożonej MI o 70% i poprawiły funkcję śródbłonna o 50%. W modelu serca królika *in situ* strefę MI udaje się skutecznie ograniczyć za pomocą zarówno 4–6 cykli hartujących 30 s/30 s [18, 19], jak i 6 cykli 10 s/10 s [24]. Z kolei skuteczny zabieg HR w modelach serca szczura *in situ* [25] i izolowanego serca

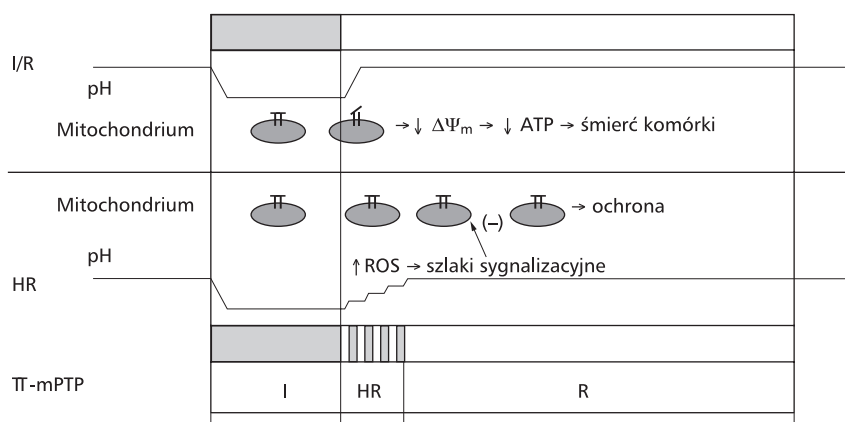
królika [24] wymaga 3–6 cykli 10 s/10 s. Ochronne działanie HR w modelu MI u świni zależy od liczby cykli hartujących. Schwarz i Lagranha [25] wykazali, że 4 cykle 30 s/30 s nie ograniczały strefy MI u świni. Iliodromitis i wsp. [21] potwierdzili tę obserwację, dodając, że 8 cykli 30 s/30 s wywoływało znamienne 70-procentową redukcję IS. Konieczność zastosowania większej liczby cykli hartujących w celu osiągnięcia ochronnego efektu badacze tłumaczyli potrzebą utrzymania niskiego pH w niedokrwionej tkance przez okres > 4 min potrzebny do aktywacji mechanizmów ochronnych.

Wiele argumentów przemawia również za tym, że HR zmniejsza liczbę i nasilenie wywołanej reperfuzyj arytmii komorowej, głównie migotania i częstoskurczu, natomiast nie ogranicza czynnościowego ogłuszenia niedokrwionego miokardium niezależnego od wielkości strefy martwicy [19, 23].

Mechanizm HR

W proces HR są zaangażowane liczne uwolnione do przestrzeni międzykomórkowej podczas I/R czynne substancje wyzwalające go, receptory błonowe dla tych substancji i wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne [22, 23]. Naukowcy dysponują argumentami za tym, że końcowym ogniwem zaangażowanym zarówno w proces uszkodzenia, jak i hartowania reperfuzyj są mitochondrialne megakanały (mPTP, *mitochondrial permeability transition pore*).

Niskie pH podczas fazy niedokrwienia spowodowane nagromadzeniem protonów w przestrzeni wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej zapobiega aktywacji mPTP, hamując translokację zależnej od Ca²⁺ cyklofiliny D. Podczas początkowej fazy



Rycina 2. Rola mitochondrialnych megakanatów w procesie hartowania reperfuzyją. Niskie pH podczas fazy niedokrwienia (I) zapobiega aktywacji megakanátu mitochondrialnego (mPTP). Podczas początkowej fazy reperfuzyji (R), związanej z szybkim wzrostem pH, mPTP ulegają nieodwracalnej aktywacji, co prowadzi do rozprężenia fosforylacji oksydacyjnej, redukcji mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$), przerwania produkcji ATP, obrzęku mitochondrium, destrukcji jego błony, uwolnienia aktywatorów białkowych i Ca^{2+} do przestrzeni wewnątrzkomórkowej i ostatecznie śmierci komórki. Fazy perfuzji kolejnych cykli hartowania reperfuzyją (HR) przynoszą wystarczającą ilość tlenu do produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS), będąc jednocześnie zbyt krótkie, aby doprowadzić do normalizacji pH. Z kolei ROS aktywują szlak kinaz wczesnej protekcji, zapobiegając trwałej aktywacji mPTP i w ten sposób chronią komórkę

reperfuzyji związanej z szybkim wzrostem pH, mPTP nieaktywne w środowisku kwaśnym, ulegają nieodwracalnej aktywacji, co prowadzi do rozprężenia fosforylacji oksydacyjnej, przerwania produkcji ATP, obrzęku mitochondrium, destrukcji jego błony, uwolnienia aktywatorów białkowych oraz Ca^{2+} do przestrzeni wewnątrzkomórkowej i ostatecznie śmierci komórki (ryc. 2) [17].

Mechanizm wzbudzenia przez cykle krótkiego niedokrwienia i reperfuzyji podczas HR endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych, bez jednoczesnego uszkodzenia reperfuzyjnego, nie został do końca poznany. Według Cohena i wsp. [26] fazy perfuzji podczas HR przynoszą wystarczającą ilość tlenu do produkcji wolnych rodników tlenowych, ale są zbyt krótkie, aby doprowadzić do normalizacji pH. Z kolei wolne rodniki tlenowe aktywują szlak kinaz wczesnej protekcji (RISK, *reperfusion injury salvage kinases*), którego końcowym efektem są białka mPTP [23]. Istnieje coraz więcej argumentów za tym, że w proces przenoszenia kardioprotekcji związanej z HR na mPTP są zaangażowane m.in. izoforma ϵ kinazy białkowej C, kinaza białkowa G odpowiedzialna za syntezę cGMP, syntaza tlenu azotu, kanał potasowy zależny od ATP (K_{ATP}) oraz szlak kinaz poprawiających przeżycie (SAFE, *survivor activating factor enhancement*). Szlaki zależne od produkcji wolnych rodników są niezależne od pH tkankowego, a swoją funkcję ochronną mogą efektywnie wykorzystać tylko wówczas, gdy zdążą trwale uszczelnić mPTP, zanim ten ostatni zostanie otwarty w środowisku normalizującego się pH.

Podsumowując, HR zapobiega aktywacji mPTP poprzez wydłużenie i zmniejszenie tempa powrotu pH do normy w pierwszych minutach reperfuzyji. Jednocześnie powstające

w reperfundowanym miokardium wolne rodniki aktywują działające ochronnie mechanizmy hamujące aktywację mPTP, zanim pH ulegnie normalizacji [26].

Kliniczne znaczenie HR

Kolejne argumenty dotyczące korzystnych efektów HR płynące z badań przedklinicznych zachęcają do klinicznej aplikacji HR (tab. 3). W 2005 r. Staat i wsp. [11] opublikowali wyniki badania z randomizacją, do którego włączono 30 pacjentów ze STEMI o wczesnej prezentacji (ból do 6 h). Chorych leczono klasycznie metodą pierwotnej PCI lub PCI poprzedzono 4 hartującymi cyklami 60 s/60 s. W grupie poddanej hartowaniu pole powierzchni pod krzywą uwalniania enzymów w ciągu pierwszych 72 h, uznane za ekwiwalent strefy MI, było mniejsze o 36%. Trzy lata później ci sami badacze wykazali, że HR wiązało się z mniejszą strefą MI w badaniu scyntygraficznym po 6 miesiącach i lepszą funkcją lewej komory w badaniu echokardiograficznym po 12 miesiącach [27]. Korzystny efekt HR związany z mniejszą szkodą enzymatyczną odnotowali także Darling i wsp. [13], analizując retrospektywnie pacjentów poddawanych pierwotnej PCI, oraz Yang i wsp. [14] w małej, przeprowadzonej prospektywnie z randomizacją próbie klinicznej obejmującej 41 pacjentów. Z kolei Laskey i wsp. [12] przydzielili losowo 24 pacjentów z wczesnym (do 6 h) zawałem ściany przedniej do grupy leczonej klasycznie i poddanej hartowaniu dwoma cyklami 90 s/180 s. Hartowanie reperfuzyją wiązało się z dynamiczniejszą rezolucją uniesienia odcinka ST i poprawą rezerwy wieńcowej. Ostatnio grupa duńskich kardiologów [28] przeprowadziła badanie, przydzielając losowo 118 pacjentów ze STEMI do grupy leczonej klasycznie i poddanej hartowaniu

Tabela 3. Badania kliniczne nad reperfużą zawału serca wspomaganą endogennymi mechanizmami kardioprotekcyjnymi

Projekt badania	Liczba pacjentów	Czas bólu	Protokół	Efekt	Piśmiennictwo
Wieloośrodkowe, randomizacja	30	< 6 h	4 cykle 60 s/60 s	Uwalnianie CK ↓ o 36%	[11]
Jednośrodkowe, randomizacja	24	< 6 h	2 cykle 90 s/180 s	Szybsza rezolucja ST w EKG, poprawa rezerwy wieńcowej	[12]
Jednośrodkowe, randomizacja	41	< 12 h	3 cykle 30 s/30 s	Uwalnianie CK ↓ o 27%	[14]
Wieloośrodkowe, randomizacja	118	< 12 h	3 cykle 30 s/30 s	Po 3 mies.: 19% ↓ IS w MRI, LVEF bez zmian	[28]
Jednośrodkowe, randomizacja	58	< 12 h	Cyklosporyna 2,5 mg/kg <i>i.v.</i>	Uwalnianie CK ↓ o 40%	[31]
Jednośrodkowe, randomizacja	28	< 12 h	Cyklosporyna 2,5 mg/kg <i>i.v.</i>	Po 6 mies.: 24% ↓ IS w MRI	[32]
Wieloośrodkowe, randomizacja	569	< 12 h	72 h wlew ANP	Uwalnianie CK ↓ o 15% Po 6–12 mies.: ↑ LVEF o 2,2%	[33]
Wieloośrodkowe, randomizacja	545	< 12 h	24 h wlew nikorandilu	Brak efektu	[33]
Jednośrodkowe, randomizacja	112	< 12 h	Adenozyna 4 mg <i>i.c.</i>	Brak wpływu na IS w MRI	[34]
Wieloośrodkowe, randomizacja	222	< 12 h	4 h wlew etyropoetyny	Brak wpływu na IS w MRI, więcej MACE	[35]
Wieloośrodkowe, randomizacja	1176	< 6 h	2,5 h wlew inhibitora PKC-δ	Brak wpływu na uwalnianie CK-MB, rezolucję ST w EKG, a po 3 mies. na wynik kliniczny i LVEF	[i]
Jednośrodkowe, randomizacja	171	< 12 h	80 v. 10 mg atorwastatyny przed PCI	↑ cTFC o 24% Brak wpływu na wynik kliniczny po 1 mies.	[36]

CK/CK-MB — kinaza kreatynowa/izoenzym MB; MRI — rezonans magnetyczny; IS — strefa zawału; LVEF — frakcja wyrzutowa lewej komory; MACE — niepożądane zdarzenia sercowo-naczyniowe; cTFC — skorygowana liczba klatek ruchomego obrazu w angiografii; PKC-δ — izoenzym kinazy białkowej C; [i] Wyniki badania PROTECTION-AMI opublikowane podczas *American College of Cardiology* w kwietniu 2011 roku

4 cyklami 30 s/30 s. W badaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI) po 3 miesiącach wykazano mniejszą strefę MI (IS/AAR: 51% v. 63%, $p < 0,01$), jednocześnie nie znajdując różnic w wartości frakcji wyrzutowej lewej komory (53% w obu grupach).

Na komentarz zasługuje prospektywne badanie [29], w którym 333 pacjentów ze STEMI podczas transportu do szpitala losowo przydzielano do grupy, u której wykonywano 4 cykle 5-minutowej inflacji i 5-minutowej deflacji mankietu do mierzenia ciśnienia (PerC, *perconditioning*) lub nie wykonywano podobnej procedury. Po 30 dniach indeks uratowanego miokardium oznaczony w badaniu scyntygraficznym u pacjentów poddanych PerC był większy (0,69 v. 0,57, $p = 0,033$).

FARMAKOLOGICZNA KARDIOPROTEKCJA REPERFUŻJI

W modelu doświadczalnym farmakologiczna blokada mPTP za pomocą cyklosporyny A wiązała się z redukcją strefy MI

o 45%, podczas gdy atraktylozyd otwierający mPTP całkowicie ją zniósł [30]. Piot i wsp. [31] wykazali w małej grupie 58 pacjentów, że bolus cyklosporyny podany losowo w dawce 2,5 mg/kg mc., 10 min przed wykonaniem pierwotnej angioplastyki zredukował o 40% ($p = 0,04$) uwalnianie CK-MB w ciągu pierwszych 72 h reperfuzy w stosunku do grupy kontrolnej. Dwa lata później ci sami badacze pokazali odległy efekt leczenia niewielkiej grupy 28 pacjentów, z którego wynika, że dożylnie podanie cyklosporyny wiąże się z redukcją strefy MI po 6 miesiącach i mniejszą przebudową lewej komory zmierzoną metodą MRI [32].

W dużym, wieloośrodkowym badaniu z randomizacją J-WIND [33] grupa japońskich badaczy sprawdzała, czy dodanie przedsionkowego peptydu natiuretycznego, który hamuje układ renina–angiotensyna–aldosteron i receptory dla endoteliny lub nikorandilu aktywującego kanały K_{ATP} poprawia wyniki terapii reperfuzyjnej. Do badania zakwalifikowano pacjentów poddanych zarówno terapii trombolitycznej, jak

i mechanicznej reperfuzji. Okazało się, że 72-godzinny wlew przedsiorkowego peptydu natriuretycznego spowodował 15-procentową ($p = 0,016$) redukcję uszkodzenia enzymatycznego i poprawę frakcji wyrzutowej w badaniu echokardiograficznym po 6–12 miesiącach średnio o 2,2% ($p = 0,024$), podczas gdy 24-godzinny wlew nikorandilu nie przyniósł żadnej poprawy.

Po serii pozytywnych badań AMISTAD, których rezultaty wykazały korzyść z podania adenozyiny podczas reperfuzji u pacjentów z zawałem ściany przedniej i dużą dawką adenozyiny (70 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ podawanej dożylnie przez 3 h), ostatnio ukazały się wyniki badania SALVAGE, w którym dowieńcowe podanie adenozyiny w dawce 4 mg podczas pierwotnej PCI nie miało wpływu na wielkość strefy MI i obstrukcji mikrokrążenia mierzonej za pomocą MRI [34]. W ostatnich miesiącach oprócz badania SALVAGE opublikowano także wyniki 2 dużych, negatywnych prób klinicznych z randomizacją dedykowanych kardioprotekcji podczas reperfuzji. W pierwszym z badań — PROTECTION AMI — którego wyniki ogłoszono podczas kongresu *American College of Cardiology* w kwietniu 2011 r., 2,5-godzinny wlew inhibitora kinazy białkowej δ rozpoczęty jeszcze przed otwarciem tętnicy odpowiedzialnej za MI, nie zmniejszył uszkodzenia enzymatycznego i nie przyspieszył rezolucji odcinka ST. Ponadto w odniesieniu do badanego leku nie zaobserwowano korzystnego efektu klinicznego ani poprawy funkcji lewej komory w badaniu scyntygraficznym po 3 miesiącach. W drugim badaniu — REVEAL [35] — 4-godzinny wlew erytropoetyny nie zmniejszył strefy MI mierzonej w MRI między 2. a 6. dobą. Obserwowano natomiast większą liczbę niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych. Opierając się na przeciwwzapalnym, przeciwzakrzepowym, antyoksydacyjnym i poprawiającym funkcję śródbłonna działaniu statyn, zaprojektowano badanie STATIN STEMI, w którym sprawdzano skuteczność dużej (80 mg) i małej (10 mg) dawki atorwastatyny podanej przed pierwotną PCI [36]. W losowo przydzielonej grupie 171 pacjentów duża dawka atorwastatyny nie przyniosła poprawy klinicznej, niemniej wiązała się z poprawą parametrów angiograficznych po zabiegu.

Interesujących wyników może dostarczyć trwające aktualnie wieloośrodkowe badanie NOMI, w którym pacjenci ze STEMI do 12 h od początku bólu są losowo przydzielani do grupy inhalowanej przez 4 h tlenkiem azotu o stężeniu 80 ppm (zawieszonym w N_2 i O_2) lub mieszaniną N_2 i O_2 . Inhalacja rozpoczyna się co najmniej 10 min przed PCI, a pierwszorzędownym punktem końcowym jest strefa MI mierzona w MRI w 2.–3. dobie od PCI i po 4 miesiącach. Badanie to zostało poprzedzone fazą doświadczeń na świniach zakończonych pozytywnym wynikiem, w których inhalacja NO podczas początkowej fazy reperfuzji wiązała się z istotną redukcją strefy MI.

PERSPEKTYWY KARDIOPROTEKCJI REPERFUZJI

Jeśli spojrzeć się na aktualne zalecenia dotyczące reperfuzji w MI, to mimo kilku dekad badań przedklinicznych później

przenoszonych na grunt kliniczny, żaden z leków naśladujących endogenne kardioprotekcyjne mechanizmy nie znalazł uznanego miejsca w praktyce klinicznej. Czy to przypadek? Pomiędzy sterylną, precyzyjnie zaplanowaną pracą laboratoryjną a rzeczywistością, i to nawet tą z zastosowaniem badań klinicznych (najbardziej sterylna rzeczywistość kliniczna), istnieje ogromny rozdźwięk. Jeśli nawet w laboratorium uda się wykazać, że jakaś substancja lub procedura jest efektywna, to aby pomyślnie przeszła ona dalsze fazy kliniczne i badanie takie zostało zakwalifikowane do grupy liczących się w budowaniu rekomendacji, musi spełnić restrykcyjne wymogi. Nowoczesne badanie kliniczne testujące hipotezę dotyczącą endogennej kardioprotekcji musi: i) być przeprowadzone w dużej populacji, której liczebność wcześniej odpowiednio zaplanowana pozwoli sformułować uprawnione statystycznie wnioski; ii) obejmować pacjentów z rozległym MI; tylko wówczas można zauważyć korzyści z dodatkowych sposobów leczenia; iii) dotyczyć pacjentów z wczesną prezentacją; trzeba bowiem pamiętać, że po 2 h niedokrwienia 70–80% mięśnia sercowego w obszarze zagrożonym ulega martwicy; iv) mieć zaplanowany, precyzyjny sposób pomiaru efektu terapii; wydaje się, że narzędziem optymalnym do badań dotyczących MI u człowieka jest MRI umożliwiający ocenę zarówno strefy MI, jak i strefy zagrożonej MI. Spośród badań klinicznych dotyczących HR jedynie praca Lonborga i wsp. [28] spełnia te kryteria, natomiast wśród badań nad farmakologiczną kardioprotekcją reperfuzji trzy — SALVAGE [34], PROTECTION AMI i REVEAL [35] — spełniają większość z tych kryteriów, ale są jednocześnie badaniami negatywnymi. Jest to odpowiedź na pytanie, dlaczego kardioprotekcja reperfuzji wciąż nie znalazła miejsca w rekomendacjach klinicznych. Czy ma na to szansę? Czas pokaże, jednak patrząc na wysiłek związany z już zakończonymi badaniami, w obecny kształcie raczej nie.

Praca powstała dzięki finansowemu wsparciu pochodzącemu z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego [N402 187435].

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

1. Reimer KA, Jennings RB. The wavefront phenomenon of myocardial ischemic cell death, II: transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest*, 1979; 40: 633–644.
2. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986; 74: 1124–1136.
3. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 1977; 56: 786–794.
4. Hearse DJ, Bolli R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res*, 1992; 26: 101–108.

5. Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*, 1985; 76: 1713–1719.
6. Van de Werf F, Bax J, Betriu A et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the task force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 2008; 29: 2909–2945.
7. Kushner FG, Hand M, Smith SC Jr, et al. 2009 focused update of the ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-Elevation myocardial infarction (updating the 2004 guideline and 2007 focused update) and the ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention (updating the 2005 guideline and 2007 focused update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*, 2009; 54: 2205–2241.
8. Bavry AA, Kumbhani DJ, Bhatt DL. Role of adjunctive thrombectomy and embolic protection devices in acute myocardial infarction: a comprehensive meta-analysis of randomized trials. *Eur Heart J*, 2008; 29: 2989–3001.
9. Stone GW, Witzenbichler B, Guagliumi G et al. Heparin plus a glycoprotein IIb/IIIa inhibitor versus bivalirudin monotherapy and paclitaxel-eluting stents versus bare-metal stents in acute myocardial infarction (HORIZONS-AMI): Final 3-year results from a multicenter, randomised controlled trial. *Lancet*, 2011; 377: 2193–2204.
10. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol*, 2003; 285: H579–H588.
11. Staat P, Rioufol G, Piot C et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*, 2005; 112: 2143–2148.
12. Laskey WK, Yoon S, Calzada N, Ricciardi MJ. Concordant improvements in coronary flow reserve and ST-segment resolution during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a benefit of postconditioning. *Cath Cardiovasc Interv*, 2008; 72: 212–220.
13. Darling CE, Solari PB, Smith CS, Furman MI, Przyklenk K. Postconditioning the human heart: multiple balloon inflations during primary angioplasty may confer cardioprotection. *Basic Res Cardiol*, 2007; 102: 274–278.
14. Yang XC, Liu Y, Wang LF et al. Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol*, 2007; 19: 424–430.
15. Kin H, Zhao Z-Q, Sun H-Y et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*, 2004; 62: 74–85.
16. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res*, 2005; 67: 124–133.
17. Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovasc Res*, 2006; 70: 264–273.
18. Yang X-M, Proctor JB, Cui L et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol*, 2004; 44: 1103–1110.
19. Couvreur N, Lucats L, Tissier R et al. Differential effects of postconditioning on myocardial stunning and infarction: a study in conscious dogs and anesthetized rabbits. *Am J Physiol*, 2006; 291: H1345–H1350.
20. Fujita M, Asanuma H, Hirata A et al. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *Am J Physiol*, 2007; 292: H2004–H2008.
21. Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen MV et al. Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol*, 2006; 101: 502–507.
22. Skyschally A, van Caster P, Iliodromitis EK et al. Ischemic postconditioning — experimental models and protocol algorithms. *Basic Res Cardiol*, 2009; 104: 469–483.
23. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F et al. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? *Cardiovasc Res*, 2010; 87: 406–423.
24. Yang X-M, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol*, 2005; 100: 57–63.
25. Schwartz LM, Lagranha CJ. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *Am J Physiol*, 2006; 290: H1011–H1018.
26. Cohen MV, Yang XM, M. Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation*, 2007; 115: 1895–1903.
27. Thibault H, Piot C, Staat P et al. Long-term benefit of postconditioning. *N Engl J Med*, 2008; 359: 473–481.
28. Lonborg J, Kelbaek H, Vejstrup N et al. Cardioprotective effects of ischemic postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated by magnetic resonance. *Circ Cardiovasc Interv*, 2010; 3: 34–41.
29. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet*, 2010; 375: 727–734.
30. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res*, 2002; 55: 534–543.
31. Piot C, Croisille P, Staat P et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2008; 359: 473–481.
32. Mewton N, Croisille P, Gahide G et al. Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2010; 55: 1200–1205.
33. Kitakaze M, Asakura M, Kim et al. Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet*, 2007; 370: 1483–1493.
34. Desmet W, Bogaert J, Dubois C et al. High-dose intracoronary adenosine for myocardial salvage in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2011; 32: 867–877.
35. Najjar SS, Rao SV, Melloni C et al. Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2011; 305: 1863–1872.
36. Kim J-S, Kim J, Choi D et al. Efficacy of high-dose atorvastatin loading before primary percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol Cardiovasc Interv*, 2010; 3: 332–339.

Trening fizyczny jako skuteczny sposób ochrony serca przed niedokrwieniem

Physical training as an effective way to protect the heart against ischaemia

Iwona Korzeniowska-Kubacka

Klinika Rehabilitacji Kardiologicznej i Elektrokardiologii Nieinwazyjnej, Instytut Kardiologii, Warszawa

Streszczenie

Wyniki badań eksperymentalnych na zwierzętach wskazują na to, że regularne ćwiczenia fizyczne mogą ochronić, zahartować serce przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym (IR). Nie jest pewne, czy mechanizm komórkowy jest dokładnie ten sam co w przypadku hartowania niedokrwieniem, ale ostateczny efekt jest identyczny — bodziec stresowy, w tym wypadku powtarzany wysiłek, pozostawia w sercu „pamięć” przekładającą się na zwiększoną odporność na niedokrwienie. Obecnie precyzyjny mechanizm odpowiedzialny za kardioprotekcję indukowaną treningiem nie jest jasny. Rozważa się licznych kandydatów tej kardioprotekcji, włączając w to: rozwój krążenia obocznego, wzrost białek stresu SE, zwiększenie aktywności COX-2, wzrost stężenia białek szoku termicznego HSP72, zwiększenie aktywności kanałów mitoK-ATP i sarcoK-ATP oraz wzrost zdolności antyoksydacyjnej mięśnia sercowego. Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych, a zwłaszcza manganowej dyzmutazy ponadtlenkowej MnSOD, i wzrost ekspresji sarcoK-ATP odgrywają rolę w kardioprotekcji wywołanej wysiłkiem. Być może są też inne mechanizmy odpowiedzialne za ten rodzaj kardioprotekcji, jednak wymaga to przeprowadzenia dalszych badań w tym zakresie. W niniejszej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na ten temat.

Słowa kluczowe: hartowanie serca treningiem fizycznym, mechanizmy hartowania wysiłkiem

Abstract

The findings from experimental animal studies show that regular physical trainings can protect via preconditioning the heart against the ischaemia-reperfusion (IR) injury. It is not clear if the cellular mechanism is the same as in the case of ischaemic preconditioning, but the final effect is the same, i.e. a stress stimulus, in this case a repeated effort leaves the heart with the 'memory', which translates into an increased resistance to ischaemia. At present, the precise mechanism responsible for training-induced cardioprotection is not clear. Candidate factors responsible for this cardioprotection are numerous and include collateral circulation development, enhanced ER stress proteins, increased COX-2 activity, increased heat shock protein (HSP-72) levels, increased activity of mitoK-ATP and sarcoK-ATP channels, and increased myocardial antioxidative capacity. The studies performed so far have suggested that MnSOD activity and increased sarcoK-ATP expression did play a role in exercise-induced cardioprotection. There may exist some other mechanisms responsible for this type of cardioprotection, but finding them will be possible only through further relevant studies. The paper presents the up-to-date knowledge in this field.

Key words: exercise-induced myocardial preconditioning, mechanisms of exercise-induced preconditioning

Kardiol Pol 2011; 69, supl. III: 75–79

Adres do korespondencji:

dr n. med. Iwona Korzeniowska-Kubacka, Klinika Rehabilitacji Kardiologicznej i Elektrokardiologii Nieinwazyjnej, Instytut Kardiologii, ul. Alpejska 42, 04–628 Warszawa, tel: +48 22 343 43 51; faks: +48 22 343 45 19, e-mail: drkubacka@wp.pl

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

WSTĘP

Już 25 lat temu Murry i wsp. [1] wykazali, że liczne, krótkie epizody niedokrwienia mogą chronić serce przed kolejnym długim epizodem niedokrwienia. Zjawisko to nazwali *ischemic preconditioning*, czyli hartowanie niedokrwieniem. Jego występowanie potwierdzono w przypadku bólów wieńcowych poprzedzających wystąpienie zawału serca (MI) (*preinfarction angina*), zmniejszenia wysiłkowych dolegliwości dławicowych podczas wysiłku kontynuowanego mimo ich wystąpienia (*warm up angina*) oraz w trakcie zabiegów przezskórnej angioplastyki wieńcowej i pomostowania aortalno-wieńcowego [2]. Mniej inwazyjnym sposobem hartowania mięśnia sercowego, i być może jedynym skutecznym klinicznie, może być hartowanie wysiłkiem fizycznym. Nie jest pewne, czy mechanizm komórkowy jest dokładnie ten sam co w przypadku hartowania niedokrwieniem, ale ostateczny efekt jest identyczny — bodziec stresowy, w tym przypadku powtarzany wysiłek, pozostawia w sercu „pamięć” przekładającą się na zwiększoną odporność na niedokrwienie. Bezpośrednich dowodów świadczących o możliwości hartowania mięśnia sercowego poprzez trening fizyczny dostarczają jedynie badania eksperymentalne na zwierzętach. Ich wyniki wskazują na to, że regularne ćwiczenia mogą ochronić, zahartować serce przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym (IR, *ischaemia-reperfusion*).

KARDIOPROTEKCYJNA ROLA REGULARNEJ AKTYWNOŚCI FIZYCZNEJ U LUDZI

Dotychczas nie ma dowodów świadczących bezpośrednio o możliwości hartowania serca przed uszkodzeniem IR. Dowodów pośrednich dostarczają badania epidemiologiczne. W ponad 40 badaniach obserwacyjnych i epidemiologicznych wykazano odwrotną zależność między aktywnością fizyczną a ryzykiem choroby niedokrwiennej serca. Wśród tych badań znajduje się ponad 100 opublikowanych raportów, z których prawie 75% potwierdza odwrotną zależność między aktywnością fizyczną i dobrą sprawnością fizyczną a ryzykiem wystąpienia MI. Metaanalizy dowodzą, że wśród osób uczestniczących w tych badaniach, prowadzących siedzący tryb życia, stwierdzono 2-krotnie większą częstość zgonów z powodu choroby niedokrwiennej serca, w porównaniu z uczestnikami bardziej aktywnymi fizycznie. Natomiast najmniej sprawne fizycznie osoby były narażone na ok. 5-krotnie większe ryzyko zgonu z powodu choroby niedokrwiennej serca w porównaniu z osobami o największej sprawności fizycznej. Na podstawie tych danych ustalono, że jest konieczna co najmniej 30-minutowa umiarkowana aktywność fizyczna, najlepiej codziennie lub przez większą część tygodnia. A zatem regularne ćwiczenia fizyczne mogą stanowić swoistą fizjologiczną „polisę ubezpieczeniową” przeciwko uszkodzeniu IR [3].

ROLA KRÓTKO- I DŁUGOTERMINOWYCH ĆWICZEŃ W KARDIOPROTEKCJI

W badaniach eksperymentalnych wykazano, że ćwiczenia wytrzymałościowe zwiększają tolerancję na niedokrwienie u zwierząt obojga płci [4–6]. Trening wytrzymałościowy zwiększa zdolność do wykonywania wysiłku zarówno submaksymalnego, jak i maksymalnego, co objawia się zdolnością do dłuższego wykonywania ćwiczeń przy podobnym obciążeniu. Poprawa wytrzymałości jest spowodowana większą dostępnością tlenu do ćwiczących mięśni, większym udziałem procesów tlenowych, wzrostem ilości glikogenu w mięśniach, mniejszym stężeniem mleczanów, podwyższeniem progu dla przemian beztlenowych oraz mniejszym iloczynem częstotliwości rytmu serca i ciśnienia tętniczego dla określonego wysiłku fizycznego, co sugeruje mniejsze zapotrzebowanie mięśnia sercowego na tlen dla danego poziomu pracy [3]. Interesujące jest to, że niektórzy badacze wykazali, iż krótkie treningi, przez 3–5 kolejnych dni powodują taką samą kardioprotekcję jak treningi długoterminowe (tygodnie, miesiące) [5]. W badaniu Demirela i wsp. [7] porównano zwierzęta z 3 grup: kontrolnej, ćwiczącej przez 3 i 5 kolejnych dni 60 min dziennie na bieżni. Serca zwierząt były poddawane *in vivo* protokołowi IR, czyli uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnemu w warunkach eksperymentu. Zwierzęta (szczury) były znieczulane, wentylowane mechanicznie, a następnie poddane torakotomii. Dokonywano okluzji gałęzi przedniej zstępującej lewej tętnicy wieńcowej przez 30 min, po której następował 30-minutowy okres reperfuzji. Badano funkcję mięśnia sercowego zwierząt w okresie niedokrwienia i reperfuzji. U zwierząt ćwiczących z obu grup występowała lepsza funkcja mięśnia sercowego (wyższe ciśnienie wewnątrzkomorowe) w czasie protokołu IR, w porównaniu z grupą kontrolną [7]. Natomiast Bowles i Starnes [8] wykazali, że serca izolowane ze zwierząt, które trenowały 5 dni w tygodniu przez 11–16 tygodni, charakteryzowały się lepszą kurczliwością i mniejszą sztywnością rozkurczową lewej komory po globalnym niedokrwieniu, w porównaniu ze zwierzętami, które nie trenowały. Z kolei w badaniach Powersa i wsp. [6] zwierzęta trenowały 4 dni w tygodniu przez 10 tygodni na bieżni i były poddane protokołowi IR. Wykazano, że długoterminowy trening spowodował poprawę wydolności mięśnia sercowego u zwierząt poddanych niedokrwieniu i reperfuzji.

ROLA INTENSYWNOŚCI ĆWICZEŃ W KARDIOPROTEKCJI

Intensywność wysiłku może być zdefiniowana w kategoriach bezwzględnych i względnych. Bezwzględne natężenie wysiłku odzwierciedla szybkość wydatkowania energii podczas wysiłku i jest zwykle wyrażana w MET-ach. Równoważnik metaboliczny MET jest jednostką spoczynkowego poboru tlenu (ok. 3,5 ml/kg/min). Względne natężenie wysiłku wyraża-

ne jest jako odsetek maksymalnej częstotliwości rytmu serca lub jako odsetek maksymalnego zużycia tlenu $VO_2\max$. Ćwiczenia o małej intensywności to ćwiczenia do 40% $VO_2\max$, średniej — 40–60% $VO_2\max$, a dużej intensywności — powyżej 60% $VO_2\max$ [3]. Nie jest jasne, czy ćwiczenia o niskiej intensywności mogą zwiększyć tolerancję mięśnia sercowego na uszkodzenie IR. Starnes i wsp. [9] trenowali szczury na bieżni z intensywnością 55–60% $VO_2\max$ 40 min dziennie, 5 dni w tygodniu przez 16 tygodni. Zwierzęta z grupy kontrolnej nie ćwiczyły. Następnie serca szczurów były wyizolowane oraz poddane niedokrwieniu i reperfuzji. Autorzy wykazali, że trening 55–60% $VO_2\max$ jest poniżej progu intensywności potrzebnej do kardioprotekcji zapobiegającej uszkodzeniu IR mięśnia sercowego. Natomiast Lennon i wsp. [10] trenowali szczury z umiarkowaną intensywnością (60 min, 55% $VO_2\max$) i wysoką intensywnością (60 min, 75% $VO_2\max$). Wyniki porównano z grupą kontrolną, która nie ćwiczyła. Serca szczurów były wyizolowane i poddane protokołowi IR. Wykazano, że grupa ćwicząca z umiarkowaną i wysoką intensywnością osiągnęła istotnie większą objętość wyrzutową i minutową serca w porównaniu z grupą kontrolną. Nie było istotnych różnic między grupami trenującymi. A zatem oba treningi spowodowały porównywalną ochronę przed uszkodzeniem IR [6].

CZAS UTRZYMYWANIA SIĘ KARDIOPROTEKCJI PO PRZERWANIU ĆWICZEŃ

W większości badań wykazano, że ćwiczenia wytrzymałościowe są kardioprotekcyjne. Jednak nie wiadomo, jak długo utrzymuje się ten kardioprotekcyjny efekt. Lennon i wsp. [10] kwalifikowali szczury do 5 grup: kontrolnej, kontynuującej ćwiczenia po 1-dniowej, 3-dniowej, 9-dniowej i 18-dniowej przerwie. Autorzy wykazali na podstawie badania stężenia enzymów antyoksydacyjnych i białek szoku termicznego HSP72, że kardioprotekcja indukowana wysiłkiem utrzymała się 9 dni od zaprzestania ćwiczeń, a po 18 dniach zanikała.

MOŻLIWE MECHANIZMY KARDIOPROTEKCJI WYWOŁANEJ TRENINGIEM FIZYCZNYM

Obecnie mechanizmy molekularne odpowiedzialne za kardioprotekcję indukowaną wysiłkiem nie są do końca poznane. Badacze skupiają się na 8 mechanizmach, które mogą odpowiadać za kardioprotekcyjny efekt ćwiczeń:

- zmiany w anatomii naczyń wieńcowych;
- indukcja białek szoku termicznego HSPs w miokardium;
- wzrost aktywności cyklooksygenazy COX-2 w mięśniu sercowym;
- wzrost białek stresu w siateczce endoplazmatycznej (SE);
- wzrost produkcji tlenu azotu;
- wzrost aktywności ATP-zależnych kanałów potasowych w mitochondriach;
- wzrost aktywności ATP-zależnych kanałów potasowych w sarkolemme;
- wzrost zdolności antyoksydacyjnej miokardium.

Zmiany w anatomii naczyń wieńcowych

Rozwój krążenia obocznego może zredukować ryzyko uszkodzenia niedokrwiennego przez podtrzymanie perfuzji mięśnia sercowego poprzez krążenie oboczne. Ćwiczenia długoterminowe (miesiące, lata) mogą przyczyniać się do rozwoju angiogenezy (modele zwierzęce). Kilkudniowe ćwiczenia również mogą spowodować kardioprotekcję, jednak obecnie nie ma dowodów na to, że rozwój krążenia obocznego występuje w pierwszych kilku dniach treningów. Zatem angiogeneza nie jest najmocniejszym argumentem w wyjaśnieniu kardioprotekcji poprzez krótkotrwały trening [11, 12].

Indukcja białek szoku termicznego HSPs w miokardium

Wiadomo, że wzrost stężenia białek szoku termicznego HSPs może chronić komórki przed różnego rodzaju stresem, w tym uszkodzeniem IR. Są dowody na to, że białka HSP27, HSP90, jak również inne HSPs, a zwłaszcza HSP72, odpowiadają za ochronę komórek przed uszkodzeniem IR. Mechanizm, przez który HSP72 chroni miokardium przed uszkodzeniem IR, jest nadal przedmiotem badań. Białka HSP72 są zaangażowane w syntezę, transport i degradację białek [13]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że nadmierna ekspresja białek HSP72 chroni serce przed uszkodzeniem IR [14]. Obecnie dobrze udokumentowano fakt, że trening fizyczny ułatwia ekspresję białek HSP72 w sercu, czego rezultatem jest 3–5-krotny wzrost stężenia tych białek pod wpływem ćwiczeń fizycznych [15]. Wyniki badań dotyczące mechanizmów tej kardioprotekcji są kontrowersyjne. Uważa się, że wzrost HSPs chroni serce przed uszkodzeniem IR poprzez zwiększenie zdolności antyoksydacyjnej. Istnieją jednak również badania, w których wykazano, że HSP72 chronią mitochondria przed uszkodzeniem IR i powodują ochronę komórki przed apoptozą [12]. Jednak w dwóch niezależnych badaniach stwierdzono, że trening może chronić przed uszkodzeniem IR, bez wzrostu stężenia HSPs. Zwłaszcza Tylor i wsp. [16] udowodnili, że kardioprotekcja wywołana wysiłkiem może być osiągnięta bez wzrostu stężenia HSP72. Również w badaniach Powersa i wsp. [12] wykazano, że indukcja białek szoku termicznego HSP10, 27, 40, 60, 72, 73 i 90 nie jest niezbędna do osiągnięcia kardioprotekcji pod wpływem wysiłku.

Wzrost aktywności cyklooksygenazy COX-2 w mięśniu sercowym

Cyklooksygenaza-2 jest enzymem uczestniczącym w biosyntezie prostaglandyn katalizującym przemianę kwasu arachidonowego do prostaglandyn. Cyklooksygenaza-2 jest indukowana przez stres komórki i uważa się, że COX-2 jest niezbędna, by osiągnąć późną fazę hartowania (HN) [17]. Ponadto postuluje się, że COX-2 indukuje syntazę tlenu azotu (iNOS, *induced nitric oxide synthase*) w szlaku ochronnym późnej fazy hartowania, ekspresja iNOS i COX-2 są zatem niezbędne do osiągnięcia korzyści kardioprotekcyjnych tej fazy hartowania [18].

W badaniach Powersa i wsp. [12] wykazano, że trening fizyczny nie powoduje wzrostu COX-2 i iNOS w sercach szczurów. Autorzy sugerują zatem, że wzrost COX-2 i/lub iNOS nie jest niezbędny do kardioprotekcji wywołanej wysiłkiem przeciwko uszkodzeniu IR. Ponadto fakt, że nie udowodniono, iż COX-2 i iNOS są niezbędne, sugeruje, że mediatory kardioprotekcji indukowanej wysiłkiem i niedokrwieniem się różnią.

Wzrost białek stresu w siateczce endoplazmatycznej

Pojawiają się wyniki badań, które wskazują, że białka stresu w SE uczestniczą w kardioprotekcji przeciwko uszkodzeniu IR. Dysfunkcja siateczki endoplazmatycznej może zapoczątkować zarówno mitochondrialną, jak i mitochondrialnie niezależną śmierć komórki [19]. Dwa białka stresu SE mogą się przyczyniać do kardioprotekcji: Grp78 i Grp94. Wykazano, że białka te chronią hodowlę kardiomiocytów przed obciążeniem wapniem i przed stresem oksydacyjnym oraz powodują zmniejszenie nekrozy i apoptozy indukowanej IR. Dlatego sugeruje się, że ekspresja białek stresu spowodowana wysiłkiem może powodować ochronę SE w czasie IR, i tym samym — warunkować kardioprotekcję indukowaną wysiłkiem [12, 20]. Natomiast Powers i wsp. [12] wykazali, że trening fizyczny nie podnosi stężenia białek stresu i nie redukuje poziomu kaspazy-12 w SE, a w związku z tym — wzrost stężenia białek stresu nie jest niezbędny do osiągnięcia kardioprotekcji wywołanej treningiem.

Wzrost produkcji tlenu azotu

Tlenek azotu odgrywa podwójną rolę — jako inicjator i mediator kardioprotekcji. Choć w kilku badaniach wykazano wzrost dostępności tlenu azotu w kardioprotekcji, to tylko w dwóch udowodniono jego wpływ na kardioprotekcję indukowaną wysiłkiem. Rezultaty tych dwóch badań są sprzeczne. Babai i wsp. [21] wykorzystali protokół IR *in vivo* i wykazali, że ćwiczenia podnoszą stężenie tlenu azotu, co może się przyczyniać do redukcji groźnej arytmii w czasie niedokrwienia. Ponadto kardioprotekcja indukowana wysiłkiem była znoszona przez inhibitor tlenu azotu, więc autorzy konkludują, że tlenek azotu jest mediatorem kardioprotekcji wywołanej wysiłkiem. Natomiast Taylor i wsp. [22] udowodnili na sercach szczurów wyprzeznaczonych *in vitro*, że kardioprotekcja indukowana wysiłkiem następowała także wtedy, gdy produkcja tlenu azotu była zablokowana. Wykorzystanie modeli zwierzęcych różnych gatunków mogło wpływać na różnice w wynikach badań. Babai i wsp. [21] używali psów *in vivo*, a Taylor i wsp. [22] — szczurów *in vitro*. Istnieje więc potrzeba przeprowadzenia dalszych badań w celu pełnego wyjaśnienia roli tlenu azotu w kardioprotekcji indukowanej wysiłkiem.

Wzrost aktywności ATP-zależnych kanałów potasowych w mitochondriach

Kanały potasowe ATP-zależne w mitochondriach (mitoK-ATP) są ważnymi mediatorami hartowania niedokrwieniem prze-

ciwko uszkodzeniu reperfuzyjnemu. Rola tych kanałów w kardioprotekcji wywołanej wysiłkiem pozostaje niewyjaśniona. Brown i wsp. [4] stwierdzili, że kanały ATP-zależne w mitochondriach nie są zasadniczym mediatorem kardioprotekcji indukowanej wysiłkiem. Z kolei Domenach i wsp. [23] wykazali, że we wczesnej fazie kardioprotekcji wywołanej wysiłkiem pośredniczą kanały mitochondrialne. Badacze używali kwasu 5-hydroksydekanowego jako specyficznego inhibitora tych kanałów. Jednak kilku autorów kwestionuje specyficzność tego związku i formułowanie wniosków na podstawie tych badań [5]. A zatem również w tej kwestii są potrzebne dalsze badania.

Wzrost aktywności ATP-zależnych kanałów potasowych w sarkolemnie

Kanały potasowe ATP-wrażliwe w sarkolemnie zostały odkryte w 1983 r. Ich rolą jest modulowanie otwarcia kanałów potasowych w odpowiedzi na czynniki aktywujące, takie jak przemijające niedokrwienie, wzrost adenozy, wzrost MgADP, jak również aktywacja kinazy proteinowej [12]. Liczni badacze udowodnili, że farmakologiczne otwarcie kanałów potasowych (sarcoK-ATP) ułatwia wypływ potasu z kardiomiocytów i powoduje kardioprotekcję w czasie uszkodzenia IR [24]. Otwarte kanały potasowe chronią komórkę mięśnia sercowego przed uszkodzeniem IR poprzez skrócenie potencjału czynnościowego, co hamuje napływ wapnia do komórki i zapobiega przetładowaniu jej wapniem [24]. Dotąd tylko Brown i wsp. [25] wykazali, że trening powoduje wzrost ekspresji kanałów potasowych sarcoK-ATP w kardiomiocytach. Ponadto dowiedli, że farmakologiczna blokada kanałów potasowych w wyizolowanych i perfundowanych sercach ogranicza korzyści wynikające z kardioprotekcji wywołanej wysiłkiem [4]. Interesujący jest fakt, że u żeńskich osobników zwierzęcych występuje większa gęstość ATP-zależnych kanałów potasowych w porównaniu z osobnikami męskimi [25]. Istnieją badania, w których wykazano, że to estrogeny mogą wpływać na ekspresję tych kanałów [6].

Wzrost zdolności antyoksydacyjnej miokardium

Badacze sugerują, że korzyści kardioprotekcyjne z ćwiczeń mogą przynajmniej częściowo spowodować redukcję produkcji wolnych rodników tlenowych i wzrost zdolności antyoksydacyjnej mięśnia sercowego [7, 10]. Istnieją dowody na to, że wysiłek uruchamia enzymy antyoksydacyjne, które przyczyniają się do kardioprotekcji. W związku z tym zarówno krótko-, jak i długoterminowy trening przyczynia się do wzrostu zdolności antyoksydacyjnej, która odgrywa kluczową rolę w osiągnięciu kardioprotekcji spowodowanej uszkodzeniem IR [5]. Kardiomiocyty zawierają sieć systemów antyoksydacyjnych, które zmniejszają nasilenie zmian spowodowanych wolnymi rodnikami tlenowymi. Podstawową linię obrony stanowią manganowa dyzmutaza ponadtlenkowa (MnSOD), peroksydaza glutationu i katalaza. Wielu badaczy zajęło się wpływem treningu wytrzymałościowego na endogenne en-

zymy antyoksydacyjne; uzyskane przez nich wyniki są sprzeczne. Jedne wykazały, że trening wytrzymałościowy powoduje wzrost zdolności antyoksydacyjnej mięśnia sercowego (39 publikacji), z kolei inni badacze nie stwierdzili tego efektu (46 publikacji) [5]. Być może było to spowodowane różnicami metodologicznymi tych badań, włączając w to intensywność treningu, czas trwania, biochemiczne techniki użyte do analiz, różnice gatunkowe oraz czas od ostatniej sesji treningowej do uzyskania tkanek do badań. Ponadto kardiomiocyty posiadają też inne systemy enzymatyczne (thio-redoxin, glutaredoxin, peroxiredoxin), uczestniczące w reakcjach na stres oksydacyjny [5]. A zatem systemy antyoksydacyjne w mięśniu sercowym są złożone i istnieje potrzeba dalszych badań, by ustalić, czy wszystkie, czy tylko niektóre spośród nich mogą przyczyniać się do kardioprotekcji spowodowanej treningiem fizycznym.

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach osiągnięto znaczący postęp w określaniu mechanizmów odpowiedzialnych za kardioprotekcję spowodowaną treningiem fizycznym. Jednak wiele pytań z tego zakresu nadal pozostaje bez odpowiedzi i wymaga przeprowadzenia dalszych badań. W dotychczasowych badaniach eksperymentalnych wykazano, że regularne dawki ćwiczeń chronią serce przed uszkodzeniem IR na wszystkich etapach, łącznie z MI. Obecnie precyzyjny mechanizm odpowiedzialny za kardioprotekcję indukowaną treningiem nie jest jasny. Rozważa się licznych kandydatów tej kardioprotekcji. Na podstawie dotychczasowych badań spośród tych mechanizmów sugeruje się, że wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, w tym MnSOD, i wzrost ekspresji sarcoK-ATP odgrywają ważną rolę w kardioprotekcji wywołanej wysiłkiem. W ostatnio przeprowadzonych badaniach wykazano, że mitochondria uczestniczą w adaptacji biochemicznej serca, w odpowiedzi na trening wytrzymałościowy, prowadząc do zmniejszenia podatności kardiomiocytów na apoptozę spowodowaną wolnymi rodnikami tlenowymi. Jednak mechanizmy zachodzące w mitochondriach pozostają nieznane i wymagają dalszych badań [5]. Nadal nie wiadomo, czy hartowanie niedokrwieniem i hartowanie wysiłkiem fizycznym to wynik tego samego endogennego mechanizmu kardioprotekcyjnego. Mechanizmy I i II fazy hartowania niedokrwieniem są dość dobrze poznane. Wydaje się, że dla II fazy protekcji ważne są iNOS, COX-2 i enzymy antyoksydacyjne. Na podstawie dotychczasowych badań eksperymentalnych udział iNOS i COX-2 w hartowaniu wysiłkiem jest kontrowersyjny, natomiast wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych jest wspólny dla obu form kardioprotekcji. Być może istnieje też inne mechanizmy odpowiedzialne za ten rodzaj kardioprotekcji, jednak wymaga to przeprowadzenia dalszych badań w tym zakresie.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA et al. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986; 74: 1124–1136.
2. Kopff A, Drożdż J. Hartowanie mięśnia sercowego. *Forum Kardiol*, 2003; 8: 11–17.
3. Fletcher GF, Balady GJ, Amsterdam EA et al. Exercise standarts for testing and training. A statement for healthcare professionals. From the American Heart Association. *Circulation*, 2001; 104: 1694–1740.
4. Brown DA, Chicco AJ, Jew KN et al. Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial isoform of the KATP channel in rat. *J Physiol*, 2005; 569: 913–924.
5. Kavazis AN. Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med*, 2009; 39: 923–935.
6. Powers SK, Demirel HA, Vincent HK et al. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol*, 1998; 275: R1468–R1477.
7. Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA et al. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol*, 2001; 91: 2205–2212.
8. Bowles DK, Starnes JW. Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart. *J Appl Physiol*, 1994; 76: 1608–1614.
9. Starnes JW, Tylor RP, Ciccolo JT. Habitual low-intensity exercise does not protect against myocardial dysfunction after ischemia in rats. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2005; 12: 169–174.
10. Lennon SL, Quindry J, Hamilton KL et al. Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *J Appl Physiol*, 2004; 96: 1299–1305.
11. Laughlin MH, Oltman CL, Bowles DK et al. Exercise training-induced adaptation in the coronary circulation. *Med Sci Sports Exerc*, 1998; 30: 352–360.
12. Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biol Med*, 2007; 44: 93–201.
13. Powers SK, Locke M, Demirel HA. Exercise, heat shock proteins and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc*, 2001; 33: 386–392.
14. Suzuki K, Murtuza B, Sammut IA et al. Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial I-R injury associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation*, 2002; 106: 1270–1276.
15. Demirel HA, Hamilton KL, Shanely RA et al. Age and attenuation of exercise-induced myocardial HSP72 accumulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 285: H1609–H1615.
16. Taylor RP, Harris MB, Starnes JW. Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am J Physiol*, 1999; 276: H1098–H1102.
17. Bolli R. Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007; 292: H19–H27.
18. Adderley SR, Fitzgerald DJ. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 1999; 274: 5038–5046.
19. Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death Differ*, 2006; 13: 374–384.
20. Vitadello M, Penzo D, Petronilli V et al. Overexpression of the stress protein Grp94 reduces cardiomyocyte necrosis due to calcium overload and simulated ischemia. *FASEB J*, 2003; 17: 923–925.
21. Babai L, Szigeti Z, Parrat JR et al. Delayed cardioprotective effects of exercise in dogs are aminoguanidine sensitive: possible involvement of nitric oxide. *Clin Sci*, 2002; 102: 435–445.
22. Taylor RP, Olsen ME, Starnes JW. Improved postischemic function following acute exercise is not mediated by nitric oxide synthase in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007; 292: H601–H607.
23. Domenach R, Macho P, Schwarze H et al. Exercise-induced early and late preconditioning in dogs. *Cardiovasc Res*, 2002; 55: 561–566.
24. Venditti P, Di Meo S. Antioxidants tissue damage and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys*, 1996; 331: 63–68.
25. Brown DA, Lynch JM, Armstrong CJ et al. Susceptibility of the heart to ischemia-reperfusion injury and exercise induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *J Physiol*, 2005; 564: 619–630.

Hartowanie serca w kardiologii

Conditioning the heart in cardiac surgery

Marek A. Deja, Marcin Malinowski

II Katedra i Klinika Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Streszczenie

Zabieg kardiologiczny wiąże się z uszkodzeniem niedokrwiennie-reperfuzyjnym mięśnia sercowego. Wzbudzenie mechanizmów endoprotekcyjnych, takich jak hartowanie niedokrwiennie, hartowanie reperfuzyjną i hartowanie na odległość, wydaje się oczywistym kierunkiem działań zmierzających do ochrony mięśnia sercowego w trakcie operacji. Niemniej mimo niemal 20 lat, jakie minęły od pierwszej próby planowego hartowania mięśnia sercowego w kardiologii, mechanizmy te nie doczekały się powszechnego zastosowania klinicznego. Wyniki uzyskiwane przez różnych autorów są dość rozbieżne, a czasem wręcz sprzeczne. W niniejszej pracy streszczono próby klinicznego wykorzystania hartowania w kardiologii, w tym próby farmakologicznego wzbudzenia oporności na szkodę niedokrwiennie-reperfuzyjną.

Słowa kluczowe: kardiologia, niedokrwienie/reperfuzyja, hartowanie niedokrwiennie, hartowanie reperfuzyjną, hartowanie na odległość, hartowanie farmakologiczne

Abstract

Cardiac surgery is associated with ischaemic and reperfusion injury to the myocardium. It seems natural to seek a possibility of inducing the natural endoprotective mechanisms known as myocardial conditioning, including preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. Still, in spite of almost 20 years of research in the field, we are far from routine widespread usage of these methods, with published reports describing quite various, and often contradictory results. Current review summarises the trials of using the conditioning in cardiac surgical practice including pharmacological manipulations to induce resistance to ischaemia-reperfusion.

Key words: cardiac surgery, ischaemia/reperfusion, ischaemic preconditioning, ischaemic postconditioning, remote preconditioning, pharmacological preconditioning

Kardiol Pol 2011; 69, supl. III: 80–84

WSTĘP

W ciągu ostatnich 20 lat poznano liczne mechanizmy endoprotekcyjne zwane hartowaniem (*conditioning*), czyli metody wzbudzania naturalnej odporności na szkodę niedokrwiennie-reperfuzyjną w mięśniu sercowym [1]. Są to kolejno: hartowanie niedokrwiennie (*ischaemic preconditioning*), zarówno ostre, jak i opóźnione (SWOP, *second window of preconditioning*), hartowanie reperfuzyjną (*ischaemic postconditioning*) oraz hartowanie na odległość (*remote ischaemic preconditioning*). Są to mechanizmy ogólnoustrojowe, dotyczące nie tylko serca, ale również wielu innych narządów (mózgu, nerek, wątroby, jelit itp.).

Chociaż hartowanie jest podstawowym zjawiskiem fizjologicznym i daje się je wywołać eksperymentalnie u człowieka, jak dotąd nie znalazło ono powszechnego zastosowania w warunkach klinicznych. W wypadku zawału serca oczywista trudność polega na tym, że pacjent może zostać poddany interwencji dopiero po zróżnicowanie długim okresie trwania niedokrwienia. Zastosowanie mogą mieć więc jedynie strategie oparte na hartowaniu przez reperfuzyjną i ewentualnie hartowaniu przez reperfuzyjną na odległość.

Wydaje się natomiast, że interwencje, w trakcie których wywołuje się planowo okres niedokrwienia i reperfuzyj, takie jak przezskórna plastyka wieńcowa, a przede wszystkim za-

Adres do korespondencji:

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

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

bieg kardiologiczny, mogą być bardzo dobrym celem działań ochronnych opartych na zjawiskach hartowania — mechanicznego czy farmakologicznego. Trzeba jednak pamiętać, że uszkodzenie mięśnia sercowego w trakcie operacji kardiologicznych wiąże się nie tylko ze szkodą niedokrwienno-reperfuzyjną, ale również z innymi czynnikami, jak embolizacja naczyń wieńcowych czy uszkodzenie mechaniczne związane z manipulacjami w trakcie operacji. W praktyce kardiologicznej obecnie stosuje się metody ochronne oparte głównie na stosowaniu kardioplegii. Należałoby więc wykazać, że zastosowanie działań ochronnych opartych na hartowaniu doprowadzi do dalszego zmniejszenia uszkodzenia w porównaniu z dotychczas używanymi technikami.

HARTOWANIE NIEDOKRWIENIEM

W 1993 r. Yellon i wsp. [2] po raz pierwszy wykazali możliwość hartowania niedokrwieniem w operacjach kardiologicznych. Spośród 14 pacjentów poddanych pomostowaniu naczyń wieńcowych u 7 wywoływali hartowanie za pomocą dwóch 3-minutowych okresów niedokrwienia (zaklepowania aorty) z 2-minutową reperfuzyją. W grupie kontrolnej temu okresowi odpowiadało 10 min krążenia pozaustrojowego bez klemowania aorty. Następnie wykonywano zespolenie wieńcowe w trakcie 10-minutowego okresu zaklepowania aorty z wywołanym elektrycznie migotaniem komór. U wszystkich pacjentów 3-krotnie wykonywano biopsję ściany przedniej mięśnia sercowego: na początku, po okresie hartowania oraz po zaklepowaniu. Zawartość ATP w mięśniu sercowym po 10 min zaklepowania była 2-krotnie wyższa w grupie poddanej hartowaniu [2].

W tej samej grupie wykazano, że taki sam protokół hartowania skutkowało także obniżeniem stężenia troponiny T w surowicy, w okresie pooperacyjnym u pacjentów poddanych rewaskularyzacji naczyń wieńcowych (różnica była statystycznie dopiero 72 h po operacji) [3].

Również inni autorzy wykazali, że hartowanie przez niedokrwienie prowadzi do zmniejszenia uwalniania troponiny przez mięsień sercowy w następstwie operacji rewaskularyzacji naczyń wieńcowych z zastosowaniem techniki przerywanego zaklepowania, z migotaniem komór, i to zarówno w normotermii, jak i umiarkowanej hipotermii [4].

Teoh i wsp. [5] wykazali również przewagę hartowania przez niedokrwienie nad kardioplegią krystaliczną typu St Thomas 2, gdy chodzi o uwalnianie troponiny T. Nie dokonano jednak takich porównań z kardioplegią krwistą.

W piśmiennictwie można znaleźć rozbieżne wyniki dotyczące korzyści z zastosowania hartowania przez niedokrwienie jako dodatkowej ochrony mięśnia sercowego opartej na kardioplegii. Liczne doniesienia na temat korzyści z zastosowania hartowania niedokrwieniem w postaci 2 cykli 2 min niedokrwienia z 3-minutową reperfuzyją przed pomostowaniem naczyń wieńcowych, z zastosowaniem zimnej, krwistej, przerywanej kardioplegii pochodzą z Uniwersytetu Tam-

pere w Finlandii. Wu i wsp. [6] wykazali, że hartowanie poprawia czynność prawej i lewej komory [7] po zabiegu operacyjnym, a także zmniejsza częstość występowania komorowych zaburzeń rytmu (VT/VF) [8] oraz migotania przedsionków [9], i to zarówno bezpośrednio po operacji, jak również 24 h później, co może sugerować indukcję drugiego okna kardioprotekcji. Hartowanie nie prowadziło jednak do zmniejszenia uwalniania troponiny I czy CK-MB.

Wielokierunkowe działanie ochronne hartowania niedokrwieniem (2 × 2 min niedokrwienia/3 min reperfuzyji) opisała również grupa z Chin [10]. Prace tych badaczy są o tyle ciekawe, że dotyczą pacjentów poddawanych operacjom wielozastawkowym, ze zdecydowanie dłuższym (śr. 110 min) czasem niedokrwienia niż w wypadku rewaskularyzacji serca. Badacze ci wykazali, że 2 cykle 2-minutowego niedokrwienia i 3-minutowej reperfuzyji przed zaklepowaniem aorty z zastosowaniem zimnej kardioplegii krystalicznej poprawiają kurczliwość mięśnia sercowego, zwiększają zawartość ATP w mięśniówce i zmniejszają uwalnianie CK-MB w okresie pooperacyjnym.

W piśmiennictwie można znaleźć również prace wskazujące na brak jakichkolwiek pozytywnych efektów hartowania niedokrwieniem w trakcie zabiegów kardiologicznych, a nawet ostrzegające przed możliwymi negatywnymi skutkami hartowania. Na przykład, brak korzyści ze stosowania hartowania (3 min niedokrwienia/2 min reperfuzyji oraz 5 min niedokrwienia/5 min reperfuzyji) obserwowały grupy z Francji [11] i Finlandii [12]. W obu wypadkach stwierdzono wręcz tendencję do wyższych stężeń enzymów sercowych (CK-MB, troponina T) w surowicy krwi w okresie pooperacyjnym w wyniku hartowania. Charakterystyczne jest, że w obu tych doniesieniach stosowano ciągłą, krwistą, ciepłą kardioplegię jako metodę ochrony mięśnia sercowego, co może oznaczać, że uraz niedokrwienno-reperfuzyjny, związany z zaklepowaniem aorty, w obu badaniach był dość niewielki.

Niewątpliwie rozbieżności w obserwowanych (lub nieobserwowanych) efektach hartowania przez niedokrwienie w trakcie zabiegów kardiologicznych w różnych doniesieniach mogą wynikać z różnorodności stosowanych metod ochrony mięśnia sercowego (przerywane zaklepowanie v. kardioplegia) oraz odmiennych protokołów samej kardioplegii (ciepła v. zimna, krwista v. krystaliczna, ciągła v. przerywana), jak i z faktu, że stosowane protokoły hartowania różnią się między badaniami. Ponadto istnieją doniesienia, że samo zastosowanie krążenia pozaustrojowego może wzbudzić ochronę opartą na mechanizmach typowych dla hartowania [13]. Dlatego też dalsze hartowanie serca, na krążeniu pozaustrojowym, może nie być możliwe.

Ochronny efekt hartowania niedokrwieniem w zabiegach pomostowania naczyń wieńcowych bez krążenia pozaustrojowego wykazała grupa z Uniwersytetu Tampere w Finlandii. Hartowanie obejmowało 2 cykle zamknięcia tętnicy zstępującej przedniej na 2 min z 3-minutową reperfuzyją [14]. Grupa ta wielokrotnie badała hartowanie niedokrwieniem, również

w zabiegach w krążeniu pozaustrojowym z użyciem zimnej, przerywanej, krwistej kardioplegii [6–9], ale jedynie w zabiegach bez krążenia autorzy wykazali — oprócz poprawy kurczliwości — istotny spadek stężenia uwolnionej po operacji troponiny I i tendencję do niższych stężeń CK-MB.

W 2008 r. opublikowano metaanalizę badań dotyczących hartowania niedokrwieniem w kardiologii [15]. Wszystkie randomizowane badania dostępne w piśmiennictwie, dotyczące hartowania, skupiały się na udowodnieniu słuszności koncepcji i jako główne punkty końcowe wybierano w nich głównie parametry biochemiczne lub czynnościowe. W metaanalizie skupiono się na klinicznych punktach końcowych. W następstwie analizy wyników 22 badań obejmujących 933 pacjentów stwierdzono, że hartowanie niedokrwieniem prowadzi do znaczącego zmniejszenia liczby arytmii komorowych (OR: 0,11; 95% CI: 0,04–0,29), zapotrzebowania na leki inotropowe (OR: 0,34, 95% CI: 0,17–0,68) i skrócenia pobytu na oddziale intensywnej terapii pooperacyjnej (o średnio 3 h; 95% CI: 4,6–1,5 h). Efekty dotyczyły pacjentów operowanych z zastosowaniem kardioplegii, ale nie chorych operowanych z użyciem przerywanego zaklemowania aorty z migotaniem komór.

Warto też zwrócić uwagę, że technika przerywanego zaklemowania aorty z migotaniem komór najpewniej sama w jakimś stopniu wykorzystuje zjawisko hartowania niedokrwieniem. Pierwsze zaklemowanie aorty prowadzi do znacznego spadku wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, ale przy kolejnych zaklemowaniach stężenie ATP spada tylko nieznacznie i nie występuje ogłuszenie. Można również wykazać na modelu zwierzęcym, że efekt ochronny przerywanego zaklemowania aorty daje się zablokować inhibitorami kinazy białkowej C i antagonistami mitochondrialnego kanału K_{ATP} , które są typowymi pośrednikami procesu hartowania [16].

Brak powszechniejszego zastosowania hartowania niedokrwieniem w praktyce klinicznej można tłumaczyć wieloma czynnikami. Po pierwsze, chirurdzy niechętnie stosują protokół formalnego hartowania przez niedokrwienie, gdyż przedłuża on operację i krążenie pozaustrojowe. Po drugie, inwazyjne hartowanie przez klemowanie i odklemowywanie aorty wywołuje dodatkowe ryzyko powikłań zatorowych. Po trzecie, na podstawie dotychczasowych doniesień trudno ustalić jednoznacznie właściwy protokół hartowania (długość okresu niedokrwienia i reperfuzji, liczba powtórzeń), a zarówno zbyt łagodny, jak i za bardzo nasilony bodziec hartujący mogą nie skutkować dodatkową ochroną. W końcu, „dodatkowa korzyść” może nie być łatwo osiągalna przy zastosowaniu współczesnych metod ochrony mięśnia sercowego. Ponadto wzięte anestetyki mogą same wywierać działanie hartujące, uniemożliwiając jego dalsze nasilenie. Warto też pamiętać, że istnieje wiele wątpliwości co do możliwości hartowania mięśnia sercowego w starszym wieku czy u osób płci żeńskiej, co budzi liczne zastrzeżenia dotyczące sensowności stosowania hartowania śródoperacyjnie.

HARTOWANIE FARMAKOLOGICZNE

Zastrzeżenia dotyczące inwazyjnej natury śródoperacyjnego „mechanicznego” hartowania niedokrwieniem skutkowało poszukiwaniem innych możliwości hartowania mięśnia sercowego. Jedną z nich jest hartowanie farmakologiczne. Polega ono na stosowaniu środków, o których wiadomo, że stymulują poszczególne ogniwa szlaków sygnałowych związanych z hartowaniem niedokrwieniem, a ich stosowanie *in vitro* czy na modelach zwierzęcych wywołuje stan odporności na szkodę niedokrwienno-reperfuzyjną, naśladujący skutki klasycznego hartowania.

Jednym z pierwszych środków badanych pod kątem możliwości wywołania hartowania farmakologicznego w trakcie operacji kardiologicznej była adenozyzna. W 1995 r. przeprowadzono małe randomizowane badanie w grupie 14 pacjentów z frakcją wyrzutową ok. 30%, poddanych pomostowaniu naczyń wieńcowych w trójnaczyńniowej chorobie wieńcowej [17]. Siedmiu pacjentów otrzymało wlew adenozyzny 250–350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ przez 10 min, poprzedzających krążenie pozaustrojowe; wszyscy otrzymali zimną, przerywaną, krwistą kardioplegię. Pacjenci hartowani wlewem adenozyzny po operacji charakteryzowali się lepszym wskaźnikiem sercowym i uwolniło się u nich znacznie mniej CPK w ciągu pierwszych 24 h po operacji. Efekty te zostały następnie potwierdzone przez innych badaczy. Mentzer i wsp. [18] przeprowadzili badanie, w którym zrandomizowali 253 osób do 3 grup: otrzymującej zimną, krwistą kardioplegię bez dodatków, z dodatkiem 500 μM adenozyzny i wzbogaconą 2 mM adenozyzny. Pacjentom otrzymującym wzbogaconą kardioplegię podano dodatkowo wlew adenozyzny 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 10 min przed zaklemowaniem aorty i 15 min po jej odklemowaniu. Autorzy wykazali, że wysoka dawka adenozyzny była związana z mniejszą liczbą złożonego punktu końcowego (zgon lub zawał albo IABP bądź użycie adrenaliny lub użycie wysokiej dawki dopaminy w okresie pooperacyjnym) [18]. Niestety, podawanie wysokich stężeń adenozyzny wiązało się z dużymi spadkami ciśnienia tętniczego, co utrudniało jej stosowanie.

W celu uniknięcia zaburzeń hemodynamicznych próbowano zastąpić adenozyznę agonistą receptora adenozyzny A1, jednak nie wykazano korzyści z jego zastosowania [19]. W dużym badaniu klinicznym Mangano i wsp. [20] zrandomizowali 2698 osób poddanych pomostowaniu aortalno-wieńcowemu w 54 ośrodkach, między placebo a wlewem akadezyzny (modulator endogennej adenozyzny) przez 7 h, wraz z jej dodaniem do kardioplegii. Pacjenci, którzy otrzymali akadezyznę, odnieśli korzyść tylko wówczas, jeżeli wystąpił u nich zawał okołoperacyjny. Akadezyzna zmniejszyła śmiertelność w tej podgrupie z 27,8% do 6,5%.

Innym autakoidem, który jest mimetykiem hartowania, a usiłowano go zastosować w praktyce, jest bradykinina. Grupa z Uniwersytetu Tampere w Finlandii [21] w badaniach, w których pacjentom przed krążeniem pozaustrojowym podawa-

no 7-minutowy wlew bradykininy (25 μg), wykazała, że obniżała ona pooperacyjne stężenie CK-MB (ale nie troponiny I), nie wpływając równocześnie na poprawę czynności serca po operacji. Na podstawie zmniejszenia stosunku stężeń IL-8 do IL-10 autorzy wywnioskowali, że bradykinina obniżała reakcję zapalną po operacji. Równocześnie zaobserwowano znaczące spadki ciśnienia tętniczego, które były związane z podawaniem bradykininy.

Ta sama grupa zastosowała również diazoksyd (domniemany aktywator mitochondrialnego kanału K_{ATP}) w dawce 1,5 mg/kg w ciągu 5 min z 5-minutowym okresem wypłukania dożylnie przed krążeniem pozaustrojowym, wykazując poprawę czynności serca w okresie pooperacyjnym, bez obniżenia stężenia CK-MB [22] oraz efekt przeciwwzrostowy (obniżenie stosunku IL-6 do IL-10 oraz IL-8 do IL-10).

Również grupa autorów niniejszej pracy badała możliwość zastosowania diazoksydu w ochronie mięśnia sercowego w trakcie operacji kardiologicznych. Pierwotnie ustalono optymalne stężenie ochronne diazoksydu przeciw uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnej w ludzkiej mięśniówce serca *in vitro* [23] i wykazano, że działanie protekcyjne diazoksydu jest największe, gdy stosuje się go w trakcie niedokrwienia [24]. Działanie to, jak się wydaje, zależy nie tylko od aktywacji mitochondrialnych kanałów K_{ATP} [24]. Następnie przeprowadzono randomizowaną próbę kliniczną w grupie 40 chorych, stosując w niej diazoksyd jako dodatek do ciepłej, przerywanej, krwistej kardioplegii w stężeniu 100 μM [25]. Takie zastosowanie diazoksydu nie wywoływało zaburzeń hemodynamicznych. W grupie leczonej diazoksydem zaobserwowano szybszy powrót metabolizmu tlenowego mięśnia sercowego do normy w okresie reperuzji. Stwierdzono również lepszą czynność mięśnia sercowego w okresie pooperacyjnym oraz obniżenie stężenia NT-proBNP, bez wpływu diazoksydu na niskie w obu grupach pooperacyjne stężenia CK-MB i troponiny I. W materiale biopsyjnym wykazano, że diazoksyd zapobiega obrzękowi mitochondriów, który obserwowano w grupie kontrolnej.

Lekami o szczególnej pozycji wśród mediatorów hartowania farmakologicznego są anestetyki. O ile działanie ochronne wziewnych anestetyków na mięsień sercowy — i to zarówno zapobiegające ogłuszeniu, jak i zmniejszające obszar martwicy — opisano dość dawno, o tyle dowody na to, że te efekty są związane ze szlakami typowymi dla hartowania pojawiły się znacznie później. W warunkach eksperymentalnych wykazano, że leki te mogą aktywować szlaki odpowiedzialne za hartowanie, w tym wywoływać fosforylację Akt, translokację kinazy białkowej C, zahamowanie mPTP, a w ich działaniu ochronnym rolę odgrywają wolne rodniki tlenowe. Wyniki wielu prac dostępnych w piśmiennictwie są sprzeczne. W części z nich wskazano na zmniejszanie uwalniania markerów martwicy mięśnia sercowego, a w innych — tylko na poprawę czynności mięśnia sercowego w okresie

pooperacyjnym [26]. Metaanaliza 32 badań klinicznych (2841 pacjentów) potwierdziła, że sewofluran i desfluran obniżają stężenie troponiny I po zabiegach pomostowania aortalno-wieńcowego w porównaniu ze znieczuleniem dożylnym. Jednak nie udało się wykazać statystycznie istotnego spadku śmiertelności czy liczby zawałów okołoperacyjnych, jak również poprawy w zakresie innych, klinicznie istotnych punktów końcowych [27].

HARTOWANIE NA ODLEGŁOŚĆ

Jeszcze inną metodą, która pozwala uniknąć hartowania jako inwazyjnej procedury związanej z klemowaniem i odklepowaniem aorty, jest hartowanie na odległość. Zjawisko to pozwala na wywołanie odporności na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne wskutek przejściowego niedokrwienia odległego narządu, takiego jak nerka, jelito czy kończyna. Chociaż mechanizm, w którym dochodzi do hartowania odległego narządu, nie jest jasny, wiadomo, że uczestniczą w nim te same przekaźniki co w klasycznym hartowaniu niedokrwieniem. Również nie ma pewności co do sposobu przekazywania informacji z niedokrwionego narządu do odległego narządu (np. serca), który podlega hartowaniu. Postulowano obecność zarówno nerwowych, jak i humoralnych dróg przekaźnictwa.

Pierwsze zastosowanie tej metody w trakcie kardiologii miało miejsce u dzieci poddawanych zabiegom korekcyjnym [28]. Siedemnaścioro dzieci poddano hartowaniu poprzez 4 cykle po 5 min niedokrwienia kończyny dolnej (nadmuchany mankiet do pomiaru ciśnienia). Grupę kontrolną stanowiło 20 dzieci. Po operacji stwierdzono niższe stężenia troponiny I, mniejsze zapotrzebowanie na leki inotropowe i niższe opory oddechowe u dzieci poddanych hartowaniu.

Hausenloy i wsp. [29] opublikowali następnie 2 badania potwierdzające pozytywne efekty hartowania na odległość w kardiologii dorosłych. Badacze stosowali 3 cykle 5-minutowego niedokrwienia kończyny górnej u 27 pacjentów (30 stanowiło grupę kontrolną) poddanych pomostowaniu aortalno-wieńcowemu z zastosowaniem przerywanego zaklepowania aorty lub kardioplegii, wykazując ponad 40-procentowy spadek stężenia troponiny I w 72 h po zabiegu w grupie leczonej. Ta sama grupa [30] powtórzyła badanie u 45 chorych poddanych pomostowaniu aortalno-wieńcowemu z zastosowaniem zimnej, przerywanej, krwistej kardioplegii, ponownie wykazując, że hartowanie na odległość obniża stężenie troponiny w okresie pooperacyjnym.

Niedawno opublikowano wyniki większego badania randomizowanego (284 pacjentów), porównującego efekty hartowania na odległość za pomocą 3 okresów 5-minutowego niedokrwienia kończyny górnej ze standardową kardioplegią. W przeciwieństwie do wcześniejszych, mniejszych badań, nie wykazano ani mniejszego uwalniania troponiny T, ani poprawy hemodynamiki, ani lepszej funkcji nerek czy płuc pod wpływem hartowania na odległość [31].

HARTOWANIE REPERFUZJA

Jeszcze jedną metodą hartowania, którą można zastosować w trakcie zabiegu kardiologicznego, jest hartowanie reperfuzyj. W 2007 r. Luo i wsp. [32] opisali badanie u 24 dzieci operowanych z powodu tetralogii Fallota. Dzieci, u których w okresie reperfuzyj 2-krotnie zaklemowano i odklemowano aortę na okres 30 s, charakteryzowało mniejsze uszkodzenie mięśnia sercowego po operacji, potwierdzone niższym stężeniem troponiny T i CK-MB oraz mniejszym zapotrzebowaniem na leki inotropowe. Ta sama grupa badaczy [33] w 2 innych badaniach wykazała mniejsze zapotrzebowanie na leki inotropowe i niższe uwalnianie enzymów sercowych u dzieci poddanych operacji wad wrodzonych z użyciem zimnej, krwistej kardioplegii oraz u dorosłych poddanych operacjom wad zastawkowych z użyciem takiej samej protekcji [34].

PODSUMOWANIE

W wielu badaniach wykazano możliwość zastosowania różnych form hartowania w trakcie zabiegów kardiologicznych. Jednocześnie części badaczy nie udało się potwierdzić klinicznie istotnego efektu hartowania. Jeden z problemów może polegać na tym, że badania zazwyczaj są prowadzone u pacjentów z grup niskiego ryzyka, gdzie obecnie stosowane metody kardioprotekcji zapewniają bardzo dobre wyniki kliniczne. Możliwe, że grupą, która może odnieść największe korzyści z zabiegów hartowania, są pacjenci poddawani bardziej złożonym i długotrwałym zabiegom, a także chorzy z podwyższonym ryzykiem oraz operowani w ostrym zespole wieńcowym czy poddawani reperacjom. Należy więc przeprowadzić duże badania randomizowane u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka, jeśli hartowanie w zabiegach kardiologicznych ma znaleźć swoje miejsce w praktyce klinicznej jako wartościowa metoda postępowania, a nie tylko ciekawostka znamienne przedłużająca i komplikująca zabieg, nieznacznie wpływająca na wymierne efekty operacji.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

- Bereświcz A. Endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne — co to takiego i jak to działa? *Kardiologia Pol*, 2011; 69 (supl. III): 59–66.
- Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*, 1993; 342: 276–277.
- Jenkins DP, Pugsley WB, Alkhulaifi AM et al. Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Heart*, 1997; 77: 314–318.
- Szmagala P, Morawski W, Krejca M et al. Evaluation of perioperative myocardial tissue damage in ischemically preconditioned human heart during aorto coronary bypass surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 1998; 39: 791–795.
- Teoh LK, Grant R, Hulf JA et al. A comparison between ischemic preconditioning, intermittent cross-clamp fibrillation and cold crystalloid cardioplegia for myocardial protection during coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc Surg*, 2002; 53: 251–255.
- Wu ZK, Pehkonen E, Laurikka J et al. Ischemic preconditioning protects right ventricular function in coronary artery bypass grafting patients experiencing angina within 48–72 hours. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2002; 43: 319–326.
- Wu ZK, Tarkka MR, Pehkonen E et al. Ischaemic preconditioning has a beneficial effect on left ventricular haemodynamic function after a coro-

- nary artery bypass grafting operation. *Scand Cardiovasc J*, 2000; 34: 247–253.
- Wu ZK, Iivainen T, Pehkonen E et al. Ischemic preconditioning suppresses ventricular tachyarrhythmias after myocardial revascularization. *Circulation*, 2002; 106: 3091–3096.
- Wu ZK, Iivainen T, Pehkonen E et al. Fibrillation in patients subjected to coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003; 126: 1477–1482.
- Lu EX, Chen SX, Yuan MD et al. Preconditioning improves myocardial preservation in patients undergoing open heart operations. *Ann Thorac Surg*, 1997; 64: 1320–1324.
- Perrault LP, Menasche P, Bel A et al. Ischemic preconditioning in cardiac surgery: a word of caution. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1996; 112: 1378–1386.
- Kaukoranta PK, Lepojarvi MP, Ylitalo KV et al. Normothermic retrograde blood cardioplegia with or without preceding ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg*, 1997; 63: 1268–1274.
- Burns PG, Krukenkamp IB, Caldaroni CA et al. Does cardiopulmonary bypass alone elicit myoprotective preconditioning? *Circulation*, 1995; 92: II447–II451.
- Laurikka J, Wu ZK, Iisalo P et al. Regional ischemic preconditioning enhances myocardial performance in off-pump coronary artery bypass grafting. *Chest*, 2002; 121: 1183–1189.
- Walsh SR, Tang TY, Kullar P et al. Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2008; 34: 985–994.
- Fujii M, Chambers DJ. Myocardial protection with intermittent cross-clamp fibrillation: does preconditioning play a role? *Eur J Cardiothorac Surg*, 2005; 28: 821–831.
- Lee HT, LaFaro RJ, Reed GE. Pretreatment of human myocardium with adenosine during open heart surgery. *J Card Surg*, 1995; 10: 665–676.
- Mentzer RM, Jr., Birjiniuk V, Khuri S et al. Adenosine myocardial protection: preliminary results of a phase II clinical trial. *Ann Surg*, 1999; 229: 643–649.
- Teoh LK, Grant R, Hulf JA et al. The effect of preconditioning (ischemic and pharmacological) on myocardial necrosis following coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc Res*, 2002; 53: 175–180.
- Mangano DT, Miao Y, Tudor IC et al. Post-reperfusion myocardial infarction: long-term survival improvement using adenosine regulation with acadesine. *J Am Coll Cardiol*, 2006; 48: 206–214.
- Wei M, Wang X, Kuukasjarvi P et al. Bradykinin preconditioning in coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*, 2004; 78: 492–497.
- Wang X, Wei M, Kuukasjarvi P et al. Novel pharmacological preconditioning with diazoxide attenuates myocardial stunning in coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003; 24: 967–973.
- Deja MA, Golba KS, Kolowca M et al. Diazoxide provides protection to human myocardium in vitro that is concentration dependent. *Ann Thorac Surg*, 2004; 77: 226–232.
- Deja MA, Golba KS, Malinowski M et al. Diazoxide provides maximal KATP channels independent protection if present throughout hypoxia. *Ann Thorac Surg*, 2006; 81: 1408–1416.
- Deja MA, Malinowski M, Golba KS et al. Diazoxide protects myocardial mitochondria, metabolism, and function during cardiac surgery: a double-blind randomized feasibility study of diazoxide-supplemented cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009; 137: 997–1004.
- Venugopal V, Ludman A, Yellon DM et al. "Conditioning" the heart during surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009; 35: 977–987.
- Yu CH, Beattie WS. The effects of volatile anesthetics on cardiac ischemic complications and mortality in CABG: a meta-analysis. *Can J Anaesth*, 2006; 53: 906–918.
- Cheung MM, Kharbada RK, Konstantinov IE et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol*, 2006; 47: 2277–2282.
- Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2007; 370: 575–579.
- Venugopal V, Hausenloy DJ, Ludman A et al. Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold-blood cardioplegia: a randomised controlled trial. *Heart*, 2009; 95: 1567–1571.
- Rahman IA, Mascaro JG, Steeds RP et al. Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment? *Circulation*, 2010; 122: S53–S59.
- Luo W, Li B, Lin G et al. Postconditioning in cardiac surgery for tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007; 133: 1373–1374.
- Luo W, Li B, Lin G et al. Does cardioplegia leave room for postconditioning in paediatric cardiac surgery? *Cardiol Young*, 2008; 18: 282–287.
- Luo W, Li B, Chen R et al. Effect of ischemic postconditioning in adult valve replacement. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2008; 33: 203–208.

Czy każde serce można zahartować? Wpływ wieku i chorób współistniejących

Can any heart be preconditioned? Influence of aging and comorbidities on cardioprotection

Maria Bilińska

Klinika Zaburzeń Rytmu Serca, Instytut Kardiologii, Warszawa

Streszczenie

Krótkie epizody niedokrwienia i reperfuzji, poprzedzające dłuższe niedokrwienie i reperfuzję (hartowanie niedokrwieniem) lub zastosowane na początku reperfuzji (hartowanie reperfuzją), uruchamiają endogenny mechanizm protekcyjny uodparniający serce na negatywne skutki niedokrwienia i reperfuzji. W niniejszej pracy omówiono wpływ chorób współistniejących i wieku na zjawisko hartowania mięśnia sercowego.

Słowa kluczowe: hartowanie serca, przerost serca, niewydolność serca, cukrzyca, starzenie

Abstract

There is experimental and clinical evidence showing that brief episodes of ischaemia and reperfusion applied either prior to prolonged ischaemia (ischaemic preconditioning), or at the onset of reperfusion (postconditioning) have the ability to protect the heart against ischaemic-reperfusion injury. The aim of this review is to discuss whether this endogenous protective mechanism is effective in the aging heart and in patients with co-morbidities.

Key words: ischaemic preconditioning, cardiac hypertrophy, heart failure, diabetes, ageing

Kardiol Pol 2011; 69, supl. III: 85–88

WSTĘP

Krótkie epizody niedokrwienia i reperfuzji, poprzedzające dłuższe niedokrwienie i reperfuzję (HN, hartowanie niedokrwieniem) lub zastosowane na początku reperfuzji (HR, hartowanie reperfuzją), uruchamiają endogenny mechanizm kardioprotekcyjny uodparniający serce na negatywne skutki niedokrwienia i reperfuzji [1, 2].

Dotychczas większość publikacji dotyczy HN i pochodzi z badań eksperymentalnych, które były prowadzone wśród zdrowych zwierząt. Nieliczne prace dotyczą hartowania serc z patologią wywołaną w modelu zwierzęcym (przerost serca, cukrzyca) [3–5].

Równocześnie, patrząc na zjawisko hartowania z punktu widzenia człowieka, trzeba uwzględnić obecność wielu czynników ryzyka i chorób współistniejących, które nie tylko sprzyjają rozwojowi choroby niedokrwiennej serca (CAD), ale

mogą też zakłócać endogenną kardioprotekcję. Ideałem byłoby więc wynalezienie środków farmakologicznych, które mogłyby nie tylko naśladować, ale też wzmacniać endogenne zjawisko hartowania serca. Problem polega na tym, że wciąż słabo poznany jest molekularny mechanizm tego zjawiska. Wiadomo jedynie, że kluczową rolę w procesie HN spełniają mitochondria i że proces ten zaczyna się od pobudzenia receptorów błony komórkowej związanych z białkiem Gi przez substancje uwalniane w trakcie krótkiego niedokrwienia (adenozyna, noradrenalina, bradykinina, opioidy itp.), a dalej sygnał jest przekazywany do zlokalizowanych w błonie wewnętrznej mitochondriów kanałów potasowych zależnych od ATP (mito K_{ATP}), których aktywacja skutkuje zwiększoną produkcją wolnych rodników tlenowych (WRT) [6, 7].

Z kolei WRT, aktywując szereg kinaz białkowych, w tym kinazę C (PKC) oraz kinazy wczesnej protekcji (RISK, *reperfu-*

Adres do korespondencji:

dr n. med. Maria Bilińska, Klinika Zaburzeń Rytmu Serca, Instytut Kardiologii, ul. Alpejska 42, 04–628 Warszawa, tel: +48 22 343 44 17, faks: +48 22 343 45 20, e-mail: mbilinska@ikard.pl

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

sion injury salvage kinases), zapobiegają otwarciu tzw. megakanałów (MPTP, *mitochondrial permeability transition pore*) w reperfuzji, które mają być efektem HN.

W praktyce klinicznej HN można obserwować u pacjentów z anginą wysiłkową (*warm-up phenomenon, first effort angina*), a także u chorych poddanych angioplastyce wieńcowej (PTCA) lub operacji pomostowania tętnic wieńcowych (CABG) [7, 8].

Ponadto krótki, 24–72-godzinny wywiad bólów w klatce piersiowej (*prodromal angina*) poprzedzających dokonanie zawału serca (MI) może uruchamiać endogenne mechanizmy hartujące serce, których konsekwencją jest mniejsza śmiertelność szpitalna, a także rzadsze występowanie takich powikłań, jak niewydolność serca i wstrząs kardiogeny [9].

Pozostaje pytanie, czy można zahartować każde serce narażone na skutki niedokrwienia i jaki wpływ na uruchomienie tego zjawiska mają choroby współistniejące oraz stosowane leki.

W pracy omówiono kolejno niektóre problemy kliniczne i choroby współistniejące, mogące wpływać na endogenne zjawisko hartowania u osób z CAD: (1) przerost mięśnia sercowego; (2) pozawałowa niewydolność serca; (3) cukrzyca; (4) wiek > 65. rż.

PRZEROST MIĘŚNIA SERCOWEGO

Przerost mięśnia sercowego jest najczęściej konsekwencją nadciśnienia tętniczego, ale może także towarzyszyć innym schorzeniom, takim jak: stenoza zastawki aortalnej, MI, choroby nerek, otyłość. Obecność czynników stymulujących przerost miocytów prowadzi do zmian na poziomie molekularnym, a w konsekwencji do zmiany wielkości i kształtu serca (*cardiac remodelling*), których następstwem jest dysproporcja między grubością mięśnia a gęstością naczyń krążenia wieńcowego, co prowadzi do zmniejszenia rezerwy wieńcowej, mimo obecności drożnych tętnic nasierdziowych. Wiadomo, że obecność echokardiograficznych (ECHO) cech przerostu mięśnia sercowego (wskaźnik masy lewej komory) jest, poza wiekiem, najsilniejszym i niezależnym czynnikiem ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych, w tym zgonu z powodu CAD i nagłego zgonu, a także niewydolności serca i udaru mózgu [10, 11].

Czy zatem będąca następstwem przerostu przebudowa na poziomie molekularnym, a w konsekwencji zmiana czynności kardiomiocytów wpływa na jego zdolność do hartowania?

Z badań eksperymentalnych wynika, że przerost spowodowany przeciążeniem ciśnieniowym, prowadząc do morfologicznych i biochemicznych zmian w sercu, zwiększa podatność mięśnia na nieodwracalne uszkodzenie w czasie niedokrwienia i reperfuzji [12]. Równocześnie obniżenie wartości ciśnienia tętniczego za pomocą inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę sprzyja regresji przerostu i zwiększa odporność mięśnia sercowego na bodźce uszkadzające. Warto podkreślić, że czas utrzymywania się nadciśnienia tętniczego, a także starzenie się zwierząt mogą niezależnie wpływać na utratę zjawiska HN w modelu zwierzę-

cym. Ochronny efekt HN zaobserwowano w sercach szczurów z genetycznie uwarunkowanym nadciśnieniem, ale jedynie u zwierząt młodszych (do 7.–8. miesiąca życia) i w sercach z zachowaną funkcją kurczliwą [3, 4].

Ostatnio opublikowano pracę kliniczną, w której Takeuchi i wsp. [13] oceniali wpływ 48-godzinnego wywiadu bólów w klatce piersiowej poprzedzającego MI ściany przedniej na wielkość martwicy zawałowej u chorych z nadciśnieniem tętniczym i przerostem lewej komory. Okazało się, że efekt hartujący sygnalizowanych bólem epizodów niedokrwienych poprzedzających MI występował jedynie u chorych z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego i bez cech przerostu w badaniu ECHO.

POZAWAŁOWA NIEWYDOLNOŚĆ SERCA

Badania kliniczne potwierdzają, że przebyty MI istotnie wpływa na rokowanie u pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego [14]. Mimo powszechnie stosowanych zabiegów przywracających drożność tętnicy odpowiedzialnej za zawał występowanie niewydolności serca w tej grupie chorych systematycznie wzrasta [11]. Nasuwa się zatem pytanie, czy w sercu „pozawałowym” są zachowane endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne, które chronią je przed niekorzystnymi skutkami niedokrwienia i reperfuzji. Wiadomo obecnie, że konsekwencją martwicy zawałowej jest przebudowa mięśnia sercowego, charakteryzująca się zmianami w zakresie liczby i wymiarów kardiomiocytów (w sercu pozawałowym przerost wzdłużny jest silniejszy niż poprzeczny), zwiększonym włóknieniem, a także zmianami molekularnymi w samych miocytach, co upośledza ich zdolność do aktywacji skurczu [15]. Zmiany strukturalne i molekularne serca „pozawałowego” mogą zatem zakłócić przekazywanie sygnałów istotnych dla aktywacji mechanizmów kardioprotekcyjnych. Z badań eksperymentalnych wynika, że przebyty MI i przebudowa serca uniemożliwiają ograniczenie rozległości MI za pomocą zjawiska HN, podczas gdy zachowane jest hartowanie za pomocą takich środków farmakologicznych, jak diazoksyd, znany jako aktywator mito K_{ATP} [16]. Prawdopodobną przyczyną utraty zdolności hartowania jest zmniejszona aktywacja PKC, gdyż zahamowanie przebudowy za pomocą walsartanu, antagonisty receptora AT1 dla angiotensyny II, przywracało aktywność PKC i zdolność wywoływania HN [17].

Ponadto badania przeprowadzone na beleczkach izolowanych z mięśnia prawego przedsionka pobranych od chorych z zachowaną (> 50%) i upośledzoną frakcją wyrzutową (EF < 30%) lewej komory wykazały, że jedynie w beleczkach pobranych z serc z EF > 30% zaobserwowano istotnie mniejsze uwalnianie kinazy kreatynowej (CPK), jeżeli przed dłuższą hipoksją i reoksygenacją (imitującą niedokrwienie i reperfuzję) zastosowano krótką hipoksję i reoksygenację [16].

Można zatem przypuszczać, że w niewydolnym sercu, zarówno w modelu zwierzęcym, jak i u człowieka, zaburzone jest przekazywanie sygnałów z receptora pobudzonego przez agonistę na efektor, którym prawdopodobnie są MPTP.

CUKRZYCA

Z badań epidemiologicznych wynika, że cukrzyca jest niezależnym czynnikiem ryzyka CAD, a u chorych z już rozpoznaną CAD niekorzystnie wpływa na rokowanie po dokonanym MI [18]. Nie można wykluczyć, że to większa podatność mięśnia sercowego na uszkodzenie w czasie niedokrwienia i reperfuzji z powodu utraty endogennego zjawiska HN odpowiada za większą śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych u chorych na cukrzycę, a także za więcej powikłań, w tym większą śmiertelność, w ostrym MI.

Badania przeprowadzone u różnych gatunków zwierząt, z cukrzycą wywołaną eksperymentalnie (alloksan, streptozocyna) i trwającą co najmniej 2 tygodnie, potwierdzają, że zarówno HN, jak i HR nie hartowały serca poddanego niedokrwieniu i reperfuzji [19].

Podobnie obserwacje kliniczne potwierdzają, że u chorych z cukrzycą i CAD są upośledzone mechanizmy kardioprotekcyjne. Zarówno angina przedzawałowa, jak i HN przed PTCA nie ograniczały rozległości martwicy zawałowej, nie zapobiegały reperfuzyjnym zaburzeniom kurczliwości, nie zmniejszały też śmiertelności w ostrym MI [20].

Pozostaje pytanie, czy i w jaki sposób sama cukrzyca wpływa na zjawisko hartowania? Z badań eksperymentalnych wynika, że przekazywanie sygnałów w cukrzycy może być zaburzone na wielu etapach kaskady HN. Jedną z możliwych przyczyn „niewydolnej” endogennej kardioprotekcji jest dysfunkcja kanałów mito K_{ATP} . Okazało się, że podanie diazoksydu uniemożliwiało wywołanie HN u pacjentów z cukrzycą, podczas gdy aktywatory PKC i kinazy aktywowane przez mitogeny (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*) zachowały zdolność hartowania [5, 21]. Równocześnie u osób bez cukrzycy zastosowanie diazoksydu skutkowało aktywacją mito K_{ATP} , której następstwem jest niewielki wzrost mitochondrialnej produkcji WRT, niezbędnego elementu w kaskadzie HN, oraz mniejsze obciążenie mitochondriów jonami wapnia w czasie reperfuzji.

Warto zaznaczyć, że tylko mito K_{ATP} a nie K_{ATP} zlokalizowane w błonie komórkowej biorą udział w hartowaniu serca. Jeżeli zatem aktywowane (otwarte) mito K_{ATP} odpowiadają za HN, to ich blokada może uniemożliwić hartowanie mięśnia sercowego. I tu pojawia się problem terapii chorych na cukrzycę typu 2 za pomocą pochodnych sulfonylomocznika (SNM), które blokując K_{ATP} komórek beta trzustki, zwiększają uwalnianie insuliny [22]. Równocześnie SNM mogą blokować zarówno błonowe, jak i mito K_{ATP} w innych tkankach, w tym w komórkach mięśnia sercowego i w komórkach mięśni gładkich naczyń.

Z dotychczas opublikowanych prac wynika, że śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych była większa u chorych leczonych starszą generacją SNM (tolbutamid, glibenklamid) w porównaniu z pacjentami leczonymi insuliną [23]. Badania kliniczne potwierdzają niekorzystny wpływ nieselektywnych SNM na HN. Przewlekła terapia glibenklamidem u osób z wysiłkową CAD i cukrzycą typu 2 znosiła hartujący wpływ pierwszego dodatniego testu wysiłkowego, a u pacjen-

tów leczonych PTCA z powodu MI zwiększała śmiertelność po zabiegu [24, 25].

Wprowadzenie nowej generacji pochodnych SNM (glipepidem), wykazujących dużą selektywność wobec komórek beta trzustki, może poprawić bezpieczeństwo chorych na cukrzycę typu 2. Wykazano, że przewlekła terapia glipepidem nie wpływała na zdolność wywoływania HN u osób z cukrzycą poddanych PTCA [26]. Stosując zatem SNM, trzeba pamiętać, że zarówno cukrzyca, jak i leki mogą działać synergistycznie na mito K_{ATP} , a w konsekwencji utrudniać proces hartowania. Ponadto blokada błonowych K_{ATP} wpływając na czas trwania potencjału czynnościowego w kardiomiocytach, może maskować uniesienie odcinka ST w EKG i utrudniać rozpoznanie MI [25].

WIEK

Z badań epidemiologicznych wynika, że śmiertelność z powodu CAD i MI wzrasta istotnie u osób > 65. rż. [8, 11, 27].

Wśród przyczyn związanego z wiekiem, niekorzystnego rokowania wymienia się m.in.: częstsze występowanie czynników ryzyka CAD (nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia, cukrzyca), przebudowę układu sercowo-naczyniowego charakteryzującą się zwiększeniem masy mięśnia sercowego, upośledzeniem jego funkcji skurczowej i rozkurczowej, a także pogorszeniem, zależnej od śródbłonna, zdolności rozkurczowej naczyń. Jednak mechanizm tej przebudowy nie został do końca wyjaśniony.

Z badań eksperymentalnych wynika, że związana z wiekiem zwiększona produkcja WRT i zmniejszona aktywność enzymów antyoksydacyjnych (dysmutaza nadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa) może prowadzić do oksydacyjnej modyfikacji białek, w tym enzymów, lipoprotein i DNA, a w konsekwencji do pogorszenia funkcji kardiomiocytów [27]. Ponadto ważnym następstwem stresu oksydacyjnego jest destrukcja mitochondriów i upośledzona synteza ATP.

Sam wiek może zatem zwiększać podatność serca na uszkodzenie w czasie niedokrwienia i reperfuzji poprzez zanik endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych. Pozostaje pytanie, czy możliwe jest zahartowanie „starczego” serca?

Wyniki dotychczasowych badań eksperymentalnych nie są jednoznaczne i zależą od gatunku badanych zwierząt. Niemniej potwierdzono, że wiek może niekorzystnie wpływać na funkcję wielu kluczowych elementów kaskady kardioprotekcyjnej, takich jak PKC i mitochondrialna koneksyna 43 [28].

Z kolei u osób starszych angina przedzawałowa jako kliniczna forma HN ani nie zmniejszała śmiertelności szpitalnej w ostrym MI, ani też nie poprawiała 5-letniego przeżycia w porównaniu z osobami < 65 rż. [27]. Podobnie u starszych pacjentów z anginą wysiłkową, a także u chorych poddanych PTCA lub CABG nie obserwowano efektu ochronnego HN [29].

Należy jednak podkreślić, że zastosowanie silnego bodźca hartującego może usprawnić, obniżony z wiekiem, endogenny mechanizm kardioprotekcyjny [30].

Wydłużenie czasu trwania krótkiego niedokrwienia przed PTCA, ze 120 do 180 s, przywracało jego hartujący wpływ u chorych > 70. rż. Ponadto regularna aktywność fizyczna zwiększała odporność serca „starczego” na negatywne skutki niedokrwienia i reperfuzji. Wśród korzyści wymienia się m.in. zahamowanie związanej z wiekiem niekorzystnej przebudowy mięśnia sercowego, wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych (dysmutaza nadtlenkowa), syntezę białka szoku cieplnego (*heat shock protein*) oraz odbudowę zasobów noradrenaliny w mięśniu sercowym, która jest niezbędna do wywoływania HN [27, 30]. Ponadto ograniczenie podaży kalorii w diecie również przywracało obniżoną u starszych zwierząt zawartość noradrenaliny w mięśniu sercowym oraz jej uwalnianie z zakończeń adrenergicznych w odpowiedzi na bodziec hartujący [30].

Obserwacje kliniczne potwierdzają, że zarówno regularny wysiłek fizyczny, jak i normalizacja masy ciała przywracały hartujący wpływ anginy przedzawałowej u osób > 65. rż. [27].

Podsumowując, warto podkreślić, że wysiłek fizyczny łącznie z dietą działają synergistycznie na zdolność wywoływania HN u zwierząt i u ludzi. Zmiana stylu życia, zwłaszcza u osób > 65. rż., jest zatem niezbędna dla zachowania sprawności endogennych mechanizmów kardioprotekcyjnych.

PODSUMOWANIE

Wprowadzenie nowych metod leczenia MI, mających na celu szybkie udrożnienie zamkniętej tętnicy, istotnie poprawiło rokowanie u chorych z CAD. Należy jednak pamiętać, że szybkie przywrócenie dopływu krwi do niedokrwionych tkanek wiąże się z ryzykiem reperfuzyjnego uszkodzenia serca. Szczególnie istotne jest zachowanie sprawności endogennych mechanizmów zabezpieczających serce przed niekorzystnymi następstwami niedokrwienia i reperfuzji. Wiadomo obecnie, że wiek, a także choroby współistniejące, takie jak nadciśnienie tętnicze, niewydolność serca, cukrzyca, mogą ingerować w endogenne mechanizmy kardioprotekcyjne u pacjentów z CAD. Jednocześnie u osób zdrowych > 65. rż. regularna aktywność fizyczna w połączeniu z dietą przywracała ochronny, obniżony z wiekiem, wpływ HN. Zatem u chorych, których serca są szczególnie narażone na negatywne skutki niedokrwienia, konieczna jest modyfikacja stylu życia oraz intensywne leczenie czynników ryzyka CAD. Jednocześnie poznanie molekularnego mechanizmu hartowania, a w konsekwencji możliwość jego farmakologicznego naśladownia, może stworzyć nowe podstawy terapii stanów klinicznych przebiegających z ostrym niedokrwieniem mięśnia sercowego.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986; 74: 1124–1136.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic preconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 285: H579–H588.
- Moolman JA, Genade S, Tromp E et al. Ischaemic preconditioning does not protect hypertrophied myocardium against ischaemia. *S Afr Med J*, 1997; 87 (suppl. 3): C151–C156.
- Ebrahim Z, Yellon DM, Baxter GF. Ischemic preconditioning is lost in aging hypertensive rat heart: Independent effects of aging and longstanding hypertension. *Exp Gerontol*, 2007; 42: 807–814.
- Ferdinandy P, Szilvasy Z, Baxter GF. Adaptation to myocardial stress in disease state: is preconditioning a healthy heart phenomenon? *Trends Pharmacol Sci*, 1998; 19: 223–229.
- Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning. *Heart Failure Rev*, 2007; 12: 181–188.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: Underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*, 2009; 204: 334–341.
- Granfeldt A, Lefer DJ, Vinten-Johansen J. Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res*, 2009; 83: 234–246.
- Kloner RA, Shook T, Antman EM et al. Prospective temporal analysis of the onset of preinfarction angina versus outcome: an ancillary study TIMI-9B. *Circulation*, 1998; 97: 1042–1045.
- Prisant LM. Hypertensive heart disease. *J Clin Hypertens*, 2005; 7: 231–238.
- Cupples LA, Gagnon DR, Wong ND et al. Pre-existing cardiovascular conditions and long term prognosis after initial myocardial infarction: The Framingham Study. *Am Heart J*, 1993; 125: 863–872.
- Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res*, 1998; 39: 89–105.
- Takeuchi T, Ishii Y, Kikuchi K, Hasebe N. Ischemic preconditioning effect of prodromal angina is attenuated in acute myocardial infarction patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circ J*, 2011; 75: 1192–1199.
- Swedberg K, Pfeffer M, Granger C et al. Candesartan in heart failure: assessment of reduction in mortality and morbidity (CHARM) rationale and design. *J Card Fail*, 1999; 5: 276–282.
- Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Jiang R et al. Preconditioning and postconditioning: innate cardioprotection from ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol*, 2007; 103: 1441–1448.
- Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Failure to precondition pathological human myocardium. *J Am Coll Cardiol*, 2001; 37: 711–718.
- Miki T, Miura T, Tanno M et al. Interruption of signal transduction between G protein and PKC-ε underlies the impaired myocardial response to ischemic preconditioning in postinfarct remodeled hearts. *Mol Cell Biochem*, 2003; 247: 185–193.
- Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors. The Framingham Study. *Circulation*, 1999; 59: 8–13.
- Kersten JR, Toller WG, Gross ER et al. Diabetes abolishes ischemic preconditioning: Role of glucose, insulin and osmolality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000; 275: H1218–H1224.
- Lee TM, Chou TF. Impairment of myocardial protection in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003; 88: 531–537.
- Hassouna A, Loubani M, Matata BM et al. Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovasc Res*, 2006; 69: 450–458.
- Cleveland JC Jr, Meldrum DR, Cain BS et al. Oral sulfonylurea hypoglycemic agents prevent ischemic preconditioning in human myocardium. *Circulation*, 1997; 96: 29–32.
- Bell DS. Do sulfonylurea drugs increase the risk of cardiac events? *CMAJ*, 2006; 174: 185–186.
- Bilińska M, Potocka J, Korzeniowska-Kubacka I et al. Warm-up phenomenon in diabetic patients with stable angina treated with diet or sulfonylureas. *Coron Artery Dis*, 2007; 18: 455–462.
- Garrat KN, Brady PA, Hassinger NL et al. Sulfonylurea drugs increase early mortality in patients with diabetes mellitus after direct angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1999; 33: 119–124.
- Klepzig H, Kober G, Mattr C et al. Sulfonylureas and ischaemic preconditioning: a double-blind, placebo-controlled evaluation of glimepiride and glibenclamide. *Eur Heart J*, 1999; 20: 439–446.
- Abete P, Cacciatore F, Testa G et al. Ischaemic preconditioning in the aging heart: From bench to bedside. *Ageing Res Rev*, 2010; 9: 153–162.
- Fenton RA, Dickson EW, Meyer TE, Dobson JG Jr. Aging reduces the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2000; 2: 1371–1375.
- Ishihara M, Sato H, Tateishi H et al. Beneficial effect of prodromal angina pectoris is lost in elderly patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 2000; 139: 881–888.
- Powers SK, Quindry J, Hamilton K. Aging, exercise, and cardioprotection. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1019: 462–470.

Rola apeliny w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego i zaburzeniach metabolicznych

The role of apelin in pathogenesis of cardiovascular diseases and metabolic disorders

Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska, Katarzyna Czarzasta, Ryszard Gomółka, Ewa Szczepańska-Sadowska

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Streszczenie

Apelina jest niedawno odkrytym biologicznie czynnym peptydem występującym w kilku postaciach izoformicznych, będących agonistami dla sierociego receptora APJ. Zarówno apelinę, jak i jej receptory wykryto w mózgu oraz w wielu narządach obwodowych. W układzie sercowo-naczyniowym występuje ona w sercu, w śródbłonku oraz w komórkach mięśni gładkich naczyń. Działając na kardiomyocyty, apelina wywiera wpływ inotropowy dodatni. W śródbłonku uwalnia tlenek azotu, pośredniczący w jej działaniu naczyniorozszerzającym, podczas gdy jej bezpośredni wpływ na mięśnie gładkie naczyń prowadzi do ich skurczu. Apelina wchodzi w interakcję z innymi związkami regulującymi ciśnienie tętnicze, m.in. z angiotensyną II i wazopresyną oraz z układem współczulnym. Szczególną uwagę poświęca się możliwości jej korzystnego działania w nadciśnieniu tętniczym, początkowych stadiach niewydolności serca (HF), a także w chorobie niedokrwiennej serca. Synteza apeliny w adipocytach pozwala zaliczyć ją do adipokin. Wytwarzanie apeliny w tkance tłuszczowej wzrasta w otyłości i pod wpływem insuliny, dlatego wydaje się, że może ona odgrywać istotną rolę w patogenezie otyłości z towarzyszącą insulinopornością. U pacjentów z cukrzycą typu 2 apelina poprawia tolerancję glukozy w początkowych etapach choroby. Do pełnej oceny fizjologicznego znaczenia apeliny i jej roli w chorobach układu sercowo-naczyniowego i zaburzeniach metabolicznych konieczne są jednak dalsze badania.

Słowa kluczowe: apelina, receptor APJ, układ sercowo-naczyniowy, zaburzenia metaboliczne

Abstract

Apelin is a recently discovered biologically active peptide present in several isoforms that are agonists for orphan receptor APJ. Apelin and APJ receptor were found in the central nervous system and in different peripheral tissues. In the cardiovascular system the peptide is present both in the heart and in the endothelium and smooth muscles cells of the vascular wall. Acting on cardiomyocytes apelin exerts positive inotropic effect, in the endothelium it releases nitric oxide, which mediates its vasodilatory action, while acting directly on smooth muscles cells it causes vasoconstriction. Apelin interacts with other compounds regulating blood pressure; for instance with angiotensin II, vasopressin, and with the sympathetic nervous system. Special attention is focused on the possibility of positive role of apelin in hypertension, initial stages of heart failure and ischaemic heart disease. Synthesis of apelin in adipocytes permits to include this peptide among adipokines. In the adipose tissue its production is increased in obesity and by insulin. It appears that apelin may play essential role in pathogenesis of insulin-resistant obesity. In patients with type 2 diabetes apelin improves glucose tolerance in initial stages of the illness. However, further experimental and clinical studies are required for full evaluation of significance of positive and negative aspects of the role of apelin in the cardiovascular and metabolic diseases.

Key words: apelin, APJ receptor, cardiovascular system, metabolic disorders

Kardiol Pol 2011; 69, supl. III: 89–93

Adres do korespondencji:

dr n. med. Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska, Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00–927 Warszawa, tel: +48 22 828 11 55, e-mail: agnieszka.cudnoch@wum.edu.pl

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

WSTĘP

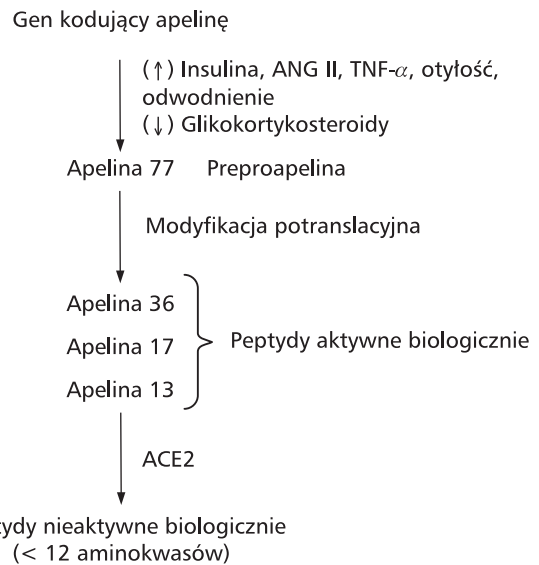
Apelinę odkryto pod koniec lat 90. XX wieku w ścianie przewodu pokarmowego. Wkrótce okazało się, że występuje ona w licznych narządach, m.in. w sercu, płucach, nerkach i tkance tłuszczowej oraz w mózgu, co wskazywało na jej pleiotropowe działanie regulacyjne. Prace doświadczalne i kliniczne, w których badano zmiany stężenia endogennej apeliny w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych lub efekty jej działania, wskazują na jej udział w regulacji funkcji układu sercowo-naczyniowego, pokarmowego, immunologicznego, gospodarki wodno-elektrolitowej, a także w embriogenezie i rozwoju narządów w życiu płodowym. Podjęto badania nad rolą apeliny w stanach patofizjologicznych, takich jak: nadciśnienie tętnicze, HF, otyłość, cukrzyca typu 2, a także w chorobie wrzodowej, osteoporozie, zakażeniu wirusem HIV.

PEPTYDY UKŁADU APELINERGICZNEGO

Po raz pierwszy apelinę wyizolowali w 1998 r. Tatemoto i wsp. z nabłonka gruczołowego żołądka wołu jako 77-aminokwasowy peptyd (preproapelina, apelina 77). Ta sama grupa badaczy wykazała, że 36-aminokwasowy C-końcowy fragment wykrytego związku jest agonistą dla odkrytego wcześniej sierociego receptora APJ [1]. N-końcowy fragment apeliny wpływa prawdopodobnie z kolei na proces interakcji ligandu z receptorem. Stwierdzono, że stopniowe odcinanie aminokwasów od N-końca przyspiesza dysocjację peptydu od receptora APJ. Gen kodujący apelinę zlokalizowano na chromosomie X w pozycji Xq25-26.1. Ekspresję mRNA dla apeliny stwierdzono w nerkach, sercu, płucach, gruczole sutkowym i w łożysku. W układzie sercowo-naczyniowym występuje ona w sercu, w śródbłonku oraz w komórkach mięśni gładkich naczyń. Preproapelina (apelina 77) jest prekursorem nie tylko apeliny 36, ale także apeliny 17 (apelina 61-77) oraz apeliny 13 (apelina 66-77), związków o dużej aktywności biologicznej (ryc. 1). W badaniach *in vitro* oraz *in vivo* najczęściej stosuje się postać glutamylową apeliny 13, charakteryzującą się najdłuższym okresem półtrwania [2, 3].

RECEPTOR APJ

Gen dla receptora APJ, odkryty w 1993 r. przez O'Dowd i wsp. [4], znajduje się w chromosomie 11 w pozycji 11q12. Receptor APJ wykazuje znaczną analogię do receptora AT₁ dla angiotensyn, jednak angiotensyna II (Ang II) nie powoduje jego aktywacji. Wykazano, że receptor APJ należy do rodziny siedmiodomenowych receptorów transbłonowych sprzężonych z białkiem G (GPCRs). Obecność receptora APJ stwierdzono w strukturach ośrodkowego układu nerwowego, m.in. w jądrach podwzgórza, hipokampie i przegrodzie oraz w szyszynce i przysadce. Receptory APJ wykryto także w narządach obwodowych, m.in. w płucach i sercu. Szczególnie dużą aktywność receptorów APJ wykazano w śródbłonku naczyń nerkowych i płucnych,

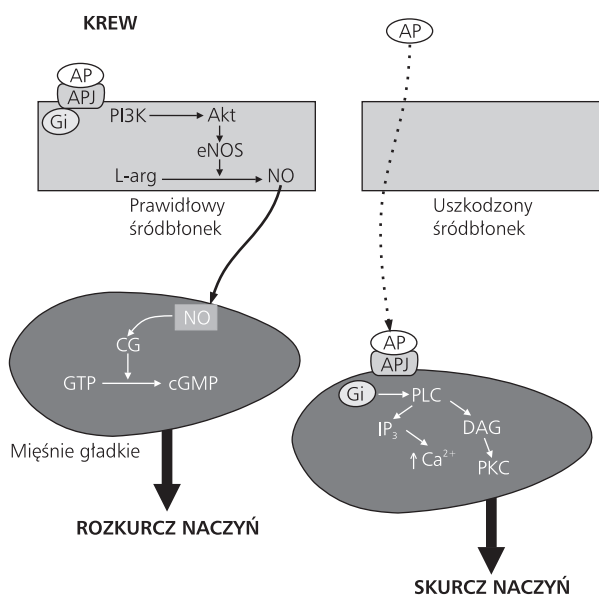


Rycina 1. Synteza, modyfikacja potranslacyjna oraz metabolizm apeliny; Ang II — angiotensyna II; ACE2 — enzym konwertujący typu 2; TNF- α — czynnik martwicy nowotworów α

a także w krążeniu wieńcowym, wsierdzu oraz w mięśniach gładkich naczyń [2, 3].

INTERAKCJA APELINA–RECEPTOR APJ

Podstawowy szlak transdukcji związany z działaniem apeliny w śródbłonku naczyniowym charakteryzuje się współdziałaniem receptora APJ z białkiem Gi. Przyłączenie się ligandu (apeliny) do receptora APJ pobudza kinazę fosfatydyloinozytolową 3 (PI3K), która z kolei aktywuje kinazę białkową B (białko Akt). Fosforylacja i aktywacja śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) prowadzi do uwolnienia tlenku azotu (NO) oraz cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP), wpływających relaksacyjnie na mięśniówkę naczyń. W procesach patologicznych przebiegających z uszkodzeniem śródbłonka naczyniowego receptory APJ obecne w błonie komórek śródbłonkowych są mniej aktywne. Apelina łączy się wówczas w większym stopniu z aktywnymi receptorami APJ w mięśniach gładkich naczyń. Kaskada sygnałów, która następuje w konsekwencji tego procesu, rozpoczyna się od współdziałania receptorów APJ z białkiem Gi. Dochodzi do pobudzenia kinazy białkowej typu C (PKC), która następnie aktywuje wymienniki Na⁺/H⁺ (NHE) oraz 3Na⁺/Ca²⁺ (NCX). W pobudzonej komórce prowadzi to do dokomórkowego napływu jonów Ca²⁺. Konsekwencją wzmożonego dokomórkowego prądu wapniowego jest alkalizacja środowiska wewnątrzkomórkowego oraz zwiększona podatność miofilamentów na jony Ca²⁺ i fosforylacja łańcuchów lekkich miozyny (ryc. 2). Wzrost aktywności wymiennika Na⁺/H⁺ i 3Na⁺/Ca²⁺ wydaje się odpowiadać także za 40% inotropowego dodatniego działania apeliny [3].



Rycina 2. Interakcja apeliny z receptorem APJ w naczyniach z prawidłowym i uszkodzonym śródbłonkiem; Akt (białko Akt) — kinaza białkowa B; AP — apelina; APJ — receptor apeliny; CG — cykloaza guanylanowa; cGMP — cykliczny guanozynomonofosforan; DAG — diacyloglicerol; eNOS — syntaza tlenku azotu; Gi — hamujące białko G; GTP — trifosforan guanozyny; IP₃ — trifosforan inozytolu; L-arg — L-arginina; NO — tlenek azotu; PI3K — kinaza fosfatydiloinozytolowa 3; PKC — kinaza białkowa typu C; PLC — fosfolipaza C

APELINA W UKŁADZIE SERCOWO-NACZYNIOWYM

Synteza apeliny i receptorów APJ w układzie sercowo-naczyniowym rozpoczyna się już w życiu płodowym. Badania na modelach zwierzęcych dowiodły, że apelina stanowi główny mediator w procesie różnicowania się układu sercowo-naczyniowego, m.in. poprzez swój wpływ na proliferację komórek śródbłonna oraz kardiomiocytów [5]. Prawdopodobnie apelina jest także czynnikiem angiogennym. Podczas rozwoju postnatalnego ekspresja receptorów APJ wzrasta w mięśniu sercowym oraz w śródbłonku dużych i małych naczyń [6].

Rola apeliny w fizjologii układu sercowo-naczyniowego nie została w pełni poznana. Wyniki badań obwodowego działania apeliny, wykonanych w warunkach *in vivo* na zwierzętach, nie są jednoznaczne. Prawdopodobnie rozbieżności są spowodowane stosowaniem przez badaczy niejednakowych środków znieczulających, które w różnicowany sposób wpływają na aktywność układu autonomicznego. Mogą też się wiązać ze stosowaniem różnych dawek i postaci izoformicznych apeliny przez rozmaicie długi czas. Stwierdzono np., że w niewielkiej dawce (< 20 µg/kg mc.) apelina miała działanie hipotensyjne, powodowane pobudzeniem syntazy NO. Dawki apeliny kilku- lub kilkunastokrotnie wyższe wywoływały wzrost ciśnienia tętniczego, najprawdopodob-

niej poprzez aktywację wymienników Na⁺/H⁺ i 3Na⁺/Ca²⁺ w mięśniówce tętnic [7]. W opublikowanych dotychczas pracach apelina zwiększała częstość rytmu serca lub nie wpływała na jej wartość w istotny sposób. Niewiele wiadomo także o ośrodkowym działaniu apeliny. W pojedynczych pracach prowadzonych na normotensyjnych szczurach opisano wzrost ciśnienia tętniczego z towarzyszącym wzrostem częstości skurczów serca [8]. Inna natomiast grupa badaczy nie obserwowała zmiany parametrów hemodynamicznych po dokomorowym podaniu apeliny [9].

Wykazano inotropowy dodatni wpływ apeliny na układ sercowo-naczyniowy. Apelina 16 zwiększała kurczliwość izolowanych serc szczurzych, osiągając 70% efektu maksymalnego izoprenaliny [2]. Zbliżone wyniki uzyskano w badaniach *in vivo* na szczurach zdrowych i na zwierzętach z HF [10]. Uważa się, że inotropowo dodatnie działanie apeliny wiąże się z aktywacją lekkiego łańcucha miozyny będącą efektem pobudzającego wpływu apeliny na PKC [3].

Apelina a układ angiotensynergiczny

Wpływ apeliny na układ sercowo-naczyniowy jest częściowo zależny od interakcji z układem renina-angiotensyna (RAS). Interakcja apeliny z receptorem APJ powoduje pobudzenie tych samych szlaków wewnątrzkomórkowych co interakcja angiotensyny II z receptorem AT₁, a budowa apeliny wykazuje homologię w sekwencji aminokwasów do fragmentu angiotensynogenu i podobną do niego ekspresję narządową i tkankową. Ponadto apelina podobnie do angiotensyny I i II jest podatna na działanie enzymu konwertującego typu 2 (ACE2), który przekształca ją w postać nieaktywną poprzez odcięcie od jej C-końca fenyloalaniny (ryc. 1). Bezpośrednich dowodów na zachodzące interakcje między układem apelinergicznym a angiotensynergicznym dostarczają badania przeprowadzone na szczurach. Zwierzęta z HF, leczone przewlekle telmisartanem, będącym antagonistą receptora AT₁, wykazywały wzrost ekspresji apeliny i receptorów APJ [11]. U szczurów z uwarunkowanym genetycznie nadciśnieniem tętniczym (SHR) zaobserwowano znaczący spadek aktywności apeliny i receptorów APJ z towarzyszącym wzrostem mRNA receptora AT₁ w aorcji i mięśniu sercowym [12].

Apelina a układ wazopresynergiczny

Badania histochemiczne wskazują na możliwość udziału apeliny w regulacji wydzielania wazopresyny. Apelina i wazopresyna są magazynowane w pęcherzykach neuronów wazopresynergicznych jąder podwzgórza. Uwalnianie obu neuropeptydów zachodzi pod wpływem wyładowań elektrycznych, o różnej częstotliwości, wpływających na zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [13].

W nerce stwierdzono wysoką aktywność apeliny i receptorów APJ w naczyniach prostych rdzenia [14], które wykazują również wysoką ekspresję receptorów V₁ dla wazopresyny oraz pełnią zasadniczą funkcję w regulacji gospodarki wodnej i sodowej organizmu [15].

APELINA W ZABURZENIACH CZYNNOŚCI UKŁADU SERCOWO-NACZYNIOWEGO

Apelina w nadciśnieniu tętniczym

U pacjentów z nadciśnieniem pierwotnym stwierdzono obniżenie stężenia apeliny w osoczu [16]. Badania przeprowadzone na szczurach szczepu SHR wykazały spadek ekspresji genu dla receptora APJ oraz obniżenie stężenia apeliny w osoczu, komorach serca i w aorcie w porównaniu z normotensyjnymi szczurami szczepu WKY. U szczurów SHR poddanych wysiłkowemu treningowi fizycznemu zaobserwowano wzrost aktywności apeliny i receptorów APJ w mięśniu sercowym.

Rola apeliny w niewydolności serca

U pacjentów z HF opisano spadek stężenia apeliny w osoczu. Proces ten przebiega niezależnie od klasy czynnościowej NYHA czy też frakcji wyrzutowej lewej komory [3]. Dalsze badania dowiodły, że stężenie apeliny wzrasta w początkowym stadium HF, po czym obniża się wraz z postępem choroby. Jednak minimalne wahania stężenia apeliny w osoczu u pacjentów z HF wykluczają możliwość wykorzystania jej jako markera do oceny stopnia zaawansowania choroby [3, 17]. Obniżenie stężenia apeliny we krwi u osób z zaawansowaną HF może częściowo wynikać z zależności jej stężenia w osoczu od czynności nerek. Wykazano, że u pacjentów ze schyłkową HF poddanych terapii resynchronizacyjnej stężenie apeliny w osoczu wzrasta [18].

Apelina a zawał serca

Na podstawie badań wykonanych zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, wykazano, że w ostrej fazie zawału serca, poza-wałowej HF oraz niestabilnej chorobie niedokrwiennej serca dochodzi do obniżenia stężenia apeliny w osoczu [19, 20].

Apelina w innych schorzeniach serca

U pacjentów z samoistnym napadowym migotaniem przedsiionków zaobserwowano ujemną korelację między obniżeniem się stężenia apeliny a stężeniem proBNP w osoczu [21]. Spadek stężenia apeliny we krwi był widoczny również u pacjentów z ciężką śródmiąższową chorobą płuc i prawidłową funkcją serca, a także u osób z idiopatycznym ciężkim nadciśnieniem płucnym oraz pacjentów ze schyłkową HF. Porównanie wszystkich grup badawczych dowiodło, że ujemna korelacja między stężeniem apeliny a N-końcowego fragmentu mózgowego peptydu natriuretycznego (NT-proBNP) w osoczu występowała głównie u chorych z nadciśnieniem płucnym i ciężką HF. Dzięki tym spostrzeżeniom możliwe wydaje się wykorzystanie apeliny jako markera pomocnego w różnicowaniu duszności pochodzenia sercowego i płucnego [22].

Kardioprotekcyjny wpływ apeliny

Dowodów na kardioprotekcyjne działanie apeliny dostarczyły badania przeprowadzone na szczurach z uszkodzonym mię-

śniem sercowym, u których dootrzewnowo podana apelina poprawiała kurczliwość lewej komory i obniżała ciśnienie późnorozkurczowe [23]. U szczurów szczepu Lewis ekspresja genu dla apeliny wzrastała podczas pierwszych 24 godzin po dokonaniu zawału serca, ale powracała do stanu wyjściowego w ciągu 2 tygodni. Wykazano ponadto dodatnią korelację między ekspresją genu dla apeliny a aktywnością czynnika indukowanego przez hipoksję niedokrwinną (HIF-1). Przypuszcza się, że jest to mechanizm adaptacyjny w odpowiedzi na hipoksję. Bezpośrednią reakcją na hipoksję wydaje się wzrost aktywności apeliny i receptorów APJ w kardiomiocytach oraz w komórkach tłuszczowych, który może odgrywać rolę w pobudzaniu angiogenezy [24, 25].

APELINA A BILANS ENERGETYCZNY

Apelina należy do adipokinin, gdyż ekspresję jej mRNA stwierdzono w tkance tłuszczowej. Stężenie apeliny w tkance tłuszczowej wzrasta wraz z różnicowaniem się adipocytów, po czym w dojrzałych komórkach tłuszczowych dochodzi do jej ekspresji. W tkance tłuszczowej na syntezę apeliny wpływają przede wszystkim insulina, hormon wzrostu i czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), który zwiększa stężenie mRNA apeliny, zarówno w tkance tłuszczowej, jak i w osoczu. Hamujące działanie wywierają zaś glikokortykosteroidy (ryc. 1) [26].

Na podstawie doświadczeń stwierdzono, że dokomoro-wa, przewlekła infuzja apeliny 13 powodowała zwiększenie przyjmowania pokarmu i wzrost masy ciała u myszy [27].

APELINA A ZABURZENIA METABOLIZMU

Na podstawie doświadczeń stwierdzono, że dieta wysoko-tłuszczowa zwiększa ekspresję receptorów APJ w podwzgórzku, natomiast dokomorowe podanie apeliny 13 u tych zwierząt redukowało ekspresję wspomnianych receptorów. U otyłych pacjentów wykazano dodatnią korelację między masą ciała a stężeniem apeliny i insuliny w osoczu. Badania przeprowadzone na otyłych myszach z hiperinsulinemią wykazały, że ekspresja mRNA apeliny zależy nie tyle od otyłości, co od stężenia insuliny. Myszy, u których zredukowano sekrecję insuliny za pomocą streptozotocyny, wykazywały drastyczny spadek uwalniania apeliny przez tkankę tłuszczową; efekt ten ulegał odwróceniu po podaniu insuliny. U tych samych zwierząt dochodziło do obniżenia aktywności apeliny pod wpływem głodzenia [26]. Wykazano, że u myszy pozbawionych genu dla apeliny podanie tego związku zwiększa wrażliwość komórek mięśni szkieletowych na insulinę, przeciwdziałając tym samym hiperinsulinemii. Istnieniu dodatniej zależności między apelina a insuliną wydają się przeciwstawiać badania na komórkach beta wyspiaka trzustki, w których apelina hamowała uwalnianie insuliny [28]. Badania przeprowadzone w warunkach *in vivo* na myszach szczepu C57BL/6 potwierdzają negatywny wpływ apeliny na sekrecję insuliny.

W badaniach na zwierzętach oceniano również możliwość terapeutycznego oddziaływania apeliny w cukrzycy. Badania na myszach z cukrzycą wykazały podwyższone stężenie apeli-

ny w osoczu i obniżoną ekspresję receptora APJ w aorcie. Podanie apelinu w celach terapeutycznych myszom z cukrzycą wywoływało u nich zmniejszenie odpowiedzi naczyniozwiększającej na angiotensynę II oraz zwiększało odpowiedź naczyniorozszerzającą na acetylocholinę za pośrednictwem insulinozależnego szlaku PI3K/Akt/eNOS [29]. Znaczny wzrost stężenia apelinu i insuliny w osoczu zaobserwowano u pacjentów z cukrzycą typu 2. Podwyższone stężenie apelinu w osoczu w badanej grupie wykazywało dodatnią zależność ze wskaźnikiem masy ciała, stężeniem glukozy i triglicerydów, natomiast ujemną z wrażliwością na insulinę [30].

PODSUMOWANIE

Dotychczasowe badania dostarczają wielu interesujących obserwacji wskazujących na udział apelinu w regulacji ciśnienia tętniczego, przepływu krwi, kurczliwości mięśnia sercowego i gospodarki lipidowej oraz na istnienie związku między zaburzeniami wydzielania i działania apelinu a patogenezą chorób układu sercowo-naczyniowego oraz zaburzeniami metabolizmu. Badania te wydają się bardzo obiecujące, jednak ze względu na to, że zostały podjęte stosunkowo niedawno, informacje dostępne w piśmiennictwie są zbyt fragmentaryczne, aby można było sformułować jednoznaczne wnioski co do znaczenia układu apelinergicznego i możliwości terapeutycznego zastosowania agonistów lub antagonistów apelinu.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 251: 471–476.
- Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF. Apelin: a novel neurohumoral modulator of the cardiovascular system. Pathophysiologic importance and potential use as a therapeutic target. *Rev Port Cardiol*, 2005; 24: 1263–1276.
- Japp AG, Newby DE. The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem Pharmacol*, 2008; 75: 1882–1892.
- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, 1993; 136: 355–360.
- Scott IC, Masri B, D'Amico LA et al. The G protein-coupled receptor *agtr1b* regulates early development of myocardial progenitors. *Dev Cell*, 2007; 12: 403–413.
- Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept*, 2004; 118: 119–125.
- Kotwica T, Kosmala W. Rola apelinu w fizjologii i chorobach układu sercowo-naczyniowego. *Pol Przegl Kardiol*, 2008; 10: 55–58.
- Kagiyama S, Fukuhara M, Matsumura K et al. Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regul Pept*, 2005; 125: 55–59.
- Reaux A, De Mota N, Skultetyova I et al. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem*, 2001; 77: 1085–1096.
- Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V et al. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation*, 2004; 110: II187–193.
- Iwanaga Y, Kihara Y, Takenaka H, Kita T. Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: Possible role of angiotensin II-angiotensin type 1 receptor system. *J Mol Cell Cardiol*, 2006; 41: 798–806.
- Zhong JC, Huang DY, Liu GF et al. Effects of all-trans retinoic acid on orphan receptor APJ signaling in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*, 2005; 65: 743–750.
- De Mota N, Reaux-Le Goazigo A et al. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 10464–10469.
- O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, Lolait SJ. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1492: 72–80.
- Llorens-Cortes C, Moos F. Opposite potentialities of hypothalamic coexpressed neuropeptides, apelin and vasopressin in maintaining body-fluid homeostasis. *Prog Brain Res*, 2008; 170: 559–570.
- Sonmez A, Celebi G, Erdem G et al. Plasma apelin and ADMA Levels in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 2010; 32: 179–183.
- van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr, Ellinor PT et al. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 2006; 48: 1217–1224.
- Francia P, Salvati A, Balla C et al. Cardiac resynchronization therapy increases plasma levels of the endogenous inotrope apelin. *Eur J Heart Fail*, 2007; 9: 306–309.
- Kuklińska AM, Sobkowicz B, Sawicki R et al. Apelin: a novel marker for the patients with first ST-elevation myocardial infarction. *Heart Vessels*, 2010; 25: 363–367.
- Weir RAP, Chong KS, Dalzell JR et al. Plasma apelin concentration is depressed following acute myocardial infarction in man. *Eur J Heart Fail*, 2009; 11: 551–558.
- Ellinor PT, Low AF, Macrae CA. Reduced apelin levels in lone atrial fibrillation. *Eur Heart J*, 2006; 27: 222–226.
- Goetze JP, Rehfeld JF, Carlsen J et al. Apelin: a new plasma marker of cardiopulmonary disease. *Regul Pept*, 2006; 133: 134–138.
- Jia Y, Pan C, Zhang J, Geng B et al. Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Regul Pept*, 2006; 133: 147–154.
- Glassford AJ, Yue P, Sheikh AY et al. HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007; 293: E1590–E1596.
- Ronkainen V, Ronkainen JJ, Hänninen SL et al. Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J*, 2007; 21: 1821–1830.
- Boucher J, Masri B, Daviaud D et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, 2005; 146: 1764–1771.
- Valle A, Hoggard N, Adams AC, Roca P, Speakman JR. Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice. *J Neuroendocrinol*, 2008; 20: 79–84.
- Guo L, Li Q, Wang W et al. Apelin inhibits insulin secretion in pancreatic beta-cells by activation of PI3-kinase-phosphodiesterase 3B. *Endocr Res*, 2009; 4: 142–154.
- Zhong JC, Huang Y, Yung LM et al. The novel peptide apelin regulates intrarenal artery tone in diabetic mice. *Regul Pept*, 2007; 144: 109–114.
- Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S et al. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg*, 2009; 19: 1574–1580.

Udział stresu oksydacyjnego w patogenezie nadciśnienia tętniczego — rola metylowanych arginin

The oxidative stress in pathogenesis of arterial hypertension — role of methylated arginines

Łukasz Klima¹, Katarzyna Stolarz-Skrzypek¹, Rafał Olszanecki², Kalina Kawecka-Jaszcz¹

¹Klinika Kardiologii i Nadciśnienia Tętniczego, *Collegium Medicum*, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

²Katedra Farmakologii Wydziału Lekarskiego, *Collegium Medicum*, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie

Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego. Zachwianie równowagi między czynnikami antyoksydacyjnymi a wolnymi rodnikami tlenowymi przyczynia się do uszkodzenia śródbłonnka i sprzyja rozwojowi nadciśnienia tętniczego. Dokładne poznanie tych procesów może mieć duże znaczenie dla zapobiegania i leczenia chorób sercowo-naczyniowych. W niniejszym artykule omówiono rolę metylowanych arginin w patogenezie nadciśnienia tętniczego, które są obecnie obiektem powszechnego zainteresowania, a szlaki związane z ich powstawaniem i metabolizowaniem są coraz częściej wskazywane jako potencjalne cele dla leków kardiologicznych.

Słowa kluczowe: stres oksydacyjny, nadciśnienie tętnicze, ADMA, arginina

Abstract

Oxidative stress plays significant role in pathogenesis of cardiovascular diseases. Imbalance of antioxidants and reactive oxygen species contributes to endothelium damage and leads to hypertension. The knowledge on these processes may contribute to prevention and therapy of cardiovascular diseases. This paper describes the role of methylated arginines in pathogenesis of arterial hypertension, which are nowadays object of wide research and pathways involved in their formation and metabolism are often recognised as potential targets for cardiovascular drugs.

Key words: oxidative stress, hypertension, ADMA, arginine

Kardiol Pol 2011; 69, supl. III: 94–99

WSTĘP

Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego, a zainteresowanie jego znaczeniem stale rośnie. Do stresu oksydacyjnego, czyli stanu zaburzonej równowagi między ilością wytwarzanych reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) a zdolnością do ich usuwania, dochodzi w wyniku nadmiernej produkcji ROS lub uszkodzenia mechanizmów obronnych. Źródłem

reaktywnych form tlenu jest głównie oddechowy łańcuch mitochondrialny, a także oksydaza ksantynowa, oksydaza NAD(P)H czy śródbłonna syntaza tlenu azotu (eNOS). W fizjologicznych procesach metabolizmu komórkowego w ścianie naczyń krwionośnych tlen ulega przemianom z wytworzeniem reaktywnych form, takich jak anion ponadtlenkowy (O_2^-) czy nadtlenek wodoru (H_2O_2). Wspomniana powyżej oksydaza NAD(P)H zlokalizowana na różnych

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Kalina Kawecka-Jaszcz, I Klinika Kardiologii i Nadciśnienia Tętniczego, *Collegium Medicum*, Uniwersytet Jagielloński, ul. Kopernika 17, 31–501 Kraków, tel: +48 12 424 73 00, 424 73 01, faks: +48 12 424 73 20, e-mail: mckaweck@cyf-kr.edu.pl

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

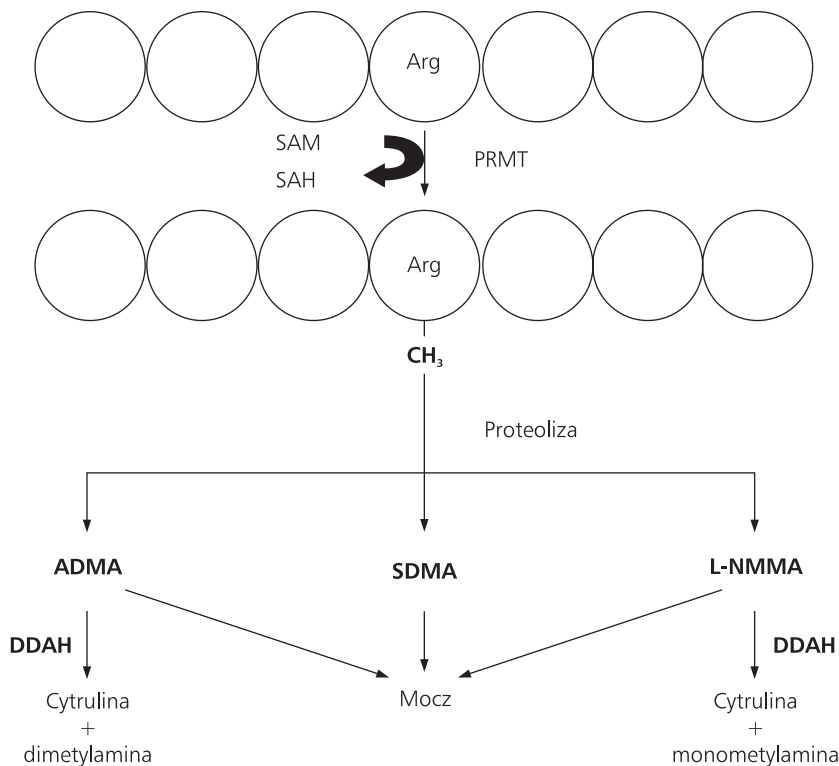
komórkach ściany naczyń katalizuje powstanie O_2^- przez jednoelektronową redukcję tlenu z użyciem NAD(P)H lub NADH i jest zdolna do wytworzenia dużej liczby wolnych rodników tlenowych. Enzym ten może być aktywowany przez angiotensynę II, trombinę, czynnik martwicy nowotworu (TNF- α) lub przez stres mechaniczny. Każdy żywy organizm posiada zdolność usuwania reaktywnych form tlenu i obrony przed stresem oksydacyjnym. Obecność odpowiednich mechanizmów obronnych — enzymów oraz szlaków metabolicznych — pozwala utrzymać prawidłowy potencjał oksydoredukcyjny wewnątrz komórek, a także naprawiać szkody wyrządzone przez ROS. Rolę antyutleniaczy w organizmie pełnią enzymy — dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), peroksydaza glutationowa, katalazy i inne mniej poznane enzymy, jak np. peroksydyny należące do rodziny ubikwityn, a także związki małowcząsteczkowe, np. tauryna.

Wolne rodniki tlenowe zwiększają ekspresję receptora dla angiotensyny II (AT1R), powodują skurcz naczyń, a oddziałując na nerki, przyczyniają się do retencji sodu i wody, a w konsekwencji do wzrostu ciśnienia tętniczego. Mimo że już tylko te dwa mechanizmy mogą być odpowiedzialne za rozwój nadciśnienia tętniczego, działanie ROS wydaje się bardziej złożone. Reaktywne formy tlenu wzmagają bowiem reakcje zapalne, które — jak się ostatnio podkreśla — odpowiadają za dalszy wzrost ciśnienia tętniczego [1]. Wykazano, że ROS aktywują prozapalne czynniki transkrypcyjne, takie jak Nrf2, NF- κ B czy AP1, które z kolei wpływają na ekspresję genów związanych z adhezją molekuł i chemokin odpowiedzialnych za gromadzenie komórek zapalnych. ROS uszkadzają śródbłonek, zwiększając w ten sposób jego przepuszczalność dla lipoprotein, które w formie utlenowanej wzmagają proces zapalny. Reaktywne formy tlenu wpływają również bezpośrednio na komórki zapalne, powodując uwalnianie cytokin przez limfocyty T. Ponadto makrofagi i granulocyty mogą wytwarzać ROS, amplifikując w ten sposób stres oksydacyjny [2].

METYLOWANE POCHODNE ARGININY *IN VIVO*

Znanym wskaźnikiem zaburzeń produkcji, a w konsekwencji biodostępności NO, jest asymetryczna dimetyloarginina (ADMA), która jest endogennym, kompetywnym inhibitorem wszystkich trzech izoform syntazy tlenku azotu (NOS). Asymetryczna dimetyloarginina jest jedną z trzech metylowanych arginin, które występują w tkankach i płynach ustrojowych człowieka. Kolejne to N-monometyloarginina (L-NMMA) i symetryczna dimetyloarginina (SDMA). Metyloargininy powstają w wyniku hydrolizy białek bogatych w reszty argininy, głównie histonów [3–5], a dokładniej powstają z białek, w których reszty argininy są poddane posttranslacyjnej metylacji przez rodzinę enzymów — metylotransferaz (PRMT) — obejmującą 10 izoform należących do dwóch klas (PRMT I i PRMT II), obecnych w większości komórek jądrzastych [4, 5]. Uznaje się, że PRMT I występują w organizmie powszech-

niej i wykazują bardziej uniwersalne zdolności do metylowania arginin w różnych białkach (działanie PRMT II dotyczy głównie histonów) [4]. Wykazano, że ekspresja PRMT I w komórkach śródbłonna zwiększa się w odpowiedzi na stres mechaniczny i siły ścinające (*shear stress*), a także wskutek działania ROS [6]. Metylacja arginin posiada wielkie znaczenie biologiczne [7, 8]. Najlepiej poznane jest znaczenie metylowania arginin w białkach chromatyny. W przypadku histonów proces ten jest jednym z elementów tzw. epigenetycznej regulacji ekspresji genów i wiąże się z modulowaniem dostępności DNA dla białek prowadzących transkrypcję i naprawę uszkodzeń DNA [7]. Zaburzenia epigenetycznej regulacji ekspresji genów coraz powszechniej uznaje się za jedno z głównych czynników sprzyjających rozwojowi nowotworów i przewlekłych schorzeń cywilizacyjnych [9, 10]. Należy podkreślić, że metylacji podlegają nie tylko białka chromatyny. Coraz więcej dowodów wskazuje na ważną rolę metylacji arginin w regulacji aktywności niektórych enzymów [11] i w umożliwianiu oddziaływań typu białko–białko uczestniczących w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnałów i transkrypcji genów, np. metylacji ulega receptor dla estrogenów i wiele ważnych czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w reakcje zapalne i immunologiczne [8, 12–15]. Nie do końca wiadomo, czy wytwarzanie ich jest stałe, zmienia się z aktywnością PRMT czy kluczową rolę odgrywa regulacja obrotu białek w komórce. Sama synteza metyloarginin przebiega zgodnie ze schematem: grupa metylowa przenoszona jest z S-adenozylometioniny na argininę z wytworzeniem metylowych pochodnych argininy oraz S-adenozylhomocysteiny, która w wyniku dalszych przemian zamienia się w homocysteinę (ryc. 1). Chociaż obie klasy PRMT przeprowadzają reakcję pojedynczej metylacji argininy, dołączenie drugiej reszty metylowej zachodzi nieco inaczej w przypadku klasy I i II. PRMT I odpowiadają za asymetryczną, a PRMT II za symetryczną metylację azotu w reszcie guanidynowej argininy, dlatego PRMT II należy łączyć głównie z produkcją SDMA, w mniejszym stopniu z L-NMMA, natomiast PRMT I, mającą zdolnością metylacji wielu białek, łączy się z wytwarzaniem głównie ADMA. Metyloargininy są usuwane z organizmu w postaci niezmienionej przez nerki i metabolizowane przez dimetyloaminohydrolazę dimetyloargininową (DDAH). Enzym ten przekształca je w cytrulinę i metyloaminę. DDAH posiada dwie izoformy, pierwsza występuje głównie w tkankach wykazujących ekspresję izoformy „neuronalnej” NOS (tkanka nerwowa, mięśnie szkieletowe, wątroba, nerki), druga w komórkach charakteryzujących się wysoką ekspresją „śródbłonkowej” NOS lub indukowanej izoformy NOS (śródbłonek naczyńniowy, serce, łożysko, komórki układu immunologicznego) [16]. Aktywność DDAH zależy od wielu czynników, a stres oksydacyjny, hiperhomocysteinemia czy wysokie stężenia ox-LDL zmniejszają jej aktywność [16, 17]. Na ekspresję DDAH może także wpływać wiele leków. Spośród metyloarginin SDMA nie hamuje NOS



Rycina 1. Synteza ADMA, SDMA i L-NMMA; Arg — arginina; PRMT — metylotransferaza argininy; SAM — S-adenozylometionina; SAH — S-adenozylhomocysteina; DDAH — dimetyloaminohydrolaza dimetyloarginylowa; ADMA — asymetryczna dimetyloarginina; SDMA — symetryczna dimetyloarginina; L-NMMA — N-monometyloarginina

(może jednak konkurować z L-argininą o jej dokomórkowy transporter). Ponadto w przeciwieństwie do ADMA i L-NMMA, SDMA jest eliminowana z ustroju wyłącznie drogą nerkową, natomiast nie jest substratem dla DDAH. Dotychczas nie ustalono, czy stres oksydacyjny nieodwracalnie hamuje DDAH. Co ciekawe, wykazano istnienie fizjologicznego ujemnego sprzężenia zwrotnego zapobiegającego nadmieremu wytwarzaniu NO — większe ilości NO (powstające np. podczas indukcji iNOS) hamują aktywność DDAH (zwiększa to komórkowe stężenia ADMA i prowadzi do zahamowania syntezy NO) [6, 17].

Spśród metyloarginin w najwyższych stężeniach w osoczu występuje ADMA [16]. Z kolei uważa się, że w tkankach wewnątrzkomórkowe stężenia ADMA i L-NMMA mogą być zbliżone i wówczas obie substancje należy brać pod uwagę jako znaczące inhibitory NOS [17]. Uważa się, że w wielu komórkach (np. w komórkach nerwowych i komórkach śródbłonna naczyń) stężenia ADMA przekraczają ponad 10-krotnie jej stężenia we krwi [17]. Ze względu na to, że SDMA nie hamuje znacząco NOS, a także stężenia SDMA w surowicy krwi i w komórkach są dużo niższe niż ADMA [18], do niedawna nie przywiązywano większej wagi do SDMA jako markera stresu oksydacyjnego. Dopiero Kiechl i wsp. [19] wykazali, że ADMA nie jest lepszym markerem w ocenie ryzyka

rozwoju chorób serca i naczyń niż SDMA. Należy jednak podkreślić, że ADMA jest nie tylko markerem schorzeń sercowo-naczyniowych, ale także ich ważnym czynnikiem sprawczym [20, 21]. Vallance i wsp. wykazali [22], że dotętnicze podanie ADMA powoduje zmniejszenie przepływu krwi w przedramieniu u zdrowych ochotników. Na podstawie innych badań stwierdzono, że podanie ADMA dożylnie (w postaci bolusa 3 mg/kg) zmniejsza częstotliwość rytmu serca i pojemność minutową serca, a zwiększa opór naczyń obwodowych oraz podnosi ciśnienie tętnicze [23]. Dotychczas wysuwane są jedynie sugestie co do sprawczego działania SDMA w schorzeniach nerek i układu sercowo-naczyniowego [24].

METYLOARGININY W NADCIŚNIENIU TĘTNYCZYM — ROLA STRESU OKSYDACYJNEGO

Związek między stresem oksydacyjnym a nadciśnieniem tętniczym, mimo wielu badań, pozostaje ciągle niedostatecznie wyjaśniony. Uważa się, że w rozwoju choroby mamy do czynienia z „błędym kołem” — ROS są przyczyną (wywołują rozwój nadciśnienia tętniczego) i skutkiem schorzenia (ich nadprodukcja jest np. wynikiem dysfunkcji śródbłonna w przebiegu nadciśnienia tętniczego). Stres oksydacyjny prowadzi do wzrostu oporu naczyniowego poprzez ograniczenie dostępności tlenu azotu, peroksydację lipidów błonowych i

upośledzenie rozkurczu oraz nasilenie proliferacji mięśni gładkich ściany naczynia. Podwyższone ciśnienie z kolei, np. poprzez działanie angiotensyny II [nadaktywność układu renina–angiotensyna–aldosteron (RAAS)], oksydazy ksantynowej (jej aktywność w ścianie naczyń wzrasta), stresu mechanicznego i siły ścinającej, wzmacnia działanie ROS na ścianę naczynia. Kluczowa dla wczesnych stadiów choroby wydaje się interakcja między stresem oksydacyjnym a śródbłonkiem.

Dysfunkcja śródbłonka polega na zmniejszeniu jego potencjału wazodylatoryjnego oraz wzroście aktywności prozapalnej i proagregacyjnej. Podstawowe mechanizmy obejmują zmniejszoną syntezę NO i stres oksydacyjny, który zmniejsza biodostępność NO. W 1980 r. Furchgott i Zawadzki wykazali, że śródbłonek naczyń wytwarza czynnik rozszerzający naczynia (EDRF, *endothelium-derived relaxing factor*) [25]. W 1987 r. Ignarro i wsp. zidentyfikowali, że tym czynnikiem jest NO [26]. Tlenek azotu jest obecnie uważany za kluczowy mediator regulujący czynność śródbłonka i utrzymujący homeostazę ściany naczyniowej. Powstaje w reakcji katalizowanej przez śródbłonkową syntazę NO. Tlenek azotu to nie tylko wazodylator, uczestniczy również w transmisji synaptycznej w centralnym i obwodowym układzie nerwowym i w reakcjach układu immunologicznego. Na poziomie subkomórkowym pełni także nie do końca poznaną rolę regulacyjną w mitochondriach. Anion ponadtlenkowy (O_2^-) niezwykle skutecznie „zmiata” NO, a w czasie tej reakcji powstaje bardzo reaktywny, uszkadzający białka nadtlenoazotyn ($ONOO^-$). Zmniejszona biodostępność NO zwiększa m.in. ekspresję cząsteczki adhezyjnej VCAM-1 na powierzchni komórek śródbłonka (głównie poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B). Cząsteczka VCAM-1 odpowiada za interakcję komórek śródbłonka z limfocytami T oraz monocytami, co sprzyja przechodzeniu tych komórek do ściany naczynia i zapoczątkowuje reakcję zapalną. Nasiloną ekspresja chemokiny MCP-1 (kolejny efekt zmniejszenia stężenia NO) przyciąga makrofagii, które fagocytują ox-LDL i zamieniają się w komórki piankowate. Stan zapalny i jeden z jego głównych mediatorów — TNF- α — powoduje w komórkach śródbłonka zaburzenia regulacji stabilności mRNA dla eNOS, co prowadzi do zmniejszenia ekspresji enzymu i syntezy NO. Powstawanie NO zależy również m.in. od dostępności jednego z kofaktorów reakcji — tetrahydrobiopteryny — oraz od endogennych kompetycyjnych inhibitorów NOS, jak ADMA czy L-NMMA. Istotny jest fakt, że pozbawiona dostępu do kofaktorów eNOS oprócz NO wytwarza również anion ponadtlenkowy (O_2^-), a więc staje się istotnym źródłem ROS.

Wiele dowodów świadczy o ważnej roli ADMA w patogenezie dysfunkcji śródbłonka i rozwoju nadciśnienia tętniczego [20, 21, 27]. Asymetryczna dimetyloarginina, oprócz bezpośredniego hamowania syntezy NO, wykazuje jeszcze jeden ważny z punktu widzenia patologii śródbłonka mechanizm, tj. zdolność do zwiększania syntezy nadtlenków [28, 29] i podwyższania ekspresji enzymu konwertującego angio-

tensynę (ACE) [30]. Z kolei zwiększone powstawanie angiotensyny II, poprzez stymulację jej receptorów (AT1R), powoduje spadek ekspresji DDAH i w konsekwencji przyrost stężenia ADMA [31].

Przydatność ADMA w surowicy krwi jako markera występowania schorzeń układu sercowo-naczyniowego oraz rolę ADMA w rozwoju patologii naczyniowych analizowano w wielu badaniach klinicznych. Miyazaki i wsp. [32] stwierdzili dodatnią korelację między stężeniem ADMA a wartościami średniego ciśnienia tętniczego (MAP) w grupie nieobciążonej żadnym ze schorzeń układu sercowo-naczyniowego. Wykazano, że ADMA prowadzi do wzrostu ciśnienia tętniczego, wywołuje skurcz naczyń i zwiększa adhezyjność komórek układu immunologicznego oraz płytek krwi do endotelium [22]. Bech i wsp. [33] wykazali również, że podanie L-NMMA powoduje redukcję wydalania sodu przez nerki, co prawdopodobnie istotnie wpływa na rozwój nadciśnienia tętniczego. Podkreśla się rolę NO w adaptacji osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym do diety wysokosodowej — podanie L-NMMA istotnie podnosiło ciśnienie tętnicze w tej grupie, a zaobserwowany efekt był bezpośrednio związany z sodowrażliwością [34]. W modelach zwierzęcych zwiększona podaż L-argininy w diecie — substratu dla produkcji NO, konkurującego z ADMA o miejsce aktywne NOS — spowalnia rozwój miażdżycy [35]. Wydaje się, że efekt ten może występować także u ludzi, chociaż w badaniu Adamsa i wsp. [36] nie stwierdzono, by suplementacja L-argininy przynosiła korzyści zdrowym, młodym mężczyznom. Podobnych obserwacji dostarczyło badanie Malczewskiej-Malec i wsp. [37], w którym ochotnikom chorym na pierwotne nadciśnienie tętnicze podawano dożylnie L-argininę — obniżenie ciśnienia tętniczego obserwowano tylko w pierwszym dniu 4-dniowej terapii, co przemawia za ograniczoną rolą suplementacji L-argininy w terapii nadciśnienia. Z kolei wykazano, że stężenie ADMA w surowicy odwrotnie koreluje z zależnym od funkcji śródbłonka wzrostem przepływu krwi w przedramieniu po podaniu acetylocholiny (podanie L-argininy w badaniu tym powodowało przywrócenie prawidłowego wzrostu przepływu) [38]. Z powyższych obserwacji może wynikać, że podawanie L-argininy zwiększa produkcję NO głównie w stanach jego niedoboru lub w sytuacji podwyższonego stężenia ADMA we krwi lub w komórkach (zwłaszcza w komórkach śródbłonka).

Osoby starsze z nadciśnieniem tętniczym charakteryzowały się znamienne wyższymi wartościami ADMA w surowicy w porównaniu z osobami bez nadciśnienia w tej samej grupie wiekowej. Zależności tej nie wykazano dla SDMA [24]. Interesujący jest również fakt, że podanie L-argininy przyczyniło się do poprawy odpowiedzi na acetylocholinę u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, a także u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym obciążonych rodzinnie nadciśnieniem tętniczym, u których występowało upośledzenie odpowiedzi naczyniorozkurczowej na acetylocholinę. Zjawiska

tego nie obserwowano u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym bez rodzinnego obciążenia tym schorzeniem [39]. Weber i wsp. [40] zaobserwowali, że stężenie ADMA w surowicy wiąże się ze sztywnością tętnic ocenianą za pomocą centralnego wskaźnika wzmocnienia fali tętna (Alx), jak również szyjno-udowej prędkości fali tętna. Podobne obserwacje dotyczą pacjentów w terminalnym stadium niewydolności nerek, u których stężenie ADMA korelowało z grubością kompleksu błony wewnętrznej i środkowej (IMT, *intima-media thickness*). Wykazano również, że ADMA koreluje z przyrostem IMT po 15-miesięcznej obserwacji, ale tylko u osób z wyjściowo prawidłową grubością kompleksu. Zoccali i wsp. [41] stwierdzili, że podwyższone wartości ADMA były niezależnym predyktorem przyrostu IMT.

Wiele mechanizmów, poprzez które stres oksydacyjny wpływa na funkcje śródbłonna i homeostazę ściany naczyniowej, poznano dzięki badaniom prowadzonym *in vitro*. Wykazano w nich m.in., że utlenowane lipoproteiny o niskiej gęstości wpływają proaterogennie na funkcję śródbłonna [42], komórek mięśni gładkich [43], monocytów i makrofagów [44] oraz fibroblastów [45]. Z kolei w badaniach *ex vivo* na królikach wykazano, że ox-LDL lokalizują się w apoptycznych blaszkach miażdżycowych. Wykazano również dodatnią korelację między zaawansowaniem miażdżycy i stężeniem przeciwciał przeciwko ox-LDL u myszy i u ludzi [46]. Co ważne, utlenowane lipoproteiny o niskiej gęstości wpływają również na ciśnienie tętnicze, wchodzą bowiem w interakcję z układem RAAS. Polega ona na zwiększeniu przez ox-LDL ekspresji ACE oraz receptora typu 1 dla angiotensyny II (AT1R) [47]. Badania przeprowadzone na ludzkich tkankach wykazały aktywację RAAS szczególnie w rejonie niestabilnych blaszek miażdżycowych [48]. Kolejnym dowodem na wzajemne interakcje ox-LDL i RAAS jest wpływ leczenia statynami na ekspresję AT1R. Inhibitory reduktazy HMG CoA obniżają stężenie ox-LDL i zmniejszają ekspresję receptora dla angiotensyny w komórkach mięśni gładkich i śródbłonna [49] zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u ludzi. Należy też nadmienić, że angiotensyna II zwiększa syntezę cholesterolu i oksydację LDL oraz wpływa na większą kumulację utlenionych lipoprotein w ścianie naczynia. Stres oksydacyjny odgrywa więc istotną rolę w aktywacji komórek śródbłonna (adhezja i migracja monocytów), proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich oraz fibroblastów (przerost ściany naczynia i zwężenie jego światła), a także jest odpowiedzialny za utlenianie lipoprotein o niskiej gęstości. Istnieje również bliski związek między ADMA a procesem miażdżycowym. Asymetryczna dimetyloarginina poprzez hamowanie syntezy NO nasila ekspresję MCP-1, chemokiny przyciągającej makrofagi, które z kolei fagocytują ox-LDL i zamieniają się w tzw. komórki piankowe.

FARMAKOTERAPIA A STRES OKSYDACYJNY

Wiele uznanych leków kardiologicznych (np. inhibitory ACE, statyny, niektórzy antagoniści kanałów wapniowych), korzy-

stając z bardzo różnych mechanizmów, wykazuje, oprócz swojego zasadniczego działania, zdolność do niwelowania stresu oksydacyjnego. Co ciekawe, ostatnio coraz częściej wskazuje się szlaki związane z powstawaniem i metabolizmem metylowanych arginin, jako potencjalne „cele” dla leków krążeniowych [21, 50–52]. Wykazano, że zarówno inhibitory ACE, jak i antagoniści receptorów dla angiotensyny II zmniejszają stężenie ADMA we krwi. Obie grupy leków niwelują nasilanie przez angiotensynę II wytwarzania ROS i zapobiegają ich wpływowi na ekspresję enzymów zaangażowanych w powstawanie i rozkład ADMA. Niektóre leki obniżające stężenie ADMA we krwi (nebiwolol, fibraty, pochodne witaminy A) mają zdolność do bezpośredniej indukcji enzymu rozkładającego ten aminokwas (DDAH) w komórkach ściany naczyń. Dla nebiwololu może to być ważny mechanizm odpowiedzialny za zwiększanie przez ten lek uwalniania NO z komórek śródbłonna. Z kolei tiazolidynodiony (np. rosiglitazon) — stosowane w leczeniu cukrzycy typu 2 — obniżają osoczowe stężenie ADMA poprzez zmniejszenie ekspresji enzymów odpowiedzialnych za metylację arginin. Kilka badań poświęconych wpływowi statyn na stężenie ADMA w surowicy przyniosło sprzeczne wyniki [21]. Należy dodać, że spadek stężenia ADMA we krwi występuje pod wpływem wielu leków (niacyna, metformina, estrogeny, witaminy B12 i B6, kwas foliowy, pochodne sulfonilomocznika), ale mechanizmy odpowiedzialne za wpływ poszczególnych substancji na metabolizm ADMA nie są jasne. Poszukiwanie leków zmniejszających powstawanie lub nasilających rozkład ADMA jest interesującym kierunkiem dla opracowania nowych leków krążeniowych.

PODSUMOWANIE

Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego. Zachwianie równowagi między czynnikami antyoksydacyjnymi a wolnymi rodnikami tlenowymi przyczynia się do uszkodzenia śródbłonna i sprzyja rozwojowi nadciśnienia tętniczego. Metylowane pochodne argininy w świetle aktualnych badań są postrzegane jako markery stresu oksydacyjnego, ale także jako czynniki aktywnie uczestniczące w patogenezie dysfunkcji śródbłonna i nadciśnienia tętniczego. Szlaki związane z ich syntezą mogą stanowić zatem nowe cele terapeutyczne w leczeniu nadciśnienia tętniczego.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

1. Harrison DG, Vinh A, Lob H et al. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol*, 2010; 10: 203–207.
2. Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE et al. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension*, 2010; 57: 132–140.
3. Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, 1999; 43: 542–548.

4. Bedford MT. Arginine methylation at a glance. *J Cell Sci*, 2007; 120: 4243–4246.
5. Krause CD, Yang ZH, Kim YS et al. Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, 2007; 113: 50–87.
6. Pope AJ, Karuppiak K, Cardounel AJ. Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol Res*, 2009; 60: 461–465.
7. Bonifer C, Cockerill PN. Chromatin mechanisms regulating gene expression in health and disease. *Adv Exp Med Biol*, 2011; 711: 12–25.
8. Lee YH, Stallcup MR. Minireview: protein arginine methylation of nonhistone proteins in transcriptional regulation. *Mol Endocrinol*, 2009; 23: 425–433.
9. Herceg Z, Vaissiere T. Epigenetic mechanisms and cancer: An interface between the environment and the genome. *Epigenetics*, 2011; 6: 804–819.
10. Ballestar E. An introduction to epigenetics. *Adv Exp Med Biol*, 2011; 711: 1–11.
11. Sims RJ, 3rd, Rojas LA, Beck D et al. The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science*, 2011; 332: 99–103.
12. Boisvert FM, Chenard CA, Richard S. Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation. *Sci STKE*, 2005; 2005(271): re2.
13. Hsu JM, Chen CT, Chou CK et al. Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation. *Nat Cell Biol*, 2011; 13: 174–181.
14. Infantino S, Benz B, Waldmann T et al. Arginine methylation of the B cell antigen receptor promotes differentiation. *J Exp Med*, 2010; 207: 711–719.
15. Parry RV, Ward SG. Protein arginine methylation: a new handle on T lymphocytes? *Trends Immunol*, 2010; 31: 164–169.
16. Palm F, Onozato ML, Luo Z et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007; 293: H3227–H3245.
17. Teerlink T, Luo Z, Palm F et al. Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res*, 2009; 60: 448–460.
18. Kielstein JT, Fliser D, Veldink H. Asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine: axis of evil or useful alliance? *Semin Dial*, 2009; 22: 346–350.
19. Kiechl S, Lee T, Santer P et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. *Atherosclerosis*, 2009; 205: 261–265.
20. Cooke JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med*, 2005; 10 (suppl. 1): S11–S17.
21. Sibal L, Agarwal SC, Home PD et al. The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rev*, 2010; 6: 82–90.
22. Vallance P, Leone A, Calver A et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, 1992; 339: 572–575.
23. Achan V, Broadhead M, Malaki M et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003; 23: 1455–1459.
24. Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC et al. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation*, 2003; 107: 1891–1895.
25. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373–376.
26. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 9265–9269.
27. Das UN, Repossi G, Dain A et al. L-arginine, NO and asymmetrical dimethylarginine in hypertension and type 2 diabetes. *Front Biosci*, 2011; 16: 13–20.
28. Sharma M, Zhou Z, Miura H et al. ADMA injures the glomerular filtration barrier: role of nitric oxide and superoxide. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009; 296: F1386–F1395.
29. Veresh Z, Racz A, Lotz G et al. ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NAD(P)H oxidase pathway. *Hypertension*, 2008; 52: 960–966.
30. Suda O, Tsutsui M, Morishita T et al. Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004; 24: 1682–1688.
31. Luo Z, Teerlink T, Griendling K et al. Angiotensin II and NADPH oxidase increase ADMA in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 2010; 56: 498–504.
32. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*, 1999; 99: 1141–1146.
33. Bech JN, Nielsen CB, Pedersen EB. Effects of systemic NO synthesis inhibition on RPF, GFR, UNa, and vasoactive hormones in healthy humans. *Am J Physiol*, 1996; 270: F845–F851.
34. Barba G, Vallance PJ, Strazzullo P et al. Effects of sodium intake on the pressor and renal responses to nitric oxide synthesis inhibition in normotensive individuals with different sodium sensitivity. *J Hypertens*, 2000; 18: 615–621.
35. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999; 33: 652–658.
36. Adams MR, Forsyth CJ, Jessup W et al. Oral L-arginine inhibits platelet aggregation but does not enhance endothelium-dependent dilation in healthy young men. *J Am Coll Cardiol*, 1995; 26: 1054–1061.
37. Malczewska-Malec M, Goldsztajn P, Kawecka-Jaszcz K et al. Effects of prolonged L-arginine administration on blood pressure in patients with essential hypertension (EH). *Agents Actions Suppl*, 1995; 45: 157–162.
38. Perticone F, Sciacqua A, Maio R et al. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2005; 46: 518–523.
39. Schlaich MP, Parnell MM, Ahlers BA et al. Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. *Circulation*, 2004; 110: 3680–3686.
40. Weber T, Maas R, Auer J et al. Arterial wave reflections and determinants of endothelial function: a hypothesis based on peripheral mode of action. *Am J Hypertens*, 2007; 20: 256–262.
41. Zoccali C, Benedetto FA, Maas R et al. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13: 490–496.
42. Li D, Liu L, Chen H et al. LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 2003; 107: 612–617.
43. Lin SJ, Yen HT, Chen YH et al. Expression of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in oxLDL-treated human aortic smooth muscle cells and in the neointima of cholesterol-fed endothelium-denuded rabbits. *J Cell Biochem*, 2003; 88: 836–847.
44. Furman C, Rundlof AK, Larigauderie G et al. Thioredoxin reductase 1 is upregulated in atherosclerotic plaques: specific induction of the promoter in human macrophages by oxidized low-density lipoproteins. *Free Radic Biol Med*, 2004; 37: 71–85.
45. Maziere C, Meignotte A, Dantin F et al. Oxidized LDL induces an oxidative stress and activates the tumor suppressor p53 in MRC5 human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 276: 718–723.
46. Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 41: 360–370.
47. Li D, Saldeen T, Romeo F et al. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation*, 2000; 102: 1970–1976.
48. Gross CM, Gerbaulet S, Quensel C et al. Angiotensin II type 1 receptor expression in human coronary arteries with variable degrees of atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*, 2002; 97: 327–333.
49. Nickenig G, Baumer AT, Temur Y et al. Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation*, 1999; 100: 2131–2134.
50. Bełtowski J, Kędra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep*, 2006; 58: 159–178.
51. Maas R. Pharmacotherapies and their influence on asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Vasc Med*, 2005; 10 Suppl 1: S49–S57.
52. Trocha M, Szuba A, Merwid-Ład A et al. Effect of selected drugs on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels. *Pharmazie*, 2010; 65: 562–571.

Pochodne 1,4-dihydropirydyny jako „struktury uprzywilejowane” i ich potencjał farmakologiczny

Derivatives of 1,4-dihydropyridines as “privileged structures” and their pharmacological potential

Michał Żorniak, Katarzyna Mitrega, Tadeusz F. Krzemiński

Katedra i Zakład Farmakologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Streszczenie

Pochodne 1,4-dihydropirydyny należą do grupy antagonistów kanału wapniowego i stanowią liczną rodzinę leków o potwierdzonej skuteczności w terapii nadciśnienia tętniczego. Szczególna struktura cząsteczkowa i obecność wysoce reaktywnych grup podstawnikowych sprawia, że 1,4-dihydropirydyny zalicza się do tzw. „struktur uprzywilejowanych”, cechujących się możliwością ingerencji w ich budowę i zmiany właściwości farmakologicznych. Dotyczy to nie tylko nowych pochodnych, ale również metabolitów tych leków. Szczególnie interesującym przykładem są wyniki prac eksperymentalnych nad metabolitami furnidypiny, które wykazują odmienny profil działania oraz są pozbawione niektórych działań niepożądanych leku macierzystego. Artykuł zwraca uwagę na potencjalne, nowe możliwości wykorzystania pochodnych 1,4-dihydropirydyny, a także ich metabolitów jako środków o bardziej „celowanym” efekcie terapeutycznym.

Słowa kluczowe: 1,4-dihydropirydyny, kardiologia eksperymentalna, „struktury uprzywilejowane”

Abstract

Derivatives of 1,4-dihydropyridine belong to group of calcium channel blockers and remain large group of antihypertensive agents. Particular chemical structure and presence of highly reactive binding groups make 1,4-dihydropyridines “privileged structures”, which can be modified and change their pharmacological effects. This fact applies to new derivatives as well as metabolites of those drugs. Particularly interesting are outcomes of experiments with metabolites of furnidypine, which tend to cause different pharmacological effect, as well as have different profile of adverse effects from mother drug. Our paper concerns with potential new possibilities of using derivatives of 1,4-dihydropyridines, as well as their metabolites, as agents of more “optimised” effect.

Key words: 1,4-dihydropyridines, experimental cardiology, “privileged structures”

Kardiol Pol 2011; 69, supl. III: 100–103

WSTĘP

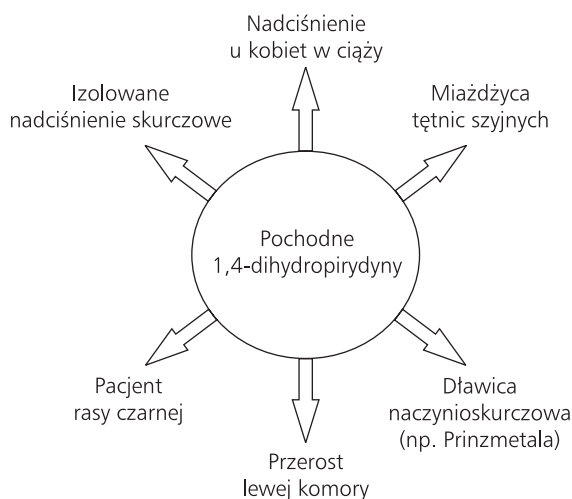
Pochodne 1,4-dihydropirydyny stanowią największą i najbardziej różnorodną grupę leków należących do rodziny antagonistów kanału wapniowego i posiadają ugruntowaną pozycję w terapii nadciśnienia tętniczego. Ich podstawowy efekt działania uzyskuje się poprzez antagonizm wobec napięciowozależnych kanałów

wapniowych typu L i hamujący wpływ na przez błonowy napływ jonów wapnia. Co charakterystyczne, w zależności od budowy występują różnice w miejscach i mechanizmach wpływu na przepływ jonów Ca^{2+} . Wynika to najprawdopodobniej ze zróżnicowania molekularnej budowy zarówno kanałów wapniowych, jak i struktury chemicznej dostępnych dihydropirydyn [1].

Adres do korespondencji:

lek. Michał Żorniak, Katedra i Zakład Farmakologii, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jordana 19, 41–800 Zabrze-Rokitnica, e-mail: rzurio@interia.pl

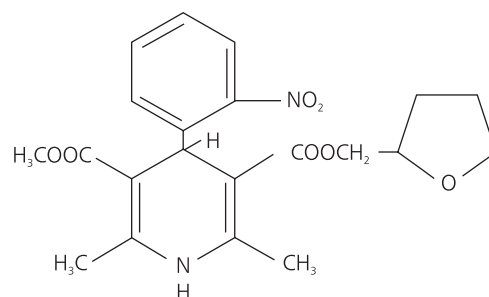
Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne



Rycina 1. Stany przemawiające za zastosowaniem dihydropirydyn jako leków hipotensyjnych

Antagoniści kanałów wapniowych znajdują zastosowanie w wielu schorzeniach kardiologicznych, przede wszystkim w terapii nadciśnienia tętniczego. Do stanów szczególnie przemawiających za stosowaniem leków z grupy pochodnych 1,4-dihydropirydyny jako preferowanych preparatów hipotensyjnych należą m.in. izolowane nadciśnienie skurczowe (szczególnie u osób w podeszłym wieku), dławica piersiowa o podłożu naczynioskurczowym (np. dławica Prinzmetal), przerost lewej komory, miażdżyca tętnic szyjnych, ciąża czy nadciśnienie u pacjentów rasy czarnej (ryc. 1) [2]. Dodatkowo warto zwrócić uwagę na pleiotropowe, korzystne działania dihydropirydyn, takie jak wpływ na śródbłonek naczyniowy i uwalnianie tlenu azotu [3], hamowanie agregacji płytek [4], czy działanie przeciwmiażdżycowe i antyoksydacyjne [5]. Generalnie jednak ta grupa leków wydaje się w ostatnich latach tracić na znaczeniu. Wynika to po części z profilu działań niepożądanych wywoływanych przez pochodne 1,4-dihydropirydyny. Składają się na to: bóle głowy, nagłe zaczerwienienie twarzy, zawroty głowy i występowanie obrzęków obwodowych. Także przy wskazaniach do szybkiego obniżenia ciśnienia krwi w przypadku wystąpienia przełomu nadciśnieniowego, stosowanie nifedypiny jest kontrowersyjne ze względu na możliwy odruchowy wzrost aktywności układu współczulnego z towarzyszącą tachykardią [1]. Z tego powodu oraz z powodu istnienia innych skutecznych i dobrze tolerowanych leków hipotensyjnych doszło do stopniowego zawężania wskazań do stosowania pochodnych dihydropirydyny.

Z kolei istnieją liczne przesłanki na temat nowych potencjalnych korzyści ze stosowania tej grupy leków. Co prawda tradycyjnie uważa się, że spośród antagonistów kanału wapniowego w terapii arytmii zastosowanie znajdują leki z grupy werapamilu i diltiazemu, jednak istnieją doniesienia na temat korzystnego wpływu pochodnych dihydropirydyny w



Rycina 2. Struktura dihydropirydyn na przykładzie furnidypiny

terapii arytmii związanych z niedokrwieniem mięśnia sercowego, a także w miażdżycy [6–12]. Spośród wskazań pozakardiologicznych zwraca uwagę korzystny wpływ w leczeniu dyskinez występujących w czasie terapii neuroleptykami [13], a także potencjalnie nefroprotektoryjny wpływ w cukrzycy typu 2 [14]. Ponadto wyniki niektórych badań wskazują na szczególnie istotną rolę metabolitów i pochodnych niektórych leków z tej grupy w występowaniu powyższych cech [14, 15]. Świadczy to o dużym potencjale farmakologicznym grupy 1,4-dihydropirydyn i ich metabolitów, wśród których mogą się znajdować związki kandydujące wręcz do miana potencjalnych leków. W niniejszej pracy skupiono się na analizie pochodnych 1,4-dihydropirydyn pod kątem ewentualnych nowych możliwości ich zastosowania, ze szczególnym uwzględnieniem metabolitów furnidypiny.

1,4-DIHYDROPIRYDYN JAKO „STRUKTURY UPRIWILEJOWANE”

Termin „struktury uprzywilejowane” (*privileged structures*) został wprowadzony po raz pierwszy w 1988 r. przez Evansa i wsp. [16], którzy opisali powinowactwo 3-(Acylamino)-5-phenyl-2H-1,4-benzodwuzepin jako selektywnych antagonistów receptora dla peptydowego hormonu cholecystokiny. W tym przypadku celowane modyfikacje cząsteczki leków zaliczanych do klasy anksjolityków skutkowały pojawieniem się aktywności wobec zupełnie innych receptorów. Właściwości strukturalnego jądra 1,4-dihydropirydyn, z obecnością wysoce reaktywnych grup podstawnikowych, takich jak grupa nitrowa czy etylowana grupa karboksylowa, decydują o możliwości ingerencji i ewentualnych zmian budowy, a także cech farmakologicznych (ryc. 2). Ta szczególna sytuacja sprawia, że 1,4-dihydropirydyny zalicza się do powyższych „struktur uprzywilejowanych”, których budowa może służyć jako swego rodzaju „rusztowanie”, a odpowiednie modyfikacje grup podstawnikowych powodują oddziaływanie na inne receptory, takie jak kanały potasowe czy sodowe [17]. Zmiany mogą w efekcie prowadzić do uzyskania nowych właściwości farmakologicznych. Szczególnie zachęcające są pod tym względem wnioski z doświadczeń nad metabolitami innych „struktur uprzywilejowanych”, takich jak np.

Tabela 1. Wpływ 1,4-dihydropirydyn na receptory inne niż kanały wapniowe

Receptory	Aktywność
β -adrenergiczne	Blokada
Tromboksan	Blokada
NMDA	Blokada
Histaminowy H2	Blokada
Endotelina	Blokada
Muskarynowe m1 i m3	Blokada
Pregnan X	Aktywacja

wspomniane wcześniej benzodwuzepiny, których modyfikacje strukturalne również prowadziły do uzyskania aktywnych związków [18].

Prace nad najlepiej poznaną dihydropirydyną — nifedypiną (*Nitro pH(F)Eyl DihydroPyridINE*) doprowadziły do poznania innych, bardziej tkankowo-specyficznych pochodnych, takich jak nitrendypina czy nimodipina. Badania nad miejscami wiążącymi leki z tej grupy wskazują na istnienie miejsc receptorowych ściśle związanych z kanałami wapniowymi w wielu tkankach, takich jak np. mięśniówka gładka, poprzecznie prążkowana czy mięśnia sercowego, a także struktur mózgowia czy linii klonalnej komórek P12 w guzie chromochłonny nadnerczy [19]. Ponadto dostrzeżono aktywność 1,4-dihydropirydyn wobec innych receptorów niż kanały wapniowe (tab. 1) [17]. Modyfikacje strukturalne podstawników i ingerencja w cząsteczkowy „szkielet” tych leków mogą skutkować zwiększeniem powinowactwa do wybranych receptorów.

Powyższe spostrzeżenia sugerują także wielokierunkowe działanie pochodnych 1,4-dihydropirydyny, które musi być uwzględniane szczególnie przy wykorzystywaniu tej grupy leków do badań w zakresie farmakologii eksperymentalnej. Ponadto mimo wykazanej korelacji miejsc wiążących na receptorach z efektami farmakologicznymi tej grupy leków w wielu tkankach, takich jak np. tkanka mózgowia, istnieją pewne sprzeczności między miejscem wiązania a obserwowanym wpływem dihydropirydyn. Również w badaniach nad izolowanymi komórkami mięśnia sercowego dostrzeżono słabszy od spodziewanego wpływ nitrendypiny na jej miejsce wiążące, co jednak może być tłumaczone zmianami strukturalnymi w obrębie receptora w czasie ekstrakowania komórek do badania [20].

Szczególnie interesujące pod kątem kardiologicznym są badania nad korzystnymi właściwościami metabolitów furnidypiny. Furnidypina należy do leków cechujących się dobrą biodostępnością po podaniu doustnym oraz wysokim wskaźnikiem terapeutycznym, potwierdzonym w badaniach przedklinicznych. Ponadto, poza działaniem hipotensyjnym, po-

siada pozytywny, kardioprotekcyjny i antyarytmiczny wpływ w modelu wczesnych arytmii reperfuzyjnych [21]. W porównaniu z wyżej wspomnianą nifedypiną odznacza się bardziej korzystnym profilem działania, głównie ze względu na mniejsze działanie kardiodepresyjne i silne rozszerzanie naczyń wieńcowych [15]. Co więcej, oksydowane metabolity tego leku: M-2 i M-3 wywierały odmienne działania w porównaniu z lekiem matczynym i cechowały się innymi właściwościami farmakokinetycznymi. Metabolit M-2 nie wpływał na częstość akcji serca ani nie powodował obniżenia ciśnienia tętniczego krwi, natomiast zarówno M-2, jak i M-3 działały kardioprotekcyjnie, chroniąc izolowane kardiomiocyty przed hipoksją, uszkodzeniem struktury komórkowej czy przeładowaniem jonami wapnia [15]. Ponadto furnidypina cechuje się relatywnie krótkim okresem półtrwania w osoczu, natomiast stężenia jej metabolitów dłużej utrzymują się na wysokim poziomie [15]. Powyższe obserwacje sugerują udział wymienionych metabolitów jako składowych czynników, które kształtują wypadkową efektu terapeutycznego wywieranego przez furnidypinę. Brak określonych działań niepożądanych, przede wszystkim działania depresyjnego na ciśnienie tętnicze, sugeruje możliwość wykorzystania metabolitów tej dihydropirydyny jako leków o bardziej „celowanym” profilu, jak również lepiej tolerowanych przez pacjenta. Przykładem takiego „celowanego” działania może być zmniejszenie negatywnego wpływu na ciśnienie systemowe i odruchowej tachykardii, przy zachowaniu działania kardioprotekcyjnego, jakie wykazuje metabolit M-2 furnidypiny. Ponadto ze względu na powyższe działania plejotropowe i wpływ na różnorodne układy i receptory odpowiednie modyfikacje strukturalne mogą wpłynąć na zwiększenie korzyści ze stosowania pochodnych i metabolitów 1,4-dihydropirydyn, jak np. działania na śródbłonek naczyń i uwalnianie tlenu azotu czy elementy hemostazy, jak również działania przeciwmiażdżycowego, antyoksydacyjnego i przeciwwzapalnego.

PODSUMOWANIE

Antagoniści kanałów wapniowych należący do grupy pochodnych 1,4-dihydropirydyny stanowią cenną grupę leków bardzo często stosowanych w terapii nadciśnienia tętniczego, chociaż coraz rzadziej w leczeniu innych schorzeń układu sercowo-naczyniowego. Ponadto zalicza się je do specyficznej grupy „struktur uprzywilejowanych” ze względu na łatwo modyfikowalną strukturę i obecność wysoce reaktywnych grup podstawnikowych. Ponadto metabolity i zmodyfikowane strukturalnie 1,4-dihydropirydyny stanowią potencjalne źródło nowych leków, które mogą się odznaczać bardziej korzystnym profilem działania od związków macierzystych. Obiecujące wyniki doświadczeń nad właściwościami antyarytmicznymi metabolitów furnidypiny sugerują konieczność dalszych badań zarówno w obrębie eksperymentalnych modeli zwierzęcych, jak i w przyszłości — badań klinicznych.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

1. Hoffman BB. Terapia nadciśnienia tętniczego krwi. In: Bruton LL, Lazo JS, Parker KL eds. *Farmakologia Goodmana & Gilmana*. Wyd. pol. pod red. Buczko W, Krzemiński TF, Czuczwar SJ. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2007; 910–911.
2. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A et al. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology. *J Hypertens*, 2007; 25: 1105–1187.
3. Crespi F. Dihydropyridines, nitric oxide and vascular protection. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005; 3: 195–205.
4. Mehta JL. Influence of calcium-channel blockers on platelet function and arachidonic acid metabolism. *Am J Cardiol*, 1985; 55: 158B–164B.
5. Gaviraghi G, Micheli D, Trist DG. Recent developments in the use of calcium antagonists in myocardial protection. *Pharmacol Res*, 1995; 31: 251–254.
6. Thandroyen FT. Protective actions of calcium channel antagonist agents against ventricular fibrillation in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1982; 14: 21–32.
7. Crome R, Hearse DJ, Manning AS. Ischemia- and reperfusion-induced arrhythmias: beneficial actions of nifedipine. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1986; 8: 1249–1256.
8. Lichtlen PR, Hugenholz PG, Rafflenbeul W et al. Retardation of coronary artery disease in man by the calcium channel blocker nifedipine. Results of INTACT (International Nifedipine Trial on Antiatherosclerotic Therapy). *Cardiovasc Drug Ther*, 1990; 4: 1047–1068.
9. Lüscher TF, Yang Z. Calcium antagonists and ACE inhibitors. Effect on endothelium and vascular smooth muscle. *Drugs*, 1993; 46: 121–132.
10. Ferrari R, Cucchini F, Bolognesi R et al. How do calcium antagonists differ in clinical practice? *Cardiovasc Drug Ther*, 1994; 8: 565–575.
11. Opie LH. Myocardial stunning: are calcium antagonists useful? *Cardiovasc Drug Ther*, 1994; 8: 533–541.
12. Opie LH, Yusuf S, Kübler W. Current status on safety and efficacy of calcium channel blockers in cardiovascular diseases: A critical analysis based on 100 studies. *Prog Cardiovasc Dis*, 2000; 43: 171–196.
13. Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Protective effect of L-type calcium channel blockers against haloperidol-induced orofacial dyskinesia: a behavioural, biochemical and neurochemical study. *Neurochem Res*, 2008; 33: 1869–1880.
14. Briede J, Stivrina M, Stoldere D, et al. Effect of cerebrocrast on body and organ weights, food and water intake, and urine output of normal rats. *Cell Biochem Funct*, 2008; 26: 908–915.
15. Krzemiński TF, Hudziak D, Sielańczyk AW et al. Differential effects of flunaridol and its active metabolites in rat isolated working heart. *Vascul Pharmacol*, 2008; 49: 91–96.
16. Evans BE, Rittle KE, Bock MG et al. Methods for drug discovery: Development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem*, 1988; 31: 2235–2246.
17. Triggle DJ. 1,4-dihydropyridines as calcium channel ligands and privileged structures. *Cell Mol Neurobiol*, 2003; 23: 293–303.
18. Wiley RA, Rich DH. Peptidomimetics derived from natural products. *Med Res Rev*, 1993; 13: 327–384.
19. Towart R, Schramm M. Recent advances in the pharmacology of the calcium channel. *Trends Pharmacol Sci*, 1984; 5: 111–113.
20. Lee KS, Tsien RW. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature*, 1983; 302: 790–794.
21. Krzemiński TF, Grzyb J, Porc MP et al. Anti-arrhythmic cardioprotective effects of flunaridol in rat model: A dose response study. *Eur J Pharmacol*, 2006; 549: 91–97.

Złożony profil odruchowej odpowiedzi na nurkowanie

Complex profile of the reflex diving response

Tomasz H. Wierzbą, Arkadiusz Ropiak

Katedra i Zakład Fizjologii, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

Streszczenie

Zatrzymanie oddychania skojarzone z oziębieniem twarzy inicjuje sekwencję odruchowych odpowiedzi układu sercowo-naczyniowego, określaną jako odruch na nurkowanie. Podstawowymi efektami odpowiedzi odruchowej są zwolnienie rytmu serca i skurcz naczyń obwodowych ze wzrostem ciśnienia tętniczego, prowadzące do centralizacji krążenia, preferencyjnie zabezpieczającej dopływ krwi do mózgu i serca. Reakcja odruchowa wykazuje znaczną zmienność osobniczą i podatność na warunki środowiskowe, a jej indywidualny zakres często trudno przewidzieć. Niekorzystnym, czasami fatalnym powikłaniem reakcji odruchowej są zaburzenia rytmu serca. W niniejszej pracy podsumowano okoliczności, mechanizmy i przebieg odruchu na nurkowanie, ze szczególnym uwzględnieniem skutków praktycznych, w tym czynników ryzyka krytycznych zaburzeń rytmu serca wywołanych podczas nurkowania.

Słowa kluczowe: odruch na nurkowanie, odruch na oziębienie twarzy, zatrzymanie oddechu, bezdech, hipoksja, bradykardia, układ autonomiczny, regulacja krążenia, arytmia

Abstract

Breath-holding coupled with face cooling triggers a set of the reflex cardiovascular responses, defined as a diving reflex. The major reflex responses include a decrease in heart rate and peripheral vasoconstriction with an increase of arterial pressure to evoke central blood pooling with preferential provision of the brain and heart perfusion. Due to high individual variability and situational dependence the individual course of the reflex response is hardly predictable. Heart rhythm disturbances are the major, sometimes fatal complications of the response. This review is an outline of causing factors, circumstances, mechanisms and the effects of the diving reflex and their practical implications, including risk factors of the critical arrhythmias occurred in diving.

Key words: diving reflex, facial cooling reflex, breath-holding, apnea, hypoxia, bradycardia, autonomic regulation, cardiovascular regulation, arrhythmia

Kardiol Pol 2011; 69, supl. III: 104–114

ODRUCH NA NURKOWANIE JAKO ZŁOŻONY ODRUCH KARDIODEPRESYJNY

Odruchy kardiodepresyjne, w których podstawową odpowiedzią jest zwolnienie częstotliwości rytmu serca (HR), wzbudzają duże zainteresowanie ze względu na częste występowanie okoliczności inicjujących odpowiedź odruchową, niejednokrotnie spektakularny przebieg, nie do końca poznane mechanizmy oraz współistniejące ryzyko nagłego zgonu [1].

Zatrzymanie oddychania połączone z oziębieniem twarzy, do czego typowo dochodzi podczas nurkowania bez użycia aparatu tlenowego, wywołuje złożoną odpowiedź odruchową, określaną mianem odruchu na nurkowanie, na którą składa się zwolnienie HR, zmniejszenie rzutu serca przy zachowanej lub zwiększonej objętości wyrzutowej, skurcz naczyń obwodowych prowadzący do wzrostu ciśnienia tętniczego i centralizacji krążenia, preferencyjnie zabezpieczającej dopływ

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Tomasz Wierzbą, Katedra i Zakład Fizjologii, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębinki 1, 80–211 Gdańsk, tel: +58 349 15 20, faks: +58 349 15 21, e-mail: twierzbą@gumed.edu.pl

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

krwi do mózgu i serca [2, 3]. Charakterystyczny profil odpowiedzi na zanurzenie głowy połączone z zatrzymaniem oddechu sprawia, że opracowano próby czynnościowe, które znalazły zastosowanie w dydaktyce, poszukiwaniach badawczych, a do niedawna w doraźnym postępowaniu terapeutycznym [4, 5].

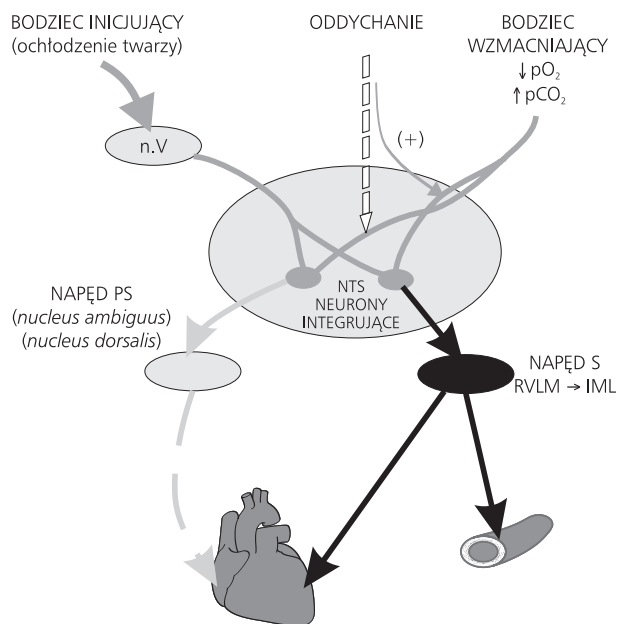
Nurkowanie, które jest od niepamiętnych czasów zajęciem użytkowym, stało się także wyzwaniem do testowania własnych możliwości, wykorzystywanym w różnych rodzajach współzawodnictwa o charakterze rekreacyjnym i sportowym. W babilońskim eposie zachowanym na glinianych tabliczkach z XVIII w p.n.e. tytułowy bohater, Gilgamesz, nurkuje na dno morza, żeby zdobyć ziele nieśmiertelności dla zmarłego przyjaciela, a na asyryjskich płaskorzeźbach sprzed niemal 3000 lat zachowały się wizerunki nurkujących poławiaczy perel i ryb oraz wojowników wykorzystujących podczas zanurzenia worki wypełnione powietrzem.

PODŁOŻE ODPOWIEDZI ODRUCHOWEJ

Czynnikami inicjującymi odruchową odpowiedź sercową są: pobudzenie obwodowych chemoreceptorów i centralnych chemodetektorów przez hiperkapnię i hipoksję, podrażnienie zimnem zakończeń nerwowych na powierzchni twarzy, a także pobudzenie baroreceptorów tętniczych przez wzrost ciśnienia tętniczego. Ponadto, podczas głębokiego nurkowania bez użycia skafandra ciśnieniowego często dochodzi do mechanicznego pobudzenia baroreceptorów zatoki szyjnej lub lokalnych włókien nerwu błędnego, przez bezpośredni ucisk ciśnieniowy.

Mechanizm odpowiedzi odruchowej zawiera pozorny paradoks: podczas nurkowania dochodzi do równoczesnego pobudzenia układu współczulnego i dosercowych projekcji przywspółczulnych (ryc. 1) [6].

Bradykardia jest pochodną aktywacji dosercowych włókien nerwu błędnego, obkurczenie naczyń i wzrost ciśnienia tętniczego wynikają zaś z pobudzenia obwodowych włókien współczulnych. Zahamowanie HR w odpowiedzi na hipoksję, obserwowane u wielu zwierząt, w tym u większości gryzoni, uważa się za filogenetycznie pierwotną odpowiedź sercową na niedobór tlenu. Przy zachowanym oddychaniu, hipoksja wywołuje u człowieka najczęściej przyspieszenie HR w stopniu proporcjonalnym do niedoboru tlenu [6, 7]. Czynniki napęd oddechowy hamuje odpowiedź kardiodepresyjną na poziomie interneuronów jądra pasma samotnego (NTS) w rdzeniu przedłużonym (ryc. 1) [8]. Jednak przy zahamowaniu oddychania pobudzenie chemoreceptorów daje efekt chronotropowy ujemny, a w wywołanie odruchowej bradykardii są zaangażowane jądro dwuznaczne (*nucleus ambiguus*) i jądro grzbietowe (*nucleus dorsalis*) nerwu błędnego [9]. Należy zaznaczyć, że włókna przywspółczulne, docierające do serca w gałązkach nerwu błędnego, zaopatrują w dominujący sposób przedsionki serca i znaczną część układu bodźcoprzewodzącego w obrębie przegrody międzykomorowej [10]. Pobudzenie tych włókien hamuje automatyzm



Rycina 1. Uproszczony model organizacji odruchu na nurkowanie; n.V — nerw trójdzielny; NTS — jądro pasma samotnego nerwu błędnego; PS — przywspółczulny; S — współczulny; RVLN — przedni dolno-boczny obszar rdzenia przedłużonego; IML — jądro pośrodkowo-boczne rdzenia kręgowego; kolorem czarnym oznaczono włókna S; linia przerywana odpowiada działaniu hamującemu

naturalnych rozruszników przedsionkowych: węzłów zatokowo-predsionkowego i przedsionkowo-komorowego, co prowadzi do zwolnienia HR. Wagotonia hamuje przewodzenie fali przewodzenia z przedsionków do komór, prowadząc do zmniejszenia szybkości rozprzestrzeniania fali pobudzenia w komorach serca, co z kolei skutkuje zmniejszeniem synchronizacji skurczu i mniejszą dynamiką jego narastania. Przy znacznej zmienności osobniczej unerwienia przywspółczulnego serca oraz jego podatności na endogenne czynniki modulujące (niedokrwienie, neuropatie, zaburzenia metaboliczne, starzenie) [11–14], rozrusznik pierwszorzędowy serca, zlokalizowany w węzle zatokowo-predsionkowym, wykazuje zazwyczaj większą podatność na hamujące działanie nerwu błędnego niż komórki bodźcotwórcze węzła przedsionkowo-komorowego. Przy znaczącym pobudzeniu przywspółczulnym, częstotliwość rytmu pobudzeń generowanego przez węzeł zatokowo-predsionkowy często zmniejsza się poniżej chwilowej częstotliwości węzła przedsionkowo-komorowego, który przejmuje funkcję głównego rozrusznika serca. Jeżeli w przebiegu reakcji odruchowej dochodzi także do istotnego zahamowania rozrusznika drugorzędowego, to występują warunki do ujawnienia dotychczas przytłumionej bodźcotwórczości w obrębie komór serca, czego przejawem są pobudzenia dodatkowe pochodzenia komorowego [13]. Ujawnieniu automatyzmu w obrębie komór serca sprzyja noradrenalina uwolniona z pobudzonych zakończeń włókien

współczulnych. Zahamowanie przewodzenia w układzie bódźcprzewodzącym może prowadzić do nagłej asystolii [13, 15].

Dosercowe włókna współczulne zaopatrują zarówno przedsionki, jak i komory serca. Na poziomie przedsionków uwidacznia się wyraźna przewaga czynnościowa włókien przywspółczulnych. Przy równoczesnym pobudzeniu dosercowych włókien współczulnych i przywspółczulnych zazwyczaj dochodzi do zwolnienia HR. Zmniejszenie pojemności minutowej podczas odruchu na nurkowanie jest przede wszystkim pochodną zwolnienia HR. Maksymalne napięcie rozwijane w skurczu przez mięśniówkę komór nie tylko nie ulega zmniejszeniu, ale zwykle wzrasta wskutek bezpośredniego działania noradrenaliny uwolnionej w mięśniówce komór z pobudzonych zakończeń włókien współczulnych, a także w następstwie zwiększenia obciążenia następczego wywołanego skurczem obwodowych naczyń tętniczych (komponenta naczyniowa odruchu na nurkowanie).

ODRUCHOWE REAKCJE NA ZIMNO

Oziębienie twarzy, zwłaszcza przedsionka nosa [16], wywołuje niezależną odpowiedź odruchową, której efektami są bradykardia i skurcz obwodowych naczyń tętniczych prowadzący do centralizacji krążenia, wzrostu ciśnienia tętniczego i istotnego zwiększenia perfuzji mózgowej [3, 17–20]. Odruch, inicjowany przez pobudzenie powierzchniowych zakończeń czuciowych nerwu trójdzielnego, należący do tzw. odruchów trójdzielno-sercowych [21], potęguje reakcję kardiodepresyjną na hipoksję przy zatrzymanym oddychaniu [22], zwiększając ryzyko wyzwolenia arytmii lub asystolii [15]. Badania doświadczalne polegające na stymulacji elektrycznej zakończeń nerwowych przedsionka nosa, jak również obserwacje poczynione podczas zabiegów chirurgicznych w obrębie twarzoczaszki ujawniły, że pobudzenie czuciowych zakończeń nerwowych w tej okolicy, także przez bodźce nieswoiste może zainicjować głęboką bradykardię, do asystolii włącznie, ze spadkiem ciśnienia tętniczego i pobudzeniem motoryki żołądka [21, 22]. Pospolitym czynnikiem drażniącym, o potencjalnie niekorzystnym wpływie na odpowiedź sercową na nurkowanie, może być nieswoiste zapalenie błony śluzowej nosa (*rhinitis*), w którego przebiegu dochodzi do zwiększonego pobudzenia włókien przywspółczulnych zainicjowanego zanurzeniem głowy w wodzie [23]. Po kilku, a czasem kilkunastu sekundach od zatrzymania krążenia dochodzi do utraty przytomności, co wiąże się z utratą świadomej kontroli nad czynnościami fizjologicznymi, w tym kontroli świadomego zatrzymania oddychania. Podczas zanurzenia w wodzie prowadzi to do zachłyśnięcia, które wywołuje kolejną reakcję kardiodepresyjną, znacznie ograniczającą szansę przywrócenia prawidłowej HR [1, 8, 24]. Czynnikiem nieznacznie wydłużającym czas od rozpoczęcia asystolii do utraty przytomności jest odruchowa redystrybucja krwi w układzie sercowo-naczyniowym, preferencyjnie zabezpieczająca perfuzję mózgową. Nieznaczny, zaledwie kilkusekundowy „zysk”, za-

leżny od komponenty naczyniowej odruchu na nurkowanie, był w wielu przypadkach warunkiem przeżycia przy wystąpieniu przejściowej asystolii podczas zanurzenia w wodzie. Bradykardia wywołana oziębieniem twarzy jest inicjowana niezależnie od odruchu na pobudzenia baroreceptorów tętniczych przez równoczesny wzrost ciśnienia tętniczego [17, 25].

Oziębienie kończyn lub tułowia nie wywołuje bradykardii. W przeciwieństwie do twarzy i jamy nosowej, ekspozycja tułowia lub kończyn na zimno inicjuje odpowiedź termoregulacyjną, przebiegającą z przyspieszeniem HR i wzrostem ciśnienia tętniczego, niekiedy znacznym [26]. Zanurzenie przedramion w zimnej wodzie podczas bezdechu nie wpływa na HR bądź ogranicza rozwój odpowiedzi kardiodepresyjnej na hipoksję lub oziębienie twarzy, natomiast ogrzanie przedramion w warunkach hipoksji przy zachowanym oddychaniu zwiększa zależne od hipoksji przyspieszenie HR [26–29]. Ekspozycja na zimno kończyn dolnych, równoczesna z oziębieniem twarzy, w znacznej mierze przeciwdziała zwolnieniu HR wywołanemu pobudzeniem twarzowych zakończeń nerwu trójdzielnego i ogranicza bradykardię wywołaną zatrzymaniem oddechu [30, 31], ale nasila też odpowiedź presyjną wskutek dodatkowego pobudzenia włókien współczulnych. W praktyce można przyjąć, że ochłodzenie kończyn, zwłaszcza dolnych, przed planowanym zanurzeniem w wodzie, może częściowo ograniczać ryzyko wystąpienia arytmii związanej z odruchem na nurkowanie.

CZAS DOWOLNEGO BEZDECHU

Niektóre gatunki wielorybów nurkują nawet > 2 h do głębokości przekraczającej 2000 m [32], a podczas zanurzenia dochodzi do znaczącego zwolnienia HR, do 2–6 skurczów/min, z towarzyszącym spadkiem ciśnienia tętniczego. Możliwości człowieka i granice przetrwania w środowisku wodnym są niewspółmiernie mniejsze. Przeciętna niewytrenowana osoba rzadko potrafi wstrzymać oddech dłużej niż kilkadziesiąt sekund, jakkolwiek osoby regularnie trenujące i zaadaptowane do nurkowania często utrzymują bezdech przez 3 do > 5 min [33, 34]. W pierwszym konkursie nurkowania oficjalnie zarejestrowanym w czasach nowożytnych, który odbył się w 1911 r., grecki rybak i poławiacz pereł, Jorgos Haggi Statti, osiągnął głębokość 77 m przy swobodnym zanurzeniu. Aktualne rekordy są znacznie bardziej „wyśrubowane”: oficjalnie odnotowano udaną próbę swobodnego nurkowania bez użycia zasobnika tlenowego do głębokości 265 m, a najdłuższy czas zanurzenia wyniósł 11 min 35 s, przy czym jeżeli statyczne zanurzenie było poprzedzone hiperwentylacją czystym tlenem, to maksymalny czas bezdechu przekroczył 20 min.

Procedurą często stosowaną przed nurkowaniem jest hiperwentylacja, która nieznacznie zwiększa zasoby ustrojowe tlenu. Wyniki najnowszych badań wskazują, że nasilone oddychanie zwiększa potencjał antyoksydacyjny limfocytów, redukując poziom reaktywnych postaci tlenu [35]. Przyjmuje się, że przy optymalnie przeprowadzonej hiperwentylacji

bezpośrednio przed zatrzymaniem oddechu, czas dowolnego bezdechu może przedłużyć się o 10–60 s [36]. Niekorzystnym następstwem hiperwentylacji jest nadmierne wydalanie dwutlenku węgla z powietrzem wydechowym. Wywołana hipokapnia wywiera działanie euforyzujące i hamuje oddychanie. Zahamowanie napędu oddechowego podczas nurkowania z bezdechem jest istotnym czynnikiem ryzyka niespodziewanego utonięcia. Brak lub zmniejszona percepcja konieczności wykonania wdechu wpływa korzystnie na samopoczucie nurka, co zachęca do kontynuowania bezdechu. Przy szybko spadającej prężności tlenu może dochodzić do dysfunkcji neuronów pnia mózgu, czego efektem jest nagłe ograniczenie świadomości lub jej utrata, występujące bez ostrzegawczych objawów prodromalnych (*shallow blackout*). Przy zanurzeniu w wodzie prowadzi to do zachłyśnięcia, z aspiracją wody do dróg oddechowych, a w efekcie — do utonięcia [36, 37].

Innym sposobem stosowanym przy współzawodnictwie o charakterze sportowym, polegającym na osiągnięciu najdłuższego czasu lub największej głębokości nurkowania, jest zwiększenie dostępnych zasobów tlenowych przez wzrost objętości powietrza w płucach powyżej standardowej całkowitej pojemności płuc. Osiąga się to przez określane kolokwialnie „pakowanie płuc”, którego istotą jest wprowadzenie do płuc dodatkowej objętości powietrza w tzw. wdechu gardłowo-krtaniowym (*glossopharyngeal insufflation*). Zawodnik bezpośrednio po dokonaniu maksymalnego wdechu szybko powtarza wcześniejszą wyćwiczoną procedurę, w której po zamknięciu ust i zatkanie nosa przepycha do otwartej nagłośni dodatkową objętość powietrza przy wykorzystaniu policzków i tylnej ściany gardła. Wywołany w ten sposób wzrost ciśnienia w klatce piersiowej zmniejsza powrót żylny i wtórnie rzut serca, powodując spadek ciśnienia tętniczego, niekiedy drastyczny. Ponadto rozciągnięcie klatki piersiowej zwiększa wagotonię podczas nurkowania z bezdechem. Opisano przypadki omdlenia w wodzie ze spadkiem ciśnienia tętniczego i asystolią po nadmiernym wypełnieniu płuc powietrzem [38].

BRADYKARDIA PODCZAS NURKOWANIA

Zwolnienie HR, średnio o 10–30% wartości wyjściowej, a u wyczynowych nurków nawet o > 50% [32, 39], jest według większości danych z piśmiennictwa regularną odpowiedzią odruchową na nurkowanie [40], jakkolwiek Heek i wsp. [41] zanotowali spadek HR jedynie u 66% testowanych ochotników. Odpowiedź sercowa na nurkowanie zależy od wieku i wytrenowania, a jej największe nasilenie przypada na okres niemowlęcy, w którym pełni funkcję protekcyjną podczas przypadkowych epizodów hipoksji [42]. Podczas prób głębokiego swobodnego nurkowania wykonywanych przez nurków reprezentujących mistrzowską klasę sportową rejestrowano bradykardię < 15/min, ze wstawkami 8–10-sekundowej asystolii [36, 40, 43]. W badaniach własnych polegających na ocenie odpowiedzi sercowo-naczyniowej na zanurzenie głowy w zimnej wodzie u zdrowych, niewytreno-

wanych ochotników w wieku 17–21 lat, u wszystkich badanych wystąpiła bradykardia podczas wykonywania próby, a maksymalne zwolnienie HR wynosiło 10,7–54,6% wyjściowej HR [44].

Z wyjątkiem niemowląt, u których reakcja kardiodepresyjna jest prawie natychmiastowa, bradykardia ujawnia się w większości przypadków po kilkunastosekundowym okresie latencji [36, 44], a jej czas jest odwrotnie proporcjonalny do wyjściowej HR. U osób wytrenowanych czas latencji jest wyraźnie krótszy, a w początkowej fazie bezdechu dochodzi do zmniejszenia objętości wyrzutowej [45]. Czas od rozpoczęcia bezdechu do rozwoju bradykardii zależy od wielu czynników, takich jak: temperatura, pojemność życiowa płuc, wydolność fizyczna i stopień wytrenowania, poprzedzająca hiperwentylacja, ruchy dowolne, pozycja ciała, podłoże emocjonalne.

Odpowiedź kardiodepresyjna jest zwykle poprzedzona zwiększeniem HR z towarzyszącym wzrostem ciśnienia tętniczego [39, 44, 46]. Tę pierwszą fazę reakcji na zanurzenie twarzy lub nurkowanie określa się mianem efektu antycypacyjnego i jest ona pochodną uogólnionego pobudzenia układu współczulnego. Wstępne pobudzenie rozpoczyna się najczęściej od kilku do kilkudziesięciu sekund przed rozpoczęciem próby i trwa średnio kilka-kilkanaście sekund początkowego nurkowania [44]. Efekt antycypacyjny, z maksymalnym przyrostem HR często przekraczającym 30/min, jest najbardziej zaznaczony u nastolatków bez doświadczenia w nurkowaniu lub próbach zanurzenia twarzy z bezdechem, co wiąże się z lękiem przed nieznanym lub nie do końca rozpoznany doświadczeniem oraz z początkową nieswoistością odpowiedzi o typie reakcji alarmowej [44, 47, 48]. Maksymalne przyspieszenie HR i czas latencji wykazują odwrotną korelację z bradykardią, która rozwija się w późniejszej fazie odpowiedzi. Przyjmuje się, że im szybsze jest tempo przemian metabolicznych, czego wyrazem jest HR, tym dynamika rozwoju hipoksji po zatrzymaniu oddychania jest większa, co sprzyja nasilonej odpowiedzi kardiodepresyjnej. Zatem każde pobudzenie organizmu, bez względu na szczegółowy czynnik sprawczy, będzie podczas przedłużonego bezdechu, np. podczas nurkowania, skutkowało tendencją do nasilonej bradykardii, proporcjonalnej do chwilowej hipoksji [36, 49, 50]. Pośrednim potwierdzeniem powyższej koncepcji jest większa odpowiedź kardiodepresyjna na nurkowanie z towarzyszącym wysiłkiem od obserwowanej przy zanurzeniu statycznym [51, 52]. To dlatego nurkowanie bezpośrednio poprzedzone wysiłkiem wiąże się z większym ryzykiem krytycznych incydentów sercowych.

KINETYKA ZWOLNIENIA RYTMU SERCA I ZMIENNOŚĆ OSOBNICZA ODRUCHU NA NURKOWANIE

Do maksymalnego zwolnienia HR dochodzi po 30–60 s od zatrzymania oddychania [36, 44, 47]. Kontynuowanie bezdechu nie powoduje u większości osób postępującego zmniejszenia HR.

Dane z piśmiennictwa dotyczące kinetyki zwolnienia HR są niespójne. Uśredniony przebieg odpowiedzi obliczony w największej jak dotąd metaanalizie [53], utworzonej na bazie 8 niezależnych badań, uwzględniającej dane 205 uczestników w wieku 19–25 lat, którzy wykonali porównywalne próby laboratoryjne zanurzenia głowy w wodzie ze wstrzymaniem oddechu, odpowiada krzywej jednowykładniczej ze stałą czasową — tau równą $10,4 \text{ s}^{-1}$, co odpowiada czasowi połowicznego zmniejszenia HR ($t_{1/2}$) — 7,2 s. W doświadczeniach własnych, z udziałem zdrowych, niewytrenowanych ochotników w wieku 17–21 lat [44], dynamika odpowiedzi była istotnie mniejsza, a średnia wartość tau wynosiła $22,5 \text{ s}^{-1}$, co odpowiada $t_{1/2}$ 32,5 s. Czynnikiem utrudniającym ocenę jest początkowe przyspieszenie HR, różnice w ocenie kinetyki zwolnienia HR mogą zaś wynikać z odmiennego sposobu interpretacji początku odpowiedzi kardiodepresyjnej.

Charakterystyczną cechą odruchu na nurkowanie jest znaczna zmienność osobnicza i związana z nią niepewność prognozowania indywidualnego przebiegu reakcji, przy braku wcześniejszych doświadczeń [40]. Baranova i wsp. [54] wyróżnili 4 typy odpowiedzi sercowej na nurkowanie: nadpobudliwą, standardową, niereaktywną i paradoksalną. W badaniach własnych [44] jedynie u 40% uczestników krzywa jednowykładnicza wiarygodnie odzwierciedlała rozwój bradykardii, u pozostałych 60% zwolnienie HR miało przebieg złożony, dwuwykładniczy, z początkową fazą szybkiego zmniejszenia HR i późniejszą znacznie wolniejszego spadku HR. Wyrazem zmienności osobniczej był znaczny zakres zarejestrowanych wskaźników: latencji odpowiedzi kardiodepresyjnej: 0–43 s; czasu od rozpoczęcia bezdechu do wystąpienia maksymalnej bradykardii: 19–78 s (koniec próby); względnego zmniejszenia HR: 11–55%; względnego przyspieszenia HR w początkowej fazie próby: 13–84%. Na rycinie 2 przedstawiono przykłady indywidualnych przebiegów odpowiedzi sercowej na zanurzenie twarzy w zimnej wodzie.

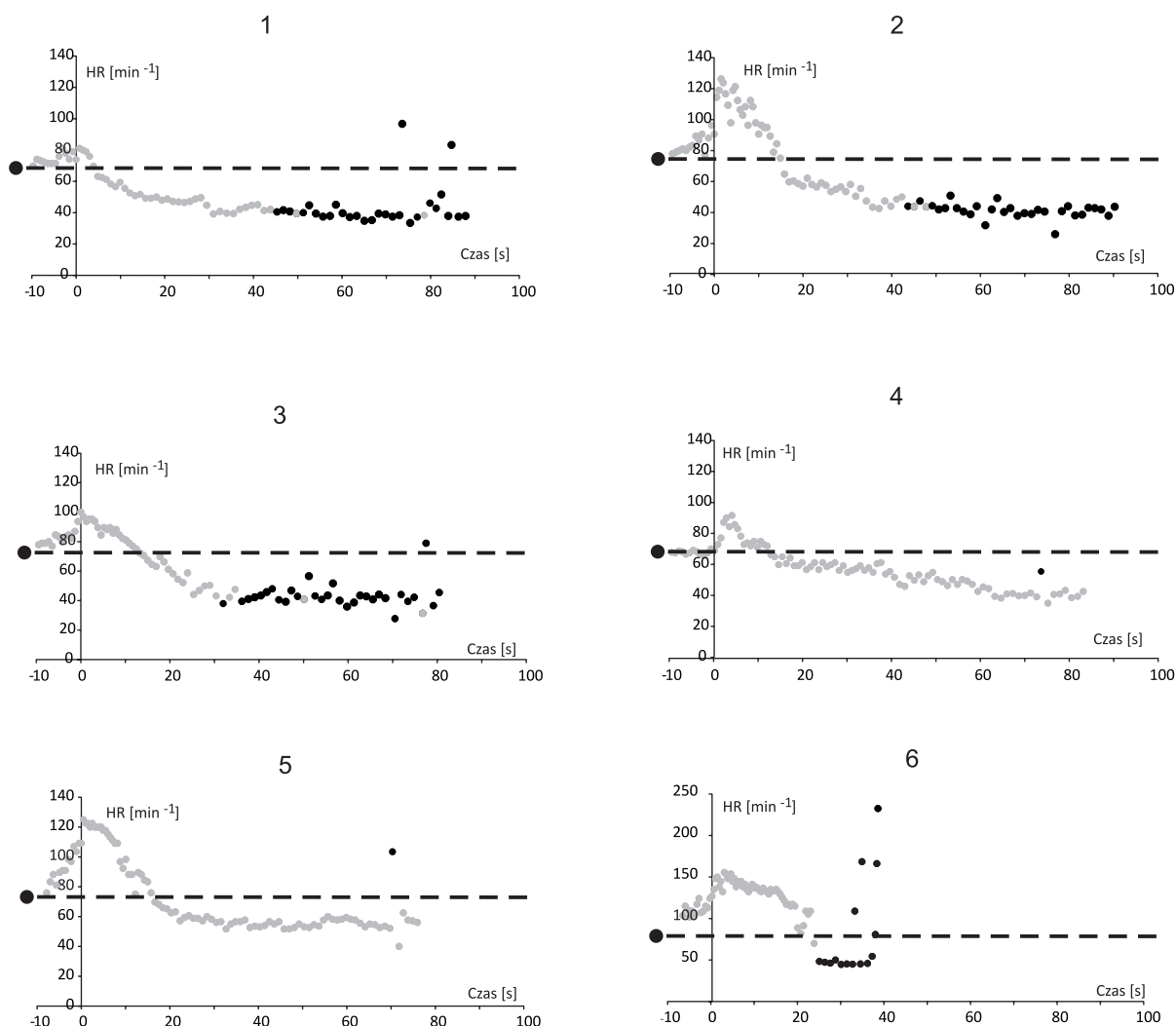
Przykład 1 ilustruje dwufazowe zwolnienie HR z wyraźną fluktuacją HR poprzedzone minimalnym pobudzeniem wstępnym. Rytm zastępczy z węzła przedsionkowo-komorowego, zakłócony pojedynczymi pobudzeniami dodatkowymi komorowymi dominuje od 40. s próby. Przykład 2 reprezentuje odpowiedź ze znacznym początkowym przyspieszeniem HR. Późniejsza bradykardia rozwija się dwufazowo, a po 40 s HR się stabilizuje, po ujawnieniu nadkomorowego rozrusznika zastępczego. W przykładzie 3 przebieg zwolnienia HR najlepiej opisuje funkcja jednowykładnicza, a maksymalna odpowiedź występuje po 32 s od rozpoczęcia próby, po czym funkcję dominującego rozrusznika przejmuje węzeł przedsionkowo-komorowy. Przykład 4 przedstawia dwufazową odpowiedź kardiodepresyjną, która rozpoczyna się po wstępnym pobudzeniu zainicjowanym już po zanurzeniu głowy. W trakcie próby utrzymuje się rytm zatokowy, a HR stopniowo ulega zmniejszeniu, bez osiągnięcia jednoznacznego minimum. Przykład 5 odpowiada jednofazowemu zwolnieniu HR,

z szybką stabilizacją HR, poprzedzonemu znaczącym pobudzeniem antycypacyjnym. W końcowych 30 s próby zaznacza się tendencja do wzrostu HR, co może odpowiadać III fazie odpowiedzi kardiodepresyjnej na nurkowanie, zaobserwowanej przez Guaraldiego i wsp. [55] u elitarniej grupy nurków wyczynowych. Przykład 6 ilustruje próbę, którą przerwano po 40 s wskutek wystąpienia salwy różnokształtnych pobudzeń komorowych. Zwraca uwagę wybitne pobudzenie wstępne, zapoczątkowane przed rozpoczęciem próby, w przebiegu którego HR wzrasta do 151/min. Po kilku sekundach od zanurzenia faza pobudzenia ustępuje stopniowemu zwolnieniu HR, po czym w ok. 20. s dochodzi do nagłego spadku HR do 40–45/min. W dalszym przebiegu pojawiają się pobudzenia dodatkowe, najpierw nadkomorowe, później komorowe, które wymusiły zakończenie testu.

Dwufazowy rozwój odpowiedzi kardiodepresyjnej na nurkowanie lub oziębienie twarzy opisali w 1990 r. Paulev i wsp. [56], sugerując, że pierwszej fazie zwolnienie HR jest reakcją na pobudzenie baroreceptorów tętniczych wywołane wzrostem ciśnienia tętniczego, w drugiej zaś fazie dochodzi do stopniowego zwiększenia aktywności dosercowych włókien współczulnych, co skutkuje ustabilizowaniem HR. Dalsze badania podważyły wiodącą rolę baroreceptorów w zainicjowaniu bradykardii. Khurana i Wu [25] obliczyli, że choć wzrost ciśnienia tętniczego w odpowiedzi na oziębienie lub zanurzenie twarzy zwykle poprzedza odpowiedź kardiodepresyjną [36], to latencja odpowiedzi sercowej i ciśnieniowej na oziębienie twarzy znacznie przekracza odpowiedzi sercowe inicjowane pobudzeniem baroreceptorów tętniczych. U wytrenowanych nurków, którzy potrafią wstrzymać oddech przez ponad 3 min, podczas przedłużonego zanurzenia ujawnia się często III faza odpowiedzi sercowej, określana jako faza walki [55, 57]. Dochodzi w niej do przyspieszenia HR, zwykle nieregularnego, przy znacznie podwyższonym ciśnieniu tętniczym. U niektórych osób podczas nurkowania z bezdechem rejestrowano bardzo wysokie wartości ciśnienia tętniczego: 290/150, 280/200, 345/150 mm Hg [58]. Podłożem późnej fazy odpowiedzi sercowo-naczyniowej, korelującej z rozwojem głębokiej hipoksji, jest narastające pobudzenie włókien współczulnych, interpretowane jako przejaw desperackiej reakcji alarmowej i wyczerpanie zakresu fizjologicznej odpowiedzi na nurkowanie. Reakcję presyjną promuje oziębienie tułowia i kończyn, zwłaszcza dolnych [26].

ADAPTACYJNY CHARAKTER ODRUCHU NA NURKOWANIE

Fizjologiczna, kardiodepresyjna odpowiedź na nurkowanie, która jest najbardziej zaznaczona u nurkujących ssaków, ma charakter adaptacyjny, gdyż umożliwia organizmom oddychającym powietrzem atmosferycznym stosunkowo długotrwałe przebywanie pod wodą. Odruch na nurkowanie przyczynia się do istotnego zmniejszenia zużycia tlenu oraz do przekierowania rezerw tlenowych dostępnych w krwi i tkankach obwodowych do narządów centralnych, kluczowych



Rycina 2. Przykłady indywidualnych (1–6) zmian częstotliwości rytmu serca (HR) przed i podczas zanurzenia twarzy w zimnej wodzie (8°C) z zatrzymanym oddechem wykonanych przez zdrowych niewytrenowanych ochotników w wieku 17–21 lat. Czas zanurzenia w wodzie w próbach 1–5 odpowiada czasowi dowolnego bezdechu. Próbę 6 przerwano w 40. sekundzie po ujawnieniu salwy różnokształtnych pobudeń komorowych; linia przerywana wyprowadzona z czarnego punktu po lewej stronie każdego wykresu odpowiada HR zarejestrowanej 5 min przed zanurzeniem twarzy, pozostałe punkty odpowiadają HR w kolejnych cyklach serca, punkty szare oznaczają rytm zatokowy, punkty czarne — odpowiadają rytmowi węzłowemu lub pobudzeniom dodatkowym przedsionkowym lub komorowym

dla podtrzymania czynności życiowych organizmu, w tym zwłaszcza do mózgu, szczególnie wrażliwego dla hipoksji [2, 59]. Zwolnienie HR i przedłużenie rozkurczu, przy równoczesnym skurczu obwodowych naczyń oporowych, prowadzącym do wzrostu ciśnienia rozkurczowego, sprzyja wydłużeniu czasu efektywnej perfuzji warstwy podśierdziejowej lewej komory, najbardziej narażonej na niedokrwienie. Podczas nurkowania często dochodzi do obkurczenia śledziony, zależnego od pobudzenia lokalnych receptorów alfa-2-adrenergicznych [60]. Skurcz śledziony, nierzadko z towarzyszącym ostrym bólem w lewym podżebrzu, wyciska znaczną pulę krwinek czerwonych do krwiobiegu, zwiększając dostępną rezerwę tlenową.

Zmniejszenie HR połączone z centralizacją krążenia, z towarzyszącą hipotermią tkankową, wiążącą się ze spowolnieniem tempa przemian metabolicznych, tłumaczy przypadki kilkudziesięciominutowego przeżycia niektórych osób, zwłaszcza dzieci, bliskich utonięciu w wodzie o temperaturze $< 10^{\circ}\text{C}$ [24, 51, 59] oraz pomyślne zakończenie znacznego odsetka zabiegów resuscytacyjnych, przeprowadzonych po wyłowieniu poszkodowanych osób z zimnej wody w stanie hipotermii [61–63]. Wykazano, że odruch na nurkowanie zabezpiecza noworodki przed utonięciem podczas porodu w wodzie [63]. Procedury oziębiania twarzy i wstrzymywania oddechu były przez wiele lat stosowane jako doraźne metody przerywania tachyarytmii nadkomorowych [64]. Prze-

słanki empiryczne wskazują, że wielokrotnie powtarzane zanurzenie twarzy w zimnej wodzie, na zasadzie krótkotrwałego treningu, może przyczynić się do lepszej adaptacji do hipoksji wysokogórskiej [65]. Zanurzenie twarzy w zimnej wodzie jest jedną z empirycznie stosowanych metod przyspieszenia powysiłkowej odnowy [66]. Chociaż obiektywne korzyści ze stosowania tej procedury, związanej ze zwiększeniem powysiłkowej aktywności przywspółczulnej, nie są ewidentne [67, 68], to percepcja subiektywna testowanych sportowców była zdecydowanie pozytywna [67]. Wyniki badań doświadczalnych z udziałem ochotników wskazują, że zanurzenie twarzy w zimnej wodzie poprzedzające wysiłek ogranicza wysiłkowy wzrost stężenia prolaktyny i amin katecholowych [65, 69], poprawia subiektywny komfort termiczny podczas wysiłku [69], a także sprzyja uzyskaniu dobrego wyniku w wysiłkach typu wytrzymałościowego o znacznej intensywności [29, 70]. Korzystny efekt jest najprawdopodobniej pochodną zwiększonej aktywności przywspółczulnej we wstępnej fazie wysiłku, co skutkuje mniejszą początkową HR i zmniejszonym uwalnianiem kwasu mlekowego.

PATOLOGICZNE IMPLIKACJE REGULACYJNE

Coraz większa dostępność akwenów wodnych, wynikająca z rozwoju cywilizacyjnego, łączy się ze wzrostem krytycznych incydentów związanych z przebywaniem w wodzie. Zabawy i konkursy polegające na najdłuższym zatrzymaniu oddechu, przepłynięciu pod wodą najdłuższego dystansu, najgłębszym nurkowaniu, wylawianiu z wody przedmiotów, a także różnorodne procedury treningowe ukierunkowane na zwiększenie rezerw tlenowych organizmu w następstwie wielokrotnie powtarzanego nurkowania, zwiększają ryzyko wystąpienia nagłych incydentów sercowych związanych z przekroczeniem zakresu regulacji odruchowej odpowiedzi o charakterze adaptacyjnym. Poetyckim wyrazem skutków nadmiernej ambicji i wiary we własne możliwości jest tragiczny los nurka opisany w 1797 r. przez Friedricha Schillera w balladzie „Nurek” [71]. Statystyki nagłych zgonów, do których doszło w wodzie, wskazują, że utonięcie i nagłe zatrzymanie krążenia podczas przebywania w wodzie jest jedną z ważniejszych przyczyn zgonów u osób w wieku 4–59 lat, a w Stanach Zjednoczonych, Wielkiej Brytanii, Australii i Oceanii są w grupie nastolatków 3. przyczyną zgonu po wypadkach komunikacyjnych i nowotworach [50, 72, 73]. Oprócz ewidentnych przypadków utonięć związanych z zachłyśnięciem przy nagłym wpadnięciu do wody, urazem mechanicznym lub ciśnieniowym, nagłą dekompresją, wyczerpaniem zasobów tlenu przy nurkowaniu z użyciem butli, bezpośrednią przyczyną nagłego zgonu w wodzie jest często niełatwa do ustalenia, ze względu na to, że arytmia lub nagła asystolia nie pozostawiają znamienych markerów pośmiertnych [1]. Spośród tragicznych incydentów, do których doszło w akwenach wodnych w Stanach Zjednoczonych, ponad połowa miała miejsce w obrębie publicznych lub prywatnych basenów, przy nadzorze osób trzecich, przy czym większość poszkodowa-

nych prowadziła aktywny tryb życia, potrafiła pływać i niejednokrotnie nurkowała [74, 75]. Wskazuje to na nagły incydent sercowy jako przyczynę zgonu.

Indywidualny zakres fizjologicznej odpowiedzi adaptacyjnej jest trudny do przewidzenia, zwłaszcza jeżeli próba wywołująca odruch ma charakter sporadyczny. Nagły kontakt uprzednio rozgrzanej powierzchni twarzy z zimnym i wilgotnym powietrzem, do którego dochodzi np. po wyjściu z ciepłego pomieszczenia i napotkaniu intensywnego wiatru o przeciwnym kierunku, nie tylko może wywołać odpowiedź kardiodepresyjną, ale niekiedy powoduje odruchowe zatrzymanie oddychania, przechodzące w spłycony tor oddechowy z niepełnym wydechem [17, 76, 77]. Taka sytuacja imituje warunki odruchu na nurkowanie, promując ujawnienie niebezpiecznych arytmii. Upośledzeniu wydechu podczas wysiłku w zimnym otoczeniu sprzyja skurcz oskrzeli, czasami występujący jako dodatkowa komponenta odpowiedzi na nurkowanie [78]. Nagłe oziębienie twarzy może także wywołać odmienną odpowiedź oddechową, o typie reakcji alarmowej, charakterystycznej dla nieoczekiwanego kontaktu z zimną wodą, występującej np. przy wpadnięciu do wody, w której po szybkim, głębokim wdechu dochodzi do przejściowej hiperwentylacji. Odpowiedzi tej nie towarzyszy istotna bradykardia [79], a związane z nią zagrożenie wynika z zachłyśnięcia podczas zanurzenia w wodzie. Dynamika i nasilenie odpowiedzi kardiodepresyjnej w znacznym stopniu zależą od reakcji na oziębienie twarzy. Znaczny kontrast termiczny, wilgotna skóra twarzy o wysokiej przewodności cieplnej, rozszerzenie naczyń powierzchownych twarzy, np. po spożyciu alkoholu, intensywny przepływ zimnego powietrza, zwiększają ryzyko nadmiernej odpowiedzi sercowej.

Odruch na nurkowanie zwrócił uwagę badaczy jako potencjalny czynnik patogenetyczny zespołu nagłego zgonu niemowląt (SIDS, *sudden infant death syndrome*), w przebiegu którego dochodzi do nagłej śmierci podczas snu dotychczas zdrowego niemowlęcia [9]. Czynnikiem wywołującym nadmierną odpowiedź odruchową z bezdechem i asystolią może być podrażnienie śluzówki nosa lub przedsionka nosa przez nieswoisty czynnik drażniący, np. mokry, zimny skrawek materiału lub ubrania, ciało obce, powiew zimnego powietrza na wilgotną powierzchnię twarzy. Dane autopsyjne wskazują, że SIDS często towarzyszy hipoplazja jądra łukowego (*nucleus arcuatus*) i nadmierny rozwój astrocytów (glejoza) w obszarze jąder pnia mózgu zawierających neurony sterujące napędem krążeniowo-oddechowym [9]. Badania eksperymentalne na szczurach wskazują, że nadmierne pobudzenie dosercowych włókien nerwu błędnego jest pochodną aktywacji ośrodkowej neurotransmisji glutaminergicznej przy udziale receptorów muskarynowych M4 [80].

W ostatniej dekadzie uwagę badaczy zwróciły podobieństwa odpowiedzi na hipoksję przy zatrzymanym oddychaniu z zaburzeniami autonomicznej regulacji krążenia występujące w zespole bezdechu sennego (*sleep apnea*). Chappleau [81] zauważył, że u wyczynowych nurków dzienna liczba bezde-

chów w sezonie treningowo-sportowym odpowiada częstotliwości bezdechów w zespole bezdechu sennego. Zarówno u wyczynowych nurków pod koniec nurkowania, jak i u osób z zespołem bezdechu sennego dochodzi do zwiększonej aktywacji odruchu z chemoreceptorów tętnicznych, z pobudzeniem obwodowych włókien współczulnych prowadzącym do istotnego wzrostu ciśnienia tętniczego [82]. Efekt presyjny jest proporcjonalny do spadku prężności tlenu we krwi i jest zaznaczony w większym stopniu u dobrze wytrenowanych nurków, zdolnych do kilkuminutowego wstrzymania oddychania, a także u osób, u których występują liczne epizody bezdechu podczas snu. Znaną cechą zespołu bezdechu sennego, a także zastoinowej niewydolności serca jest obniżona wrażliwość chemoreceptorów tętnicznych, zwłaszcza na hiperkapnię [27, 83]. Dwutygodniowy trening nurkowania z bezdechem znacząco wydłuża czas dowolnego bezdechu, co koreluje ze zmniejszoną odpowiedzią odruchu z chemoreceptorów tętnicznych na narastającą hipoksję lub hiperkapnię [27]. W rezultacie napęd oddechowy ulega przytłumieniu, co ułatwia dłuższe powstrzymanie się od zainicjowania wdechu. Zmniejszenie wrażliwości na hipoksję i hiperkapnię nie wiąże się bezpośrednio ze zwiększonym pobudzeniem chemoreceptorów tętnicznych i ze zwiększoną toniczną spoczynkową aktywnością włókien współczulnych, zależną od tego pobudzenia chemoreceptorów tętnicznych. Powtarzalne epizody hipoksji wywołane wielokrotnym długotrwałym nurkowaniem, epizodami bezdechu sennego, nietypowym torem oddechowych z niepełnym wydechem pochodzenia obturacyjnego lub wynikającym z emocjonalnego lub wysiłkowego przesterowania toru oddechowego, wywołują długotrwały wzrost aktywności chemoreceptorów o charakterze długotrwałej potencjalizacji (sLTF, *sensory long term facilitation*). Podłożem sLTF są zmiany transmisji synaptycznej, ekspresji receptorów, a także syntezy neuronalnych białek sygnałowych [84, 85]. W detekcji tlenu na poziomie chemoreceptorów uczestniczą jego reaktywne postaci, w tym rodniki tlenowe, generowane przy udziale NAD(P)H oksydazy (Nox2, Nox4) [86]. Wpływ nurkowania i bezdechu sennego na równowagę oksydacyjną zależy od lokalnych czynników komórkowych i tkankowych. W długotrwałej potencjalizacji odruchu z chemoreceptorów tętnicznych zmniejsza się aktywność lokalnej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-2), co promuje stres oksydacyjny, który z kolei aktywuje czynniki transkrypcyjne, takie jak HIF-1, czynniki jądrowe zaktywowanych limfocytów T (NFAT), czynnik jądrowy NFjB [84, 85, 87]. Powtarzalna ekspozycja na hipoksję, związana z częstym nurkowaniem, zwiększa ekspresję endogennych antyoksydantów w limfocytach, neutrofilach, erytrocytach i osoczu, ale promuje też stres oksydacyjny w śródbłonku [88, 89]. Sprzyja to rozwojowi dysfunkcji śródbłonka w warunkach odruchowego wzrostu ciśnienia tętniczego wywołanego zwiększeniem aktywności obwodowych włókien współczulnych. Wyniki najnowszych badań wskazują, że aktywne nurkowanie z towarzyszącym wysiłkiem i zatrzymanym oddychaniem

zwiększa obrót komórek puli granulocytarnej przez zwiększenie apoptozy i przyspieszenie liczby podziałów komórkowych, co może przypominać tkankowe procesy przyspieszonego starzenia [90]. Koreluje to z wcześniejszymi danymi z badań eksperymentalnych, w których stwierdzono cechy oksydacyjnego uszkodzenia limfocytarnego DNA kilkadziesiąt minut po zakończeniu submaksymalnego wysiłku [91].

ZABURZENIA RYTMU

Najpoważniejszym, niejednokrotnie fatalnym powikłaniem odruchowej odpowiedzi na nurkowanie są zaburzenia HR, które podczas nurkowania opisali po raz pierwszy Scholander i wsp. [92] w 1962 r. Zaobserwowano, że częstość ich występowania wzrasta przy zanurzeniu w zimnej wodzie [58] oraz że indywidualne ryzyko arytmii związanej z nurkowaniem jest trudne do oszacowania ze względu na znaczną zmienność osobniczą i istotny wpływ chwilowej predyspozycji oraz warunków nurkowania [36]. Zaburzenia czynności elektrycznej serca podczas przedłużonego bezdechu i oziębienia twarzy mają charakter nieswoisty i wynikają z zahamowania rozruszników przedsionkowych i częściowego lub całkowitego wyłączenia ich nadrzędnego wpływu na automatyzm mięśniówki komór [13, 15]. Zwiększona pobudliwość kardiomiocytów wywołana niedokrwieniem, hipokaliemią, kardiomiopatią lub czynnikami metabolicznymi ułatwiają zainicjowanie arytmii.

Najczęstszą nieprawidłowością są pobudzenia dodatkowe nadkomorowe i komorowe, występujące u większości osób podczas przedłużonego bezdechu [33, 43, 44]. Heterogenne pobudzenia dodatkowe komorowe mogą degenerować do różnokształtnych pobudzeń gromadnych, wielokształtnego częstoskurczu komorowego i do migotania komór. Zaburzenia przewodzenia przedsionkowo-komorowego ujawniają się najczęściej pod postacią bloku I stopnia, który niekiedy transformuje do bloku II stopnia, zwłaszcza typu Mobitz I, z progresywnym wydłużaniem odstępu PQ, aż do wypadnięcia kolejnego pobudzenia zatokowego [43, 44, 93]. Wyrazem całkowitego zahamowania przewodzenia przedsionkowo-komorowego jest występowanie kilkusekundowych lub przedłużonych epizodów asystolii, szczególnie u dzieci [43, 93]. Stosunkowo rzadko pojawiają się bloki odnogi pęczka Hisa, zwłaszcza odnogi prawej [33, 94]. Rytm zastępczy, zwykle pochodzenia węzłowego, ujawnia się rutynowo przy zwolnieniu rytmu zatokowego do ok. 40/min, a sporadycznie przy większej HR, przekraczającej 60/min, w postaci krótkotrwałych wstawek lub jako zmiana utrwalona do końca wykonywanej próby [33, 40, 44]. Obraz zmian elektrokardiograficznych uzupełniają występujące nieregularnie zaburzenia repolaryzacji pod postacią wydłużenia odstępu QT, nieswoistych zmian morfologii załamka T, uniesienia odcinka ST [13, 43, 93].

Wybrane doniesienia z piśmiennictwa wskazują [40, 56, 95], że arytmie mogą być wyzwalane niemal natychmiast po zanurzeniu twarzy w zimnej wodzie, co jest efektem nadmiernej reakcji na pobudzenie zakończeń czuciowych ner-

wu trójdzielnego i wynika z nadmiernej reakcji na oziębienie twarzy i przedsionka nosa. Zalecenia Hiebarta i Burcha [4], odnoszące się do warunków dydaktycznego testowania odruchu na nurkowanie, a także ponad 25-letnie doświadczenia własne (dane nieopublikowane), związane z rejestracją elektrokardiograficzną podczas przeprowadzonych w celach dydaktycznych prób zanurzenia twarzy w zimnej wodzie lub prób dowolnego bezdechu, wskazują, że u zdrowych ochotników w wieku 18–30 lat podejmujących próby czynnościowe z bezdechem trwającym nie dłużej niż 30–50 s, zaburzenia czynności elektrycznej serca występują sporadycznie, a ich częstość wzrasta przy przedłużonym wstrzymywaniu oddychania. Liczne obserwacje wskazują, że zwiększone ryzyko ujawnienia arytmii komorowych wiąże się z rozwojem hipoksji podczas przedłużonego bezdechu, do czego w największym stopniu dochodzi podczas kilkuminutowego nurkowania z bezdechem [37, 40, 43, 59]. Próbie takiej potrafią sprostać osoby dobrze wytrenowane o znacznym doświadczeniu. W praktyce oznacza to, że trening dowolnego bezdechu lub nurkowania bez sprzętu wspomagającego nie tylko nie zmniejsza prawdopodobieństwa sprowokowania arytmii, ale jest czynnikiem predysponującym, przez umożliwienie przekroczenia kolejnych barier wydolnościowych organizmu. Zwraca uwagę fakt, że zwiększona skłonność do arytmii występuje, mimo że u osób wytrenowanych obciążenie serca jest w porównywalnych warunkach mniejsze niż w standardowej grupie referencyjnej [45].

Wadomo, że wysiłek poprzedzający próbę lub towarzyszący nurkowaniu, jak też przyspieszenie metabolizmu wywołane inną przyczyną, zwiększają pobudliwość komorowych ośrodków arytmogennych [36, 39]. Znaczny wzrost obciążenia następczego, przy wysokim stężeniu amin katecholowych i zahamowanym przewodzeniu przedsionkowo-komorowym istotnie zwiększa ryzyko wystąpienia arytmii komorowych. Obserwacje Ferrigno i wsp. [43, 58], którzy dokonali rejestracji elektrokardiograficznej u wyczynowych nurków podczas ekstremalnego zanurzenia w zimnej wodzie, ujawniły występowanie licznych polimorficznych pobudzeń komorowych, nierzadko dominujących w HR, okresowo układających się w rytm bigeminii, przerywanych wstawkami kilkusekundowej asystolii.

Tipton i wsp. [96] wykazali, że okresem zwiększonej podatności na wystąpienie ektopowych arytmii komorowych jest pierwsze 10 s po wznowieniu oddychania. W ponad 80% prób doświadczalnego zanurzenia w wodzie czynnikiem prowokującym arytmie było wznowienie oddychania przy użyciu systemu rur połączonych z zasobnikiem z mieszanką oddechową. Przebieg doświadczenia sugeruje znaczącą rolę zwiększonego oporu oddechowego. Ewentualny mechanizm reperfuzji jest mało prawdopodobny ze względu na niemal natychmiastowy efekt po rozpoczęciu oddychania. Najprawdopodobniej uruchomienie napędu oddechowego odhamowuje dotychczas częściowo przytłumione dosercowe włókna współczulne, wywołując chwilowy efekt batmotropowy.

PODSUMOWANIE

Odruch na nurkowanie jest złożoną odpowiedzią o charakterze adaptacyjnym, umożliwiającą człowiekowi krótkotrwałe przetrwanie w środowisku wodnym, a także przetrwanie epizodów hipoksji. Istotą zmiennej osobniczo odpowiedzi sercowej jest zwolnienie HR, a w jej przebiegu może dochodzić do różnorodnych zaburzeń rytmu i przewodzenia, w skrajnych przypadkach do migotania komór i asystolii. Trening nurkowania z bezdechem nie zabezpiecza przed rozwojem powikłań. Wystąpieniu arytmii sprzyja gwałtowne oziębienie twarzy, zwiększona szybkość przemian metabolicznych, wywołana np. wysiłkiem, a także nadmierny wzrost ciśnienia w klatce piersiowej. Poprzedzająca hiperwentylacja sprzyja omdleniu podczas nurkowania. Oziębienie twarzy, kończyn i tułowia przed zanurzeniem w zimnej wodzie ogranicza efekt kardiodepresyjny nurkowania i redukuje ryzyko powikłań sercowych.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

- Papadodima SA, Athanaselis SA, Skliros E, Spiliopoulou CA. Forensic investigation of submersion deaths. *Int J Clin Pract*, 2010; 64: 75–83.
- Gooden BA. Mechanism of the human diving response. *Integr Physiol Behav Sci*, 1994; 29: 6–16.
- Marsh N, Askew D, Beer K et al. Relative contributions of voluntary apnoea exposure to cold and face immersion in water to diving bradycardia in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1995; 22: 886–887.
- Hiebert SM, Burch E. Simulated human diving and heart rate: making the most of the diving response as a laboratory exercise. *Adv Physiol Educ*, 2003; 27: 130–145.
- Mehta D, Wafa S, Ward DE, Camm AJ. Relative efficacy of various physical manoeuvres in the termination of junctional tachycardia. *Lancet* 1988; 1: 1181–1185.
- Paton JF, Nalivaiko E, Boscan P, Pickering AE. Reflexly evoked coactivation of cardiac vagal and sympathetic motor outflows: observations and functional implications. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006; 33: 1245–1250.
- Dempsey JA, Sheel AW, St Croix CM, Morgan BJ. Respiratory influences on sympathetic vasomotor outflow in humans. *Respir Physiol Neurobiol*, 2002; 130: 3–20.
- Gandevia SC, McCloskey DI, Potter EK. Reflex bradycardia occurring in response to diving nasopharyngeal stimulation and ocular pressure and its modification by respiration and swallowing. *J Physiol*, 1978; 276: 383–394.
- Matturri L, Ottaviani G, Lavezzi AM. Sudden infant death triggered by dive reflex. *J Clin Pathol*, 2005; 58: 77–80.
- Crick SJ, Wharton J, Sheppard MN et al. Innervation of the human cardiac conduction system. A quantitative immunohistochemical and histochemical study. *Circulation*, 1994; 89: 1697–1708.
- Ferrari AU, Daffonchio A, Gerosa S, Mancina G. Alterations in cardiac parasympathetic function in aged rats. *Am J Physiol*, 1991; 260: H647–H649.
- Chow LT, Chow SS, Anderson RH, Gosling JA. Autonomic innervation of the human cardiac conduction system: changes from infancy to senility — an immunohistochemical and histochemical analysis. *Anat Rec*, 2001; 264: 169–182.
- Verrier RL, Antzelevitch C. Autonomic aspects of arrhythmogenesis: the enduring and the new. *Curr Opin Cardiol*, 2004; 19: 2–11.

14. Quan KJ, Lee JH, van Hare GF et al. Identification and characterization of atrioventricular parasympathetic innervation in humans. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2002; 13: 735–739.
15. Alboni P, Alboni M, Gianfranchi L. Simultaneous occurrence of two independent vagal reflexes: a possible cause of vagal sudden death. *Heart*, 2011; 97: 623–625.
16. Schuitema K, Holm B. The role of different facial areas in eliciting human diving bradycardia. *Acta Physiol Scand*, 1988; 132: 119–120.
17. Argacha JF, Xhaet O, Gujic M et al. Facial cooling and peripheral chemoreflex mechanisms in humans. *Acta Physiol (Oxf)*, 2008; 194: 161–170.
18. Brown CM, Sanya EO, Hilz MJ. Effect of cold face stimulation on cerebral blood flow in humans. *Brain Res Bull*, 2003; 61: 81–86.
19. Tipton MJ, Golden FS, Higenbottam C et al. Temperature dependence of habituation of the initial responses to cold-water immersion. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1998; 78: 253–257.
20. Kinoshita T, Nagata S, Baba R et al. Cold-water face immersion per se elicits cardiac parasympathetic activity. *Circ J*, 2006; 70: 773–776.
21. Schaller B. Trigemino-cardiac reflex. A clinical phenomenon or a new physiological entity? *J Neurol*, 2004; 251: 658–665.
22. Rozložnik M, Paton JF, Dutschmann M. Repetitive paired stimulation of nasotrigeminal and peripheral chemoreceptor afferents cause progressive potentiation of the diving bradycardia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009; 296: R80–R87.
23. Cook JA, Hamilton JW, Jones AS. The diving reflex in non-eosinophilic non-allergic rhinitis. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1996; 21: 226–227.
24. Moon RE, Long RJ. Drowning and near-drowning. *Emerg Med (Fremantle)*, 2002; 14: 377–386.
25. Khurana RK, Wu R. The cold face test: a non-baroreflex mediated test of cardiac vagal function. *Clin Auton Res*, 2006; 16: 202–207.
26. Tipton MJ, Golden FS. The influence of regional insulation on the initial responses to cold immersion. *Aviat Space Environ Med*, 1987; 58: 1192–1196.
27. Foster GE, Sheel AW. The human diving response its function and its control. *Scand J Med Sci Sports*, 2005; 15: 3–12.
28. Wester TE, Cherry AD, Pollock NW et al. Effects of head and body cooling on hemodynamics during immersed prone exercise at 1 ATA. *J Appl Physiol*, 2009; 106: 691–700.
29. Andersson J, Schagatay E, Gislen A, Holm B. Cardiovascular responses to cold-water immersions of the forearm and face and their relationship to apnoea. *Eur J Appl Physiol*, 2000; 83: 566–572.
30. Frey MA, Siervogel RM, Selm EA, Kezdi P. Cardiovascular response to cooling of limbs determined by noninvasive methods. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1980; 44: 67–75.
31. Mourot L, Bouhaddi M, Regnard J. Effects of the cold pressor test on cardiac autonomic control in normal subjects. *Physiol Res*, 2009; 58: 83–91.
32. Tyack PL, Johnson M, Soto NA et al. Extreme diving of beaked whales. *J Exp Biol*, 2006; 209: 4238–4253.
33. Hansel J, Solleder I, Groerer W et al. Hypoxia and cardiac arrhythmias in breath-hold divers during voluntary immersed breath-holds. *Eur J Appl Physiol*, 2009; 105: 673–678.
34. Perini R, Gheza A, Moia C et al. Cardiovascular time courses during prolonged immersed static apnoea. *Eur J Appl Physiol*, 2010; 110: 277–283.
35. Morabito C, Bosco G, Pilla R et al. Effect of pre-breathing oxygen at different depth on oxidative status and calcium concentration in lymphocytes of scuba divers. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011; 202: 69–78.
36. Lindholm P, Lundgren CE. The physiology and pathophysiology of human breath-hold diving. *J Appl Physiol*, 2009; 106: 284–292.
37. Landsberg PG. Bradycardia during human diving. *S Afr Med J*, 1975; 49: 626–630.
38. Andersson JP, Liner MH, Jonsson H. Asystole and increased serum myoglobin levels associated with 'packing blackout' in a competitive breath-hold diver. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2009; 29: 458–461.
39. Stromme SB, Kerem D, Elsner R. Diving bradycardia during rest and exercise and its relation to physical fitness. *J Appl Physiol*, 1970; 28: 614–621.
40. Arnold RW. Extremes in human breath hold facial immersion bradycardia. *Undersea Biomed Res*, 1985; 12: 183–190.
41. Heek C, Tirpitz D, Schipke JD. Tauchreflex beim Menschen: Faktum oder Fiktion? In: Tirpitz D, Schipke JD, van Laak U. Tauch- und Überdruckmedizin, Heidelberg Dr Kurt Haefner-Verlag GmbH, 2000: 249–274.
42. Goksoy E, Rosengren L, Wennergren G. Bradycardic response during submersion in infant swimming. *Acta Paediatr*, 2002; 91: 307–312.
43. Ferrigno M, Grassi B, Ferretti G et al. Electrocardiogram during deep breath-hold dives by elite divers. *Undersea Biomed Res*, 1991; 18: 81–91.
44. Wierzbna TH, Musiał P, Ćwikałowska H. Variable profile of individual heart rate responses to cold water immersion apnea in healthy late adolescent men. *Georgian Med News*, 2011; 196–197: 28–38.
45. Tocco F, Crisafulli A, Melis F et al. Cardiovascular adjustments in breath-hold diving: comparison between divers and non-divers in simulated dynamic apnoea. *Eur J Appl Physiol*, 2011 [Epub ahead of print].
46. Lindholm P, Sundblad P, Linnarsson D. Oxygen-conserving effects of apnea in exercising men. *J Appl Physiol*, 1999; 87: 2122–2127.
47. Ramey CA, Ramey DN, Hayward JS. Dive response of children in relation to cold-water near-drowning. *J Appl Physiol*, 1987; 63: 665–668.
48. Duprez D, De Buyzere M, Trouerbach J et al. Continuous monitoring of haemodynamic parameters in humans during the early phase of simulated diving with and without breathholding. *Eur J Appl Physiol*, 2000; 81: 411–417.
49. Schagatay E., Andersson J. Diving response and apneic time in humans. *Undersea Hyperb Med*, 1998; 25: 13–19.
50. Quan L, Kinder D. Pediatric submersions: prehospital predictors of outcome. *Pediatrics*, 1992; 90: 909–913.
51. Biggart MJ, Bohn DJ. Effect of hypothermia and cardiac arrest on outcome of near-drowning accidents in children. *J Pediatr*, 1990; 117: 179–183.
52. Zbrozyna AW, Westwood DM. Cardiovascular responses elicited by simulated diving and their habituation in man. *Clin Auton Res*, 1992; 2: 225–233.
53. Caspers C, Cleveland S, Schipke JD. Diving reflex: can the time course of heart rate reduction be quantified? *Scand J Med Sci Sports*, 2011; 21: 18–31.
54. Baranova TI, Kovalenko RI, Molchanov AA et al. Mechanisms of human adaptation to hypoxia. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 2003; 89: 1370–1379.
55. Guaraldi P, Serra M, Barletta G et al. Cardiovascular changes during maximal breath-holding in elite divers. *Clin Auton Res*, 2009; 19: 363–366.
56. Paulev PE, Pokorski M, Honda Y et al. Facial cold receptors and the survival reflex "diving bradycardia" in man. *Jpn J Physiol*, 1990; 40: 701–712.
57. Perini R, Tironi A, Gheza A et al. Heart rate and blood pressure time courses during prolonged dry apnoea in breath-hold divers. *Eur J Appl Physiol*, 2008; 104: 1–7.
58. Ferrigno M, Ferretti G, Ellis A et al. Cardiovascular changes during deep breath-hold dives in a pressure chamber. *J Appl Physiol*, 1997; 83: 1282–1290.
59. Lin YC. Applied physiology of diving. *Sports Med*, 1988; 5: 41–56.
60. Kuwahira I, Kamiya U, Iwamoto T et al. Splenic contraction-induced reversible increase in hemoglobin concentration in intermittent hypoxia. *J Appl Physiol*, 1999; 86: 181–187.

61. Craig AB, Jr. Summary of 58 cases of loss of consciousness during underwater swimming and diving. *Med Sci Sports*, 1976; 8: 171–175.
62. Gooden BA. Why some people do not drown. Hypothermia versus the diving response. *Med J Aust*, 1992; 157: 629–632.
63. Reis DJ, Golanov EV, Galea E, Feinstein DL. Central neurogenic neuroprotection: central neural systems that protect the brain from hypoxia and ischemia. *Ann N Y Acad Sci*, 1997; 835: 168–186.
64. Mehta D, Wafa S, Ward DE, Camm AJ. Relative efficacy of various physical manoeuvres in the termination of junctional tachycardia. *Lancet*, 1988; 1: 1181–1185.
65. Lunt HC, Barwood MJ, Corbett J, Tipton MJ. “Cross-adaptation”: habituation to short repeated cold-water immersions affects the response to acute hypoxia in humans. *J Physiol*, 2010; 588: 3605–3613.
66. Bleakley CM, Davison GW. What is the biochemical and physiological rationale for using cold-water immersion in sports recovery? A systematic review. *Br J Sports Med*, 2010; 44: 179–187.
67. Parouty J, Al Haddad H, Quod M et al. Effect of cold water immersion on 100-m sprint performance in well-trained swimmers. *Eur J Appl Physiol*, 2010; 109: 483–490.
68. Al Haddad H, Laursen PB, Ahmaidi S, Buchheit M. Influence of cold water face immersion on post-exercise parasympathetic reactivation. *Eur J Appl Physiol*, 2010; 108: 599–606.
69. Mundel T, Bunn SJ, Hooper PL, Jones DA. The effects of face cooling during hyperthermic exercise in man: evidence for an integrated thermal neuroendocrine and behavioural response. *Exp Physiol*, 2007; 92: 187–195.
70. Park KS, Choi JK, Park YS. Cardiovascular regulation during water immersion. *Appl Human Sci*, 1999; 18: 233–241.
71. Schiller F. *Ballady*. 1st Ed. Nasza Księgarnia, Warszawa 1954.
72. Henderson H, Wilson RC. Water incident related hospital activity across England between 1997/8 and 2003/4: a retrospective descriptive study. *BMC Public Health*, 2006; 6: 210.
73. Modell JH. Prevention of needless deaths from drowning. *South Med J*, 2010; 103: 650–653.
74. Brenner RA, Trumble AC, Smith GS et al. Where children drown United States 1995. *Pediatrics*, 2001; 108: 85–89.
75. Wintemute GJ, Drake C, Wright M. Immersion events in residential swimming pools. Evidence for an experience effect. *Am J Dis Child*, 1991; 145: 1200–1203.
76. Ternesten-Hasseus E, Johansson EL, Bende M, Millqvist E. Dyspnea from exercise in cold air is not always asthma. *J Asthma*, 2008; 45: 705–709.
77. Yamane M, Oida Y, Ohnishi N et al. Effects of wind and rain on thermal responses of humans in a mildly cold environment. *Eur J Appl Physiol*, 2010; 109: 117–123.
78. Mukhtar MR, Patrick JM. Bronchoconstriction: a component of the ‘diving response’ in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1984; 53: 155–158.
79. Jay O, Christensen JP, White MD. Human face-only immersion in cold water reduces maximal apnoeic times and stimulates ventilation. *Exp Physiol*, 2007; 92: 197–206.
80. Gorini C, Philbin K, Bateman R, Mendelowitz D. Endogenous inhibition of the trigeminally evoked neurotransmission to cardiac vagal neurons by muscarinic acetylcholine receptors. *J Neurophysiol*, 2010; 104: 1841–1848.
81. Chappelle MW. CIH: from sleep apnea to breath-hold diving. Is sympathetic activation inevitable? *Clin Auton Res*, 2010; 20: 53–55.
82. Heusser K, Dzamonja G, Tank J et al. Cardiovascular regulation during apnea in elite divers. *Hypertension*, 2009; 53: 719–724.
83. Ivancev V, Palada I, Valic Z et al. Cerebrovascular reactivity to hypercapnia is unimpaired in breath-hold divers. *J Physiol*, 2007; 582: 723–730.
84. Peng YJ, Nanduri J, Yuan G et al. NADPH oxidase is required for the sensory plasticity of the carotid body by chronic intermittent hypoxia. *J Neurosci*, 2009; 29: 4903–4910.
85. Prabhakar NR, Dick TE, Nanduri J, Kumar GK. Systemic cellular and molecular analysis of chemoreflex-mediated sympathoexcitation by chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol*, 2007; 92: 39–44.
86. Fu XW, Wang D, Nurse CA et al. NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97: 4374–4379.
87. Nanduri J, Wang N, Yuan G et al. Intermittent hypoxia degrades HIF-2 α via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009; 106: 1199–1204.
88. Ferrer MD, Sureda A, Batle JM et al. Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Radic Res*, 2007; 41: 274–281.
89. Sureda A, Ferrer MD, Batle JM et al. Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc*, 2009; 41: 1271–1276.
90. Shlush LI, Skorecki KL, Itzkovitz S et al. Telomere elongation followed by telomere length reduction in leukocytes from divers exposed to intense oxidative stress — implications for tissue and organismal aging. *Mech Ageing Dev*, 2011; 132: 123–130.
91. Wierzbza TH, Olek RA, Fedeli D, Falcioni G. Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. *J Physiol Pharmacol*, 2006; 57 (suppl. 10): 115–131.
92. Scholander PF, Hammel HT, Lemessurier H et al. Circulatory adjustment in pearl divers. *J Appl Physiol*, 1962; 17: 184–190.
93. Yoshinaga M, Kamimura J, Fukushima T et al. Face immersion in cold water induces prolongation of the QT interval and T-wave changes in children with nonfamilial long QT syndrome. *Am J Cardiol*, 1999; 83 (A8): 1494–1497.
94. Mukerji B, Alpert MA, Mukerji V. Right ventricular alterations in scuba divers: findings on electrocardiography and echocardiography. *South Med J*, 2000; 93: 673–676.
95. Mantoni T, Belhage B, Pott FC. Survival in cold water. Physiological consequences of accidental immersion in cold water. *Ugeskr Laeger*, 2006; 168: 3203–3205.
96. Tipton MJ, Kelleher PC, Golden FS. Supraventricular arrhythmias following breath-hold submersions in cold water. *Undersea Hyperb Med*, 1994; 21: 305–313.

STRESZCZENIA

**XVI SYMPOZJUM
SEKCJI KARDIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ
POLSKIEGO TOWARZYSTWA KARDIOLOGICZNEGO**

Słowo od Zarządu Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK

- Otrzymaliśmy 46 streszczeń. Według deklaracji autorów 30 prezentuje doniesienia w zakresie badań podstawowych w kardiologii eksperymentalnej. Pozostałe zadeklarowano jako eksperymenty w badaniach klinicznych. Każde streszczenie zostało ocenione w skali 1–5 przez co najmniej 4 recenzentów. Średnie oceny znalazły się w zakresie 1,50–4,75.
- Podobnie jak w latach ubiegłych w czasie Sympozjum odbędzie się Sesja Nagrody Zarządu Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK. Wezmą w niej udział autorzy 10 najwyższej ocenionych streszczeń. Średnia ocen tych doniesień mieści się w zakresie 4,25–4,75. Laureat zostanie wybrany na podstawie oceny, na którą złożą się:
 - oceny recenzentów uzyskane w procesie kwalifikacji (1–5) — 50%;
 - oceny jury w czasie Sympozjum, obejmujące sposób prezentacji i jakość dyskusji (1–5) — 50%.
- Fundatorem Nagrody jest Pfizer Polska Sp. z o.o.

Lista streszczeń Sesji Nagrody Zarządu Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK

1739. Charakterystyka fenotypów komórek śródbłonka serca podczas angiogenezy i limfangiogenezy w rozwoju osobniczym myszy

Aleksandra Flaht¹, Maria Madej², Anna Ratajska¹

¹Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

²Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Anatomii Patologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

1749. Mechanizmy przeciwmiażdżycowego działania agmatyny — badania na modelu eksperymentalnym miażdżycy: myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (*apoE-knockout mice*)

Anna Niepsuj, Rafał Olszanecki, Ryszard Korbut

Katedra Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

1758. Angiotensin-converting enzyme inhibitors modulate activation of the tissue factor-thrombin pathway within aortic valves in patients with aortic stenosis: links between coagulation, inflammation and neovascularisation

Joanna Natorska¹, Grzegorz Grudzień², Jerzy Sadowski¹, Anetta Undas¹

¹Institute of Cardiology, Jagiellonian University School of Medicine, Cracow

²John Paul II Hospital, Cracow

1759. Identification of SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in human myocardium

Marcin Syzdół¹, Wojciech Wojakowski¹, Ewa Zuba-Surma², Adam Kowalówka³, Justyna Drukała⁴, Ryszard Bachowski³, Stanisław Woś³, Józef Dulak², Mariusz Ratajczak⁵, Michał Tendera¹

¹3rd Clinic of Cardiology, Silesian Medical University, Katowice

²Department of Medical Biotechnology, Jagiellonian University, Cracow

³2nd Department of Cardiac Surgery, Silesian Medical University, Katowice

⁴Department of Cell Biology, Jagiellonian University, Cracow

⁵Stem Cell Institute, Louisville, USA

1767. Zaburzenia czynności kinaz Src jako substrat czynnościowy predysponujący do migotania przedsionków

Tomasz Bonda¹, Magdalena Dziemidowicz¹, Tomasz Hirnle², Iwona Dmitruk², Karol Kamiński³, Maria M. Winnicka¹

¹Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

²Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

³Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

1768. Rola interleukiny-6 w zależności od stymulacji beta-adrenergicznej aktywacji szlaku MEK/ERK w sercu myszy

Magdalena Dziemidowicz¹, Karol Kamiński², Tomasz Bonda¹, Andrzej Taranta¹, Włodzimierz Musiał², Maria Małgorzata Winnicka¹

¹Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

²Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

1771. Suplementacja kwasem dokozaheksaenowym, ale nie kwasem eikozapentaenowym, hamuje aktywność NF-kappaB i zapobiega dysfunkcji lewej komory serca w odpowiedzi na przeciążenie ciśnieniowe

Monika Duda¹, Paweł Dobrzyń², Michał Mączewski¹, Agnieszka Dobrzyń², Urszula Mackiewicz¹

¹Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

²Pracownia Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego, Warszawa

1776. Przebudowa kardiomiocytów, cytoszkieletu komórkowego i macierzy zewnątrzkomórkowej w mysim modelu genetycznie uwarunkowanej kardiomiopatii

Urszula Mackiewicz¹, Elżbieta Czarnowska², Magdalena Brudek², Gabor Csanyi³, Andrzej Fedorowicz³, Elżbieta Grochał³,

Urszula Tyrankiewicz⁴, Tomasz Skórka⁴, Bohdan Lewartowski¹, Stefan Chłopiczki³

¹Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

²Zakład Patologii, Instytut Pomnik — Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa

³Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Katedra Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

⁴Zakład Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej, Instytut Fizyki Jądrowej, Polska Akademia Nauk, Kraków

1778. Ekspresja genów w świeżym zawale serca

Marek Kiliszek¹, Beata Burzyńska², Marcin Michalak¹, Monika Góra², Aleksandra Winkler¹, Monika Niewiadomska², Katarzyna Rawa², Grzegorz Opolski¹

¹Katedra i Klinika Kardiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

²Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

1779. Ocena farmakokinetyki i efektów tkankowych uwolnionego paklitakselu z cewnika balonowego w ścianie naczynia na modelu hiperplazji neointymy tętnic wieńcowych i obwodowych świni domowej

Piotr P. Buszman, Krzysztof Milewski, Michał Jelonek, Wanda Jackiewicz, Wojciech Wojakowski, Paweł E. Buszman

Centrum Badawczo-Rozwojowe, Polsko-Amerykańskie Kliniki Serca, Ustroń

1216

Prevalence and incidence of myocardial dysfunction and chronic heart failure in type 1 diabetes — a still unresolved issue

Ewa Konduracka¹, Maciej Małecki², Grażyna Cieślak³,
Danuta Galicka-Latała², Paweł Rostow¹,
Artur Pietrucha¹, Jadwiga Nessler¹

¹Coronary Heart Diseases Clinic, Jagiellonian University School of Medicine, John Paul II Hospital, Cracow

²Chair and Clinic of Metabolic Diseases, Cracow

³Metabolic Diseases Treatment Center, Cracow

Background: Diabetic patients (DP) are exposed to an increased risk of chronic heart failure (CHF), as compared to the non-diabetic ones, yet a majority of studies to date focused on type 2 diabetes. Consequently, prevalence and incidence of CHF in type 1 diabetes still remains an unresolved issue.

Aims: To evaluate prevalence and incidence of myocardial dysfunction and CHF in long-lasting type 1 diabetes, estimated by echocardiography, levels of NT-pro BNP, chest radiographs and clinical symptoms.

Methods: 1217 type 1 DP (baseline mean age 51.29 ± 10.37 years) and 1204 non-diabetic controls, matched in gender and age, following initial clinical examinations, underwent a 7-year follow-up in terms of CHF.

Results: There were no differences between the prevalence of CHF in DP (3.70% vs. 2.54% in the controls; $p = 0.07$), whereas the incidence was 0.02% per year vs. 0.01%, respectively. Only in both coronary and hypertensive subjects diastolic CHF was revealed in 32.26% of DP and 14.29% of the controls; $p = 0.006$, whereas both diastolic and systolic CHF occurred in 10.75% of DP vs. in 12.99% of the controls; $p = 0.65$.

Conclusions: In the era of modern insulin therapy, CHF in type 1 diabetes manifests itself only when it is actually complemented with hypertension or coronary disease. In hypertensive DP the incidence of CHF was similar to the hypertensive controls, which might potentially be due to pharmacotherapy. It was the coexistence of coronary disease, hypertension, nephropathy and ageing in DP that actually caused higher incidence of CHF in DP vs. the controls.

1228

Badanie przeciwmiażdżycowego potencjału beta-blokerów, ze szczególnym uwzględnieniem nebiwololu — na modelu eksperymentalnym miażdżycy: myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (*apoE-knockout mice*)

Katarzyna Kuś, Jacek Jawień, Ryszard Korbut

Katedra Farmakologii, Collegium Medicum,
Uniwersytet Medyczny, Kraków

Ostatnie badania wykazały dobroczynne działanie kardiologiczne nebiwololu — beta-adrenolityku III generacji. Hipoteza robocza niniejszej pracy zakładała, że nebiwolol może hamować rozwój zmian miażdżycowych. Badania prowadzone były na najnowszym eksperymentalnym modelu zwierzęcym miażdżycy: myszach z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (myszy apoE-knockout) — jedynym, jak dotąd, w Polsce. Poddano badaniu 30 samic myszy apoE-knockout w wieku 8 tygodni (podzielonych na grupy o liczebności $n = 10$), o podłożu genetycznym C57BL/6J. Oprócz grupy kontrolnej, grupy eksperymentalne (w każdej $n = 10$) otrzymywały tę samą dietę, zmieszaną z nebiwolelem w dawce 2 $\mu\text{mol/kg mc./dobę}$ oraz z metoprololem w dawce 90 mg/kg mc./dobę . W wieku 6 miesięcy wszystkie myszy poddano eutanazji i pobrano od nich osocze, serca i wypreparowane aorty. Aorty różniły się stopniem miażdżycy pomiędzy grupą kontrolną a grupami, którym podawano leki. Mierzony metodą „*en face*” procent całkowitej powierzchni aorty zajętej przez barwione Sudanem IV zmiany wynosił: w grupie kontrolnej $14,6 \pm 2,1\%$, podczas gdy w grupie traktowanej nebiwolelem $9,23 \pm 1,8\%$ ($p < 0,05$), zaś w grupie otrzymującej metoprolol $12,4 \pm 2,1\%$ ($p > 0,05$). „*Cross-section*” korzeni aorty ujawnił również różnicę w powierzchni zmian miażdżycowych. Liczona w 8 kolejnych skrawkach średnia zmian \pm SEM zajętych przez barwione ORO zmiany wynosiła: $91\,416 \pm 8\,357 \mu\text{m}^2$ w grupie kontrolnej przeciwko $63\,125 \pm 8\,455 \mu\text{m}^2$ w grupie otrzymującej nebiwolol ($p < 0,05$), zaś $82\,947 \pm 9\,373 \mu\text{m}^2$ w grupie z podawanym metoprololem ($p > 0,05$). Podane związki nie zmieniły w sposób statystycznie znamiennej profilu lipoproteinowego cholesterolu w osoczu oraz całkowitego stężenia cholesterolu i triglicerydów. Wskaźniki zapalenia: sVCAM-1, MCP-1, IL-6, IL-12 oraz SAA wykazywały tendencję do spadku pod wpływem nebiwololu. Niniejsze badanie jest pierwszym na świecie doniesieniem, w którym wykazano na najnowszym eksperymentalnym modelu zwierzęcym miażdżycy pozytywny efekt farmakologicznego podawania nebiwololu na proces aterogenezy.

1737

Beneficial effects of L-leucine and L-valine on arrhythmias, hemodynamics and myocardial morphology in rats

Katarzyna Mitrega¹, Michał Żorniak¹, Benoy Varghese¹,
Dariusz Lange², Jerzy Nożyński³, Szymon Białka¹,
Tadeusz F. Krzemiński¹

¹Chair and Department of Pharmacology, Medical University of Silesia, Zabrze

²Department of Tumor Pathology, M. Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch, Gliwice

³Silesian Centre for Heart Diseases, Zabrze

Branched chain amino acids (BCAA) have been shown to have a general protective effect on the heart in different animal

models as well as in humans. However, so far no attempt has been made to specifically elucidate their influence on arrhythmias. Our study was performed to evaluate whether an infusion of either L-leucine or L-valine in a dose of 1 mg/kg/h 10 min before a 7-min period of left anterior descending artery occlusion followed by 15 min of reperfusion, had an effect on arrhythmias measured during the reperfusion phase in the ischemia- and reperfusion-induced arrhythmias model in rats *in vivo*. The effect of the infusion of these substances on mean arterial blood pressure was monitored throughout the experiment. Both of the tested amino acids exhibited significant antiarrhythmic properties. L-leucine reduced the duration of ventricular fibrillation ($p < 0.05$) and L-valine decreased the duration of ventricular fibrillation ($p < 0.001$) and ventricular tachycardia ($p < 0.05$). The two amino acids were generally hypotensive. L-valine lowered blood pressure in all phases of the experiment ($p < 0.05$) while L-leucine lowered this parameter mainly towards the end of occlusion and reperfusion ($p < 0.05$). In addition, 30 min infusion of the amino acids in the used dose did not produce any apparent adverse histological changes that were remarkably different from control. In summary, the results of our study suggest that L-leucine and L-valine in the dose that was used attenuates arrhythmias and are hypotensive in their influence. Our findings lend support to the many ongoing investigations into the benefit of the application of L-leucine and L-valine in cardiology like their addition to cardioplegic solutions.

1738

Hamujący wpływ aliskirenu na rozwój zakrzepicy żyłnej u szczura

Justyna Magdalena Hermanowicz, Agnieszka Leszczyńska, Karol Kramkowski, Andrzej Mogielnicki, Włodzimierz Buczek

Zakład Farmakodynamiki, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

Dotychczasowe badania wskazują na istnienie powiązań między układem RAS a procesami krzepnięcia i fibrylizacji (Thromb Haemost 1997, Circulation 1993). Między innymi wykazano, że mechanizm korzystnego wpływu leków blokujących RAS na układ sercowo-naczyniowy związany jest z zahamowaniem procesu zakrzepowego, a efekt ten zależy od uwalniania ze śródbłonka tlenu azotu (NO) i prostacyliny (PGI₂) (J Physiol Pharmacol 1999, Thromb Haemost 1998). Pojedyncze doniesienia sugerują, że aliskiren, pierwszy doustny inhibitor reniny, poza właściwościami hipotensyjnymi może posiadać również działanie przeciwzakrzepowe (Hypertension 2008). Celem niniejszego badania była ocena wpływu aliskirenu na żylny proces zakrzepowy u szczurów normotensyjnych (Wistar) oraz szczurów z nadciśnieniem naczyniowo-nerkowym (2K-1C). Zbadano również potencjalny udział NO w tym procesie. Po 6 tygodniach 2K-1C rozwinęły nadciśnienie naczyniowo-nerkowe (2K-1C wg Goldblatta) (ciśnienie skur-

czowe powyżej 140 mm Hg). Zwierzęta otrzymywały aliskiren w dawce 10, 30, 100 mg/kg p.o. przez 10 dni. Zakrzepicę żylną wywoływano poprzez podwiązanie żyły głównej brzusznej wg Reyers i wsp. W osoczu oznaczono aktywność t-PA, PAI-1 metodą immunoenzymatyczną ELISA. Aliskiren w najwyższej dawce (100 mg/kg) obniżył skurczowe ciśnienie tętnicze krwi (SBP) w grupie zwierząt nadciśnieniowych ($168 \pm 4,79$ mm Hg przed v. $150 \pm 4,37$ mm Hg po podaniu aliskirenu; * $p < 0,05$). Nie stwierdzono natomiast zmian SBP u zwierząt normotensyjnych. Zaobserwowano zależne od dawki zmniejszenie masy uformowanego zakrzepu u osobników hipertensyjnych ($0,39 \pm 0,16$; $0,31 \pm 0,1$ i $0,13 \pm 0,09$ mg odpowiednio w dawkach 10, 30, 100 mg/kg v. $0,6 \pm 0,13$ mg w grupie kontrolnej; NS; NS; * $p < 0,05$), jak również u osobników normotensyjnych ($0,37 \pm 0,05$; $0,32 \pm 0,13$; $0,10 \pm 0,07$ mg odpowiednio w dawkach 10, 30, 100 mg/kg v. $0,68 \pm 0,17$ mg w grupie kontrolnej; NS; NS; * $p < 0,05$). Wykazano także wzrost aktywności t-PA ($1,56 \pm 0,17$; $1,62 \pm 0,17$; $2,29 \pm 0,35$ ng/ml odpowiednio dla dawek 10, 30, 100 mg/kg v. $1,33 \pm 0,14$ w grupie kontrolnej; NS; NS; * $p < 0,05$) oraz brak wpływu aliskirenu na aktywność PAI-1 ($3,95 \pm 0,33$; $4,26 \pm 0,21$; $4,38 \pm 0,38$ ng/ml odpowiednio dla 10, 30, 100 mg/kg v. $4,06 \pm 0,17$ w grupie kontrolnej; NS; NS; NS). Podanie inhibitora syntazy tlenu azotu (L-NAME) (30 mg/kg s.c.) skutkowało zniesieniem przeciwzakrzepowego działania aliskirenu. Podsumowując uzyskane wyniki, można stwierdzić, że aliskiren poprzez wzrost aktywności fibrynolitycznej hamuje rozwój zakrzepicy żyłnej, prawdopodobnie w mechanizmie zależnym od NO, a niezależnym od ciśnienia krwi.

1739

Charakterystyka fenotypów komórek śródbłonka serca podczas angiogenezy i limfangiogenezy w rozwoju osobniczym myszy

Aleksandra Flaht¹, Maria Madej², Anna Ratajska¹

¹Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

²Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Anatomii Patologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Przedmiotem pracy było zweryfikowanie hipotezy, że fenotypy komórek śródbłonka wykazują dynamiczną zmienność w czasie poprzedzającym oraz podczas formowania się naczyń limfatycznych i krwionośnych w sercu płodowym. Serca pochodzące z różnych etapów rozwoju płodowego myszy badano pod względem ekspresji antygenów śródbłonka naczyniowego metodami immunohistochemicznymi. Analizę prowadzono w mikroskopach świetlnym, konfokalnym i stereoskopowym. Proces angiogenezy rozpoczyna się od bieguna żylnego serca i postępuje od bruzdy przedsionkowo-komorowej powierzchni przeponowej serca w kierunku obu koniuszków. Początkowo w rejonie bruzdy przedsionkowo-komorowej serca w stadium

11,5 dpc pojawiają się struktury podobne do tubul naczyńowych wykazujące obecność antygenów Lyve i CD31. Na pozostałej powierzchni serca dostrzega się pod nasierdziem pojedyncze, rozproszone komórki Lyve+, które nie mają charakteru angioblasta/śródbłonka, gdyż brak w nich ekspresji antygeny CD31. Rozmieszczenie tych komórek wykazuje gradient: jest ich najwięcej przy bruzdzie przedsionkowo-komorowej, a najmniej w kierunku koniuszków serca. Gradient ten zanika w stadium 13,5 dpc. Rozproszone pojedyncze komórki o fenotypie Lyve+, CD31- znajdują się pomiędzy tubulami naczyńowymi do końca życia płodowego, a nawet w okresie postnatalnym. Komórki Lyve+, w miarę dalszego rozwoju, grupują się w skupienia nietworzące początkowo światła, ale wykazujące ekspresję antygeny połączeń międzykomórkowych śródbłonka naczyńowego: VE-kadheryny. Niektóre skupienia komórek składają się z dwóch populacji: o fenotypach Lyve+ lub CD31+. Podczas formowania się światła naczynia/tubul naczyńowych ekspresja Lyve pokrywa się z ekspresją antygeny CD31 w większości komórek śródbłonka. Pomiedzy komórkami śródbłonka zróżnicowanych naczyń występuje antygen połączeń międzykomórkowych VE-kadheryna; antygen ten jest również obecny w odgałęzieniach angiogenychnych penetrujących do miokardium z podnasierdzia. W niektórych naczyniach komórki śródbłonka wykazują odmienny fenotyp: populacja komórek o fenotypie Lyve+ CD31- lokalizuje się obok populacji komórek Lyve-, CD31+. Czynniki transkrypcyjny Prox-1 pojawia się w populacji komórek śródbłonka bieguna żylnego serca w stadium 13 dpc oraz w śródbłonkach w pobliżu wielkich naczyń serca (aorty i pnia płucnego) w 15 dpc. Znajdowany jest także w populacji komórek o fenotypie Lyve+ tworzącej struktury naczyńowe. Czynniki transkrypcyjny Prox-1 obecny jest również w niektórych komórkach wsierdzia (przy płatkach zastawek przedsionkowo-komorowych). Wyniki wskazują, że naczynia o fenotypie Lyve+ pochodzą z komórek progenitorowych Lyve+ rozproszonych pod nasierdziem. Komórki te nie mają charakteru śródbłonka/angioblasta (CD31-), ale nabywają go po utworzeniu światła naczynia. Antygen Lyve, podobnie jak Prox1 nie jest charakterystyczny jedynie dla komórek śródbłonka naczyń limfatycznych.

1740

„Wyspy krwiotwórcze” serca myszy jako struktury progenitorowe powstających naczyń wieńcowych w życiu osobniczym

Maria Madej¹, Aleksandra Flaht²,
Ewa Jankowska³, Anna Ratajska²

¹Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Anatomii Patologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

²Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

³Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Nazwa „wyspy krwiotwórcze” wywodzi się z opisu struktury o budowie pęcherzyka otoczonych śródbłonkiem naczyniowym oraz zawierających erytroblasty. Wyspy krwiotwórcze są źródłem erytroblastów i strukturami początkowymi dla nowopowstających naczyń krwionośnych pęcherzyka żółtkowego zarodka. Struktury podobne do wysp krwiotwórczych znaleziono także w sercu płodowym w początkowym okresie tworzenia naczyń wieńcowych. Celem pracy było zbadanie rozmieszczenia wysp krwiotwórczych w sercu płodowym oraz scharakteryzowanie struktury i fenotypów składników komórkowych wysp krwiotwórczych myszy w okresie poprzedzającym rozpoczęcie krążenia krwi w systemie wieńcowym, tj. do stadium 13,5 dpc. Badania prowadzono za pomocą metod histologicznych, ultrastrukturalnych oraz immunohistochemicznych z wykorzystaniem swoistych przeciwciał. Wyspy krwiotwórcze lokalizują się dystalnie od ognisk pierwotnej angiogenezy wieńcowej, która rozpoczyna się intensywną tubulogenezą na biegunie żylnym serca w bruzdzie przedsionkowo-komorowej powierzchni przeponowej serca i maleje w kierunku koniuszków serca. Wyspy krwiotwórcze znajdują się w bruzdach międzykomorowych: przystożkowej oraz podzatkowej u myszy lub w ich pobliżu oraz w rejonie obu koniuszków serca. W bruzdach międzykomorowych serc 12–13 dpc wyspy występują zwykle po kilka w odległościach 30–40 μm od siebie. W sercach wczesnych stadiów rozwoju (11 dpc) mogą pojawiać się w mniejszej liczbie. Rozmieszczenie wysp krwiotwórczych serca jest skorelowane z grubością ścian miokardium: tj. wyspy pojawiają się w miejscach najdalszych od strumienia krwi omywającego wsierdzie. Wnętrze wysp jest wypełnione krwinkami czerwonymi, stanowiącymi przewagę liczebną, oraz limfocytami i płytkami krwi, które pojawiają się w wyspach w mniejszej liczbie. Krwinki czerwone znajdują się na różnych etapach rozwoju i dojrzałości, najczęściej są to komórki linii wczesnego erytroblasta wykazujące ekspresję antygeny Terr119, a niektóre z nich wykazują też ekspresję antygeny CD34. Nie znaleziono komórek o fenotypie Lyve+ w wyspach krwiotwórczych serca. Niektóre wyspy krwiotwórcze są podzielone na mniejsze obszary komórkami (śródbłonka? fibroblastami?) lub pasmami tkanki łącznej; w mniejszych obszarach znajdują się krwinki czerwone. Krwinki mogą przemieszczać się poza ścianę otaczającego je śródbłonka naczyniowego. Przemawiają za tym obrazy morfologiczne znacznie odkształconych krwinek z długimi, krętymi wypustkami tkwiącymi w ścianie wyspy pomiędzy komórkami śródbłonka. Krwinki znajdowane są także luźno rozmieszczone w miokardium lub pod nasierdziem, bez związku ze ścianą naczyniową. W miarę rozwoju naczyń wieńcowych wyspy krwiotwórcze wydłużają się w podobne do tubul struktury naczyńowe wypełnione krwinkami, ale znaczna ich część nie wykazuje drożności z naczyniami krążenia wieńcowego. Dopiero po nawiązaniu połączenia z naczyńiami naczyniowych z aortą i zatoką wieńcową tubule naczyńowe zlewają się w jeden system naczyń wieńcowych. Podsumowując, analiza morfologii wysp krwiotwórczych serca w poszczególnych stadiach ich dojrzewania jest wstępnym eta-

pem prowadzącym do bliższego poznania mechanizmów angio- i waskulogenezy naczyń wieńcowych serca.

1742

Ocena porównawcza właściwości protekcyjnych różnych rodzajów kardioplegii krystalicznej z wykorzystaniem hodowli kardiomiocytów *in vitro*

Rafał Nowicki¹, Jolanta Saczko², Katarzyna Biezuńska-Kusiak², Julita Kulbacka², Agnieszka Chwilkowska², Anna Choromańska², Nina Skołucka², Andrzej Dumański¹, Wojciech Kustrzycki¹

¹Katedra i Klinika Chirurgii Serca, Akademia Medyczna, Wrocław

²Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Akademia Medyczna, Wrocław

Wstęp: Powszechnie uznaną metodą ochrony serca przed skutkami niedokrwienia podczas zabiegu kardiochirurgicznego jest zastosowanie kardioplegii. Kardioplegia to płyn zawierający m.in. jony potasu; podawany do naczyń wieńcowych (po zatrzymaniu krążenia wieńcowego) w postaci roztworu wodnego (kardioplegia krystaliczna) lub po zmieszaniu z krwią pacjenta (kardioplegia krwista). Pomimo licznych badań doświadczalnych na zwierzętach oraz obserwacji klinicznych porównujących różne rodzaje, sposoby i warunki podawania kardioplegii nie wypracowano dotychczas uniwersalnego sposobu protekcji serca podczas operacji. Rodzaj stosowanej kardioplegii zależy obecnie od doświadczeń poszczególnych ośrodków lub konkretnego kardiochirurga. Niewielu autorów wykorzystuje hodowlę komórkową do badań nad porównaniem, udoskonaleniem lub wzbogaceniem preparatów kardioplegicznych.

Cel: Celem pracy było wykorzystanie prostego modelu badawczego, jakim są ludzkie kardiomiocyty hodowane *in vitro* (HCM), do porównania właściwości biochemicznych i kardioprotekcyjnych stosowanych powszechnie preparatów kardioplegii krystalicznej: handlowych (Plegisol, Custodiol), jak i przygotowanego laboratoryjnie na bazie formuły z St. Thomas' Hospital w Londynie (STH2).

Metody: Ludzkie kardiomiocyty (HCM) inkubowano w temp. 37°C w płynie hodowlanym Myocyte Growth Medium z dodatkiem 10% surowicy płodowej i antybiotyków w atmosferze 5% CO₂. Następnie komórki przenoszono do roztworów kardioplegii krystalicznej (Custodiol, Plegisol, ST2) i inkubowano w temperaturze pokojowej 0,5; 1; 2 i 4 godziny. Stan metaboliczny mitochondriów kardiomiocytów oznaczono na podstawie pomiaru aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej (testem MTT). Do oceny stresu oksydacyjnego wykorzystano badanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA) oraz oznaczenie ekspresji MnSOD metodą immunocytochemiczną (ABC). Badania wykonano po 0,5; 1; 2 i 4 godzinach inkubacji.

Wyniki: Wszystkie rodzaje kardioplegii nie wpłynęły znacząco na poziom dehydrogenazy mitochondrialnej (IC > 50).

Jednak Custodiol wydaje się optymalnym roztworem, gdyż w czasie inkubacji od 0,5 do 2 h stan metaboliczny mitochondriów utrzymywał się na poziomie wyjściowym (ok. 100%). Po 4 h inkubacji stan ten był zbliżony we wszystkich próbkach, niezależnie od rodzaju kardioplegii, w której inkubowano kardiomiocyty. Poziom MDA był podwyższony w stosunku do próby kontrolnej. W czasie od 0,5 h do 2 h inkubacji we wszystkich grupach (najbardziej w przypadku STH2, najmniej w przypadku Custodiolu) peroksydacja lipidów stopniowo malała, aby po 4 h inkubacji ponownie wzrosnąć. Tendencja spadkowa po 4 h inkubacji utrzymała się jedynie w przypadku Custodiolu. Ekspresja enzymu antyoksydacyjnego — MnSOD była najwyższa po 0,5 h inkubacji, po czym stopniowo spadała we wszystkich roztworach bez wyraźnych różnic.

Wnioski: Z przeprowadzonego testu MTT wynika, że wszystkie rodzaje kardioplegii nie zaburzają w istotny sposób funkcji mitochondrium, jednak najbardziej bezpiecznym roztworem wydaje się Custodiol. Do podobnego wniosku można dojść po analizie stężenia MDA, które po 0,5 h i 4 h inkubacji jest najniższe w przypadku Custodiolu. Nie zaobserwowano istotnych różnic w obu roztworach kardioplegicznych opartych na formule St. Thomas' Hospital, niezależnie, czy był to gotowy preparat handlowy (Plegisol), czy też robiony w warunkach laboratoryjnych roztwór. Biorąc pod uwagę niskie koszty tego ostatniego, wynik badania może mieć istotne przesłanki ekonomiczne.

1743

Ekspresja mRNA receptorów V1a wazopresyny w sercu i nerkach u szczurów Sprague Dawley z zawałem mięśnia sercowego i chronicznie stresowanych

Elwira Milik, Ewa Szczepańska-Sadowska, Agnieszka Cudnoch-Jędrzejewska

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Ekspresja mRNA receptorów V1a wazopresyny w sercu i nerkach u szczurów Sprague Dawley z zawałem mięśnia sercowego i chronicznie stresowanych. Zarówno zawał mięśnia sercowego, jak i chroniczny stres prowadzą do wzrostu aktywności układu wazopresynergicznego i zwiększonego wydzielania wazopresyny. Wazopresyna reguluje czynność układu sercowo-naczyniowego i gospodarkę wodno-elektrolitową, a efektywność jej działania zależy od poziomu receptorów w sercu i w nerkach. Celem pracy było wyjaśnienie, czy zawał mięśnia sercowego i chroniczny stres wywołują zmiany ekspresji mRNA receptorów V1a wazopresyny w prawej i lewej komorze serca oraz w korze i rdzeniu nerek. Badania wykonano na szczurach Sprague Dawley. W 10. tygodniu życia szczury były poddane operacji podwiązania lewej tętnicy wieńcowej w celu wywołania zawału mięśnia sercowego lub operacji pozorowanej we-

dług metody opisanej przez Seyle i wsp. (1960) i zmodyfikowanej przez Dobrucha i wsp. (2005). Część zwierząt z zawałem i część z operacją pozorowaną została poddana chronicznemu stresowaniu według procedury Grippo i wsp. (2002) zmodyfikowanej przez Cudnoch-Jędrzejewską i wsp. (2010). Pozostałe zwierzęta stanowiły grupę kontrolną w stosunku do chronicznie stresowanych. Ekspresja mRNA receptorów V1a była dobrze wyrażona we wszystkich badanych fragmentach narządów. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji V1aR mRNA u zwierząt z zawałem i bez zawału ani w sercu, ani w nerkach. U zwierząt chronicznie stresowanych i chronicznie stresowanych z zawałem ekspresja V1a w rdzeniu i w korze nerek była istotnie wyższa niż u zwierząt kontrolnych. Badania wskazują, że chroniczny stres wywołuje istotny wzrost ekspresji mRNA receptorów V1a wazopresyny w nerkach, co może przyczynić się do redukcji przepływu nerkowego krwi w nerkach podczas stresu.

Dobruch J, Cudnoch-Jędrzejewska A, Szczepańska-Sadowska E. Enhanced involvement of brain vasopressin V1 receptors in cardiovascular responses to stress in rats with myocardial infarction. *Stress*, 2005; 8: 273–284; Cudnoch-Jędrzejewska A, Szczepańska-Sadowska E, Dobruch J, Gomółka R, Puchalska L. Brain vasopressin V(1) receptors contribute to enhanced cardiovascular responses to acute stress in chronically stressed rats and rats with myocardial infarction. *Am J Physiol*, 2010; 298: R672–R680.

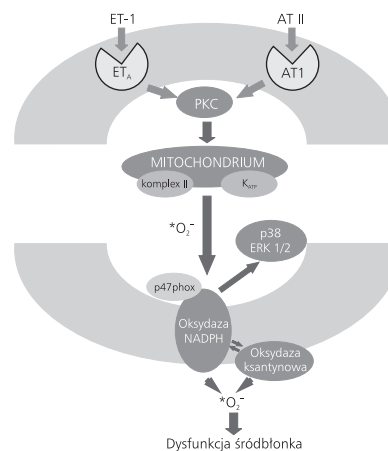
1744

Komórkowy mechanizm zwiększonej naczyniowej produkcji O₂⁻ pod wpływem angiotensyny i endoteliny

Emilia Klemenska, Anna Konior, Andrzej Beręsewicz

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Centralnym elementem procesu miażdżycowego i destabilizacji już uformowanych blaszek miażdżycowych są: (i) naczyniowa nadprodukcja anionorodnika nadtlenkowego (O₂⁻) i stres oksydacyjny; (ii) dysfunkcja śródbłonna oraz (iii) zmiana fenotypu śródbłonna na prozapalny i prokrzepliwy. Czynniki zwiększającymi naczyniową produkcję O₂⁻ są czynniki ryzyka choroby sercowo-naczyniowej, działające głównie poprzez wzrost produkcji angiotensyny (AT-II) i/lub endoteliny (ET-1) i stymulację przez te hormony naczyniowej produkcji O₂⁻. Rezultaty obecnej pracy sugerują, że komórkowy mechanizm prooksydacyjnego działania AT-II i ET-1 jest podobny i że składa się na niego następująca sekwencja wydarzeń (ryc. 1): stymulacja przez hormony receptorów błonowych, stymulacja kinazy białkowej C (PKC), „aktywacja” mitochondriów i mitochondrialnej produkcji ROS, aktywacja naczyniowej oksydazy NADPH (NOX), stymulacja przez ten enzym: wewnątrzkomórkowo — MAP-kinaz i zewnątrzkomórkowo — aktywności oksydazy ksantynowej (XO) i wewnątrznaczyniowej produkcji



Rycina 1. [1744]

O₂⁻ przez NOX i XO. Eksperymenty zostały wykonane na izolowanych sercach świnki morskiej perfundowanych metodą Langendorfa; 10-minutowa perfuzja serc z 20 pM ET-1 lub 2 μM AT-II powodowała podobny przejściowy wzrost sercowej produkcji O₂⁻ (pomiar metodą z cytochromem c) oraz dysfunkcja śródbłonna (test z acetylocholiną mierzący wazodylatację zależną od NO). Towarzyszył temu wzrost aktywności enzymatycznej NOX i XO w homogenatach serc oraz zwiększona fosforylacja p47phox (białkowy aktywator NOXNOX) oraz MAP-kinaz (p38 i ERK1/2). Zmianom tym zapobiegały: (i) blokada receptorów AT-1 i ET-A, (ii) chelerytryna — bloker PKC; (iii) TTFA i kwas 5-hydroksydekanowy — blokery mitochondrialnych kompleksu II i kanałów potasowych ATP-zależnych; (iv) tempol — wymiatacz rodników penetrujący do komórek oraz (v) apocynina — inhibitor fosforylacji p47phox i tym samym inhibitor NOX. PMA, aktywator PKC, miał takie same efekty działania jak AT-II i ET-1 i wszystkie wymienione powyżej inhibitory zapobiegały efektom PMA, co lokuje PKC ponad mitochondriami (ryc. 1). Interwencje, o których wiadomo, że zwiększają mitochondrialną produkcję O₂⁻, w tym: (i) diazoksyd (aktywator mitochondrialnych kanałów potasowych ATP-zależnych); (ii) 3-NPA (inhibitor mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej) oraz benomyl (inhibitor mitochondrialnej dehydrogenazy alkoholowej), wszystkie miały takie same efekty działania jak AT-II i ET-1 i wszystkie wymienione powyżej inhibitory (z wyjątkiem chelerytryny) zapobiegały ich efektom, co lokuje mitochondria pomiędzy PKC i NOX (ryc. 1). Dodanie do płynu perfuzyjnego beta-NADH (substrat NOX) powodowało wzrost sercowej produkcji O₂⁻, aktywację NOX i XO oraz zwiększoną fosforylację p38 i ERK1/2. Efektem tym zapobiegała apocynina, co lokuje p38 i ERK1/2 oraz XO poniżej NOX. Poznanie mechanizmu naczyniowego stresu oksydacyjnego może być pomocne przy opracowywaniu strategii leczniczych użytecznych w prewencji choroby sercowo-naczyniowej.

1745

Ośrodkowa infuzja oksytocyny obniża reakcję presyjną w odpowiedzi na ostry bodziec stresowy w nadciśnieniu tętniczym

Agnieszka Wsół, Stanisław Kowalewski, Liana Puchalska, Ewa Szczepańska-Sadowska

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Wstęp: Liczne badania wskazują na istotny udział oksytocyny (OXY) w regulacji wydzielania ośrodkowych neuropeptydów w odpowiedzi na stres oraz regulacji ciśnienia tętniczego. Dotychczas przeprowadzone w naszym ośrodku badania wykazały, że OXY reguluje odpowiedź sercowo-naczyniową na ostry bodziec stresowy w pozawałowej niewydolności serca.

Cel: Celem pracy było wyjaśnienie roli mózgowego układu oksytocynergicznego u zwierząt z nadciśnieniem tętniczym (SHR) w warunkach podstawowych i w warunkach ostrego stresu.

Metody: Badania przeprowadzono na zwierzętach czuwających w grupie 10–12-tygodniowych samców z nadciśnieniem tętniczym SHR (n = 28) i ich macierzystym szczepie normotensyjnym (WKY; n = 25). W obu grupach na tydzień przed planowanym doświadczeniem implantowano kaniulę do komory bocznej mózgu (LV), a na dzień przed doświadczeniem wprowadzano cewnik do tętnicy udowej. Pomiarów obejmujące monitorowanie ciśnienia tętniczego (MABP) oraz częstości skurczów serca (HR) wykonywano za pomocą aparatu BIOPAC MP100 (Biopac Systems, Inc.). W trakcie doświadczenia podawano 0,9% NaCl, OXY lub antagonistę OXY (OXYANT) w infuzji LV. Po 40 min infuzji zwierzęta poddawane były działaniu ostrego bodźca stresującego pod postacią *air-jet stress*.

Wyniki: Nie stwierdzono istotnych zmian MABP i HR podczas dokomorowej infuzji OXY, OXYANT lub 0,9% NaCl w spoczynku. Jednocześnie wykazano, że odpowiedź układu krążenia na ostry stres jest istotnie wyższa u szczurów SHR niż w odpowiadających im grupach kontrolnych (p < 0,05). Infuzja OXY istotnie redukowała odpowiedź presyjną na stres w grupie SHR (p < 0,05), natomiast zwiększyła w grupie zwierząt kontrolnych (p < 0,05). Podanie OXYANT zwiększyło odpowiedź presyjną jedynie w grupie kontrolnej WKY (p < 0,05).

Wnioski: Wyniki badania sugerują nieistotny udział układu oksytocynergicznego w regulacji parametrów hemodynamicznych w warunkach podstawowych, upośledzoną odpowiedź układu krążenia na stres przez endogenny układ oksytocynergiczny w nadciśnieniu tętniczym SHR. Wzrost ciśnienia w warunkach normotensji w trakcie infuzji OXY może wynikać z pobudzenia innych receptorów niż oksytocynergicznym (np. receptorów dla wazopresyny V1a), co wymaga kontynuacji badania.

1746

Wpływ atorwastatyny na gojenie się uszkodzeń śródbłonna naczyniowego *in vitro*

Katarzyna Korybalska, Edyta Kawka, Janusz Witowski

Katedra i Zakład Patofizjologii, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Wstęp: Przeszkórne interwencje wieńcowe (PCI) mogą prowadzić do uszkodzeń śródbłonna naczyniowego. Ponieważ naruszenie integralności śródbłonna sprzyja restenozie, zaburzenia jego regeneracji mogą wpływać na odległe wyniki PCI. Pomimo ochronnego wpływu statyn na funkcje naczyń, dane literaturowe z ostatnich lat nie są jednoznaczne co do oceny wpływu tych leków na proces gojenia się śródbłonna. W związku z tym celem niniejszej pracy była ocena wpływu atorwastatyny na proliferację i regenerację śródbłonna po uszkodzeniach imitujących w warunkach *in vitro* urazy po PCI.

Metody: Badania przeprowadzono na komórkach śródbłonna pochodzących z żyły pępowinowej (HUVEC). Komórki inkubowano w standardowym medium hodowlanym (M199) z wymaganymi suplementami i w obecności atorwastatyny (AT) w stężeniach, w jakich występuje ona we krwi pacjentów poddanych typowemu leczeniu (0,01–0,1 μ M). Proliferację HUVEC oceniano za pomocą testu MTT i inkorporacji bromodezoksyurydyny. Natomiast regenerację po uszkodzeniu przez zadrażnienie monitorowano za pomocą mikroskopii *time-lapse* i analizy morfometrycznej. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD. Oceniono również, jakie procesy (migracja, proliferacja) decydują o procesie regeneracji.

Wyniki: Stwierdzono, że eksperymentalne rany śródbłonna goją się w ciągu 12 godz. głównie poprzez migrację komórek z brzegów rany, a jedynie w małym stopniu przez ich proliferację (11 \pm 3% komórek proliferujących). Atorwastatyna w badanych stężeniach nie zmieniała istotnie ani kinetyki regeneracji, ani proliferacji HUVEC. Wyniki przedstawiono w tabeli.

Wnioski: W warunkach *in vitro* atorwastatyna w stężeniach istotnych klinicznie nie upośledza proliferacji i nie zaburza gojenia się uszkodzeń komórek śródbłonna naczyniowego.

1747

Metabolizm angiotensynogenu w aorcie szczura: powstawanie proangiotensyny-12

Aneta Stachowicz, Beata Bujak-Giżycka, Maciej Suski, Rafał Olszanecki, Ryszard Korbut

Katedra Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Tabela. Wpływ atorwastatyny (AT) na proliferację i regenerację śródbłonna naczyniowego [1746]

	Kontrola	AT 0,01 μM	AT 0,1 μM
Proliferacja (% kontroli, n = 3)	100	102 \pm 6	99 \pm 8
Regeneracja (% zamknięcia rany, n = 5):			
po 2 godz.	15 \pm 9	18 \pm 12	20 \pm 16
po 4 godz.	34 \pm 11	33 \pm 12	35 \pm 17
po 8 godz.	79 \pm 22	67 \pm 17	76 \pm 21
po 12 godz.	97 \pm 5	92 \pm 11	92 \pm 8

Układ renina–angiotensyna (RAS) pełni bardzo ważną rolę w regulacji homeostazy ściany naczynia. Proangiotensyna-12 (proAng-12) jest nowo odkrytym metabolitem angiotensynogenu, który może służyć jako alternatywny substrat do lokalnej produkcji angiotensyn i tym samym przełamywać tradycyjną, zależną od reniny konwersję angiotensynogenu do angiotensyny I. W niniejszej pracy przy zastosowaniu metody LC-MS zidentyfikowano proAng-12 jako główny produkt metabolizmu angiotensynogenu *ex vivo* w aortalnej ściance szczura. Wobec tego wydaje się, że proAng-12 jest nie tylko przeważającym metabolitem angiotensynogenu, ale także może służyć jako substrat do powstawania Ang I i Ang II. Funkcjonalne znaczenie uzyskanych wyników wymaga dalszych badań.

1749

Mechanizmy przeciwmiażdżycowego działania agmatyny — badania na modelu eksperymentalnym miażdżycy: myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (*apoE-knockout mice*)

Anna Niepsuj, Rafał Olszanecki, Ryszard Korbut

Katedra Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Agmatyna — występujący w organizmie produkt dekarboksylacji argininy — wykazuje wiele aktywności biologicznych. Unikatowa konstelacja działania przeciwwzpalnego, hamującego proliferację komórek mięśni gładkich, ochronnego wobec mitochondriów i antyapoptotycznego czyni z agmatyny substancję o potencjalnym działaniu przeciwmiażdżycowym. Celem pracy jest zbadanie wpływu egzogennej agmatyny na rozwój zmian miażdżycowych w mysim modelu tej choroby (myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E — *apoE-knockout mice*) oraz określenie jej najbardziej prawdopodobnego mechanizmu przeciwmiażdżycowego. Do eksperymentów użyto samców myszy apoE KO w wieku 8 tygodni. Badane były następujące grupy zwierząt: grupa kontrolna (karmiona standardową paszą laboratoryjną, n = 8) i grupa badana (agmatyna zmieszana „na zimno” z paszą, podawana w dawce 20 mg/kg mc./dobę przez 4 miesiące, n = 8). Zarówno w ocenie metodą „*en face*”, jak i metodą „*cross section*” agmatyna spowodowała

znamiennie (o 40%) zmniejszenie zmian miażdżycowych w aortalnej ściance myszy apoE KO. Barwienia immunohistochemiczne wykazały, że agmatyna działała stabilizująco na blaszki miażdżycowe — zmniejszała w nich zawartość makrofagów, a także zwiększała liczbę komórek mięśni gładkich. Co ciekawe, agmatyna okazała się silnie zwiększać stężenie lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL), nie wpływając jednocześnie na stężenie lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) i triglicerydów. Obecnie prowadzone oznaczenia i eksperymenty mają na celu wyjaśnienie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za przeciwmiażdżycowe działanie agmatyny. Wydaje się, że za przeciwmiażdżycowe działanie agmatyny w modelu myszy apoE KO odpowiada jej wpływ na wątrobę, w szczególności na wątrobowy, mitochondrialny metabolizm lipidów i tworzenie się HDL. Wpływ agmatyny na ekspresję czynników zaangażowanych w regulację funkcji mitochondriów i metabolizm lipidów badany jest technikami biologii molekularnej i proteomiki. Jest to pierwsze doniesienie, w którym opisano hamujący wpływ agmatyny na rozwój miażdżycy w eksperymentalnym modelu zwierzęcym tej choroby.

1750

Effects of morin-5'-sulfonic acid sodium salt (NaMSA) on cyclophosphamide-induced changes in ADMA plasma levels and DDAH activity in rat liver and kidney

Anna Merwid-Ląd¹, Małgorzata Trocha¹, Ewa Chlebda¹, Tomasz Sozański¹, Jan Magdalan¹, Maria Kopacz², Anna Kuźniar², Małgorzata Pieńiewska¹, Lidia Fereniec-Gołębiewska¹, Adam Szela¹¹Department of Pharmacology, Wrocław Medical University, Wrocław²Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Rzeszów University of Technology, Rzeszów

Background: Elevated level of asymmetric dimethylarginine (ADMA) due to e.g. decreased activity of the main enzyme responsible for ADMA metabolism — dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) is very well known factor increasing cardiovascular risk. Such changes are observed e.g. in case of increased oxidative stress. Cyclophosphamide (CPX) is an anticancer drug with strong immunosuppressive properties and

is also known prooxidative factor. Cardiotoxicity is not the most common adverse effect of CPX, but cardiomyopathy, heart failure or cardiac arrhythmias are also observed during treatment. Flavonoids are constituents of plants and vegetables with strong antioxidant properties and may prevent from some adverse effects induced by anticancer drugs. Naturally-occurring morin is poorly soluble in water, therefore in our previous works its water-soluble derivative — morin-5'-sulfonic acid sodium salt (NaMSA) was tested as antidote in acute and subacute heavy metals intoxications. Till now little is known about the influence of CPX or NaMSA on plasma ADMA level and/or DDAH activity.

Aim: The aim of the present study was to evaluate effects of NaMSA on cyclophosphamide-induced changes in plasma ADMA level and DDAH activity in rat liver and kidney.

Methods: The study was performed on Wistar rats of both sexes (203.9 g \pm 18.6 g) divided into three experimental groups (N = 12): group C — receiving 0.9% saline solution; group CX — receiving CPX (15 mg/kg) and group M-CX — receiving CPX (15 mg/kg) and NaMSA (100 mg/kg). All studied substances were given intragastrically for 10 consecutive days. On the 11th day of the experiment blood sample was collected for ADMA measurements. Part of the liver and one kidney were homogenised and in the obtained supernatants DDAH activity was evaluated. ADMA concentration was measured using HPLC method and expressed as μ M. DDAH activity was measured spectrophotometrically and presented as μ M L-citrulline formation/g protein/min at 37°C.

Results: ADMA level was significantly lower in group CX comparing to the control group (group Cx vs. C, $p < 0.001$). This effect of CPX was not reversed by addition of NaMSA (group M-CX vs. C, $p < 0.001$, and M-CX vs. CX, $p = \text{NS}$, non significant). No significant differences were observed in DDAH activity in liver. However, CPX induced increase in DDAH activity and the difference to control group was on the significance border (group CX vs. C, $p = 0.05$). Addition of NaMSA to CPX tended to reverse those changes. No significant changes between groups were observed in DDAH activity in kidneys ($p = \text{NS}$ in all comparisons).

Conclusions: CPX is considered as strong prooxidative agent; therefore we have expected rather increased plasma ADMA level with decreased DDAH activity. Our results are quite opposite. In the same model of CPX administration we have demonstrated that 10 days treatment with CPX at 15 mg/kg dose caused significant decrease, not increase in malondialdehyde level (indicator of lipid peroxidation), but with the decrease in superoxide dismutase activity and glutathione level (manuscript under review). This requires further detailed studies on the impact of CPX and newer flavonoids derivatives on ADMA level and DDAH activity in the context of cardiovascular risk.

1751

Związek pomiędzy markerem apoptozy (sTRAIL) a ryzykiem sercowo-naczyniowym wyrażonym stężeniem NT-proBNP i wskaźników stanu zapalnego u chorych hemodializowanych

Danuta Fedak¹, Marek Kuźniewski², Paulina Dumnicka³, Maria Kapusta¹, Beata Kuśnierz-Cabala¹, Bogdan Solnica¹, Władysław Sułowicz²

¹Zakład Diagnostyki Katedry Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

²Katedra i Klinika Nefrologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

³Zakład Diagnostyki Medycznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wstęp: Przewlekła choroba nerek (PChN) charakteryzuje się przyspieszonym rozwojem miażdżycy i przewlekłym stanem zapalnym. Stężenie NT-proBNP u chorych z PChN poddawanych przewlekłej dializoterapii jest znamienne podwyższone w porównaniu z pacjentami niedializowanymi oraz populacją z prawidłową funkcją nerek i koreluje z dysfunkcją rozkurczową i przerostem lewej komory serca, przewlekłym uszkodzeniem mięśnia sercowego, wzrostem ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych, a także jest wskaźnikiem występowania oraz oceny ciężkości przebiegu choroby niedokrwiennej serca zwiększającej ryzyko śmiertelności pacjentów. Zarówno hsCRP, jak i IL-6 są uznanymi czynnikami ryzyka śmiertelności sercowo-naczyniowej chorych z PChN. Dodatkowo wykazano, że IL-8 jest również patogennym mediatorem w procesie miażdżycowym i bywa uznawana za najsilniejszy czynnik predykcyjny śmiertelności ogólnej i sercowo-naczyniowej, po uwzględnieniu wieku i czasu dializowania u chorych w schyłkowym stadium PChN. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) jest cytokiną należącą do rodziny TNF, produkowaną w licznych komórkach i tkankach, która może być odpowiedzialna za indukcję lub hamowanie apoptozy. Dostępne dane wskazują na rolę TRAIL w modulacji stanu zapalnego oraz rozwoju miażdżycy.

Cel: Celem przeprowadzonych badań była ocena zależności pomiędzy rozpuszczalnym TRAIL (sTRAIL) a NT-proBNP i wybranymi wskaźnikami stanu zapalnego u chorych z PChN leczonych powtarzanymi hemodializami.

Metody: Badaniami objęto 76 chorych (36 kobiet i 40 mężczyzn) w wieku 60 ± 12 lat leczonych hemodializami przez okres $74,8 \pm 58,0$ miesięcy. sTRAIL, IL-6 i IL-8 oznaczano metodą ELISA, hsCRP za pomocą metody immunonefelometrycznej, a NT-proBNP metodą elektrochemiluminescencyjną.

Wyniki: Przeanalizowano związki pomiędzy badanymi parametrami i wykazano istnienie ujemnej zależności pomiędzy stężeniem sTRAIL a stężeniem NT-pro-BNP ($r = -0,246$; $p = 0,0378$), IL-6 ($r = -0,275$; $p = 0,0483$), IL-8 ($r = -0,305$; $p = 0,0152$). Nie stwierdzono zależności z hsCRP, natomiast

wykazano dodatnią zależność z albuminą ($r = 0,451$; $p = 0,0000$).

Wnioski: 1. Pomimo braku istotnych zależności pomiędzy sTRAIL a hsCRP stwierdzona ujemna korelacja pomiędzy sTRAIL a IL-6 i IL-8 pozwala przypuszczać, że sTRAIL może być ujemnym wskaźnikiem stanu zapalnego. 2. Stwierdzona korelacja pomiędzy NT-proBNP a sTRAIL może być potwierdzeniem złożonego związku pomiędzy stanem przewodnienia, ryzykiem sercowo-naczyniowym a mechanizmami regulującymi procesy apoptozy. 3. Dodatnia korelacja pomiędzy stężeniami sTRAIL a albuminą będącą ujemnym białkiem ostrej fazy może wskazywać na protekcyjną rolę sTRAIL w ograniczeniu zapalenia u chorych hemodializowanych i hamowaniu postępu miażdżycy, a w konsekwencji zmniejszeniu powikłań sercowo-naczyniowych i śmiertelności w tej grupie chorych.

1752

Rola kwasów tłuszczowych w różnicowaniu się komórek SVF

Anna Polus¹, Beata Kieć-Wilk¹, Urszula Czech¹,
Urszula Rażny¹, Tatiana Konovalova², Alexander Sigruener²,
Gerhard Liebisch², Gerd Schmitz², Aldona Dembińska-Kieć¹

¹Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

²Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University of Regensburg, Regensburg

Kwasy tłuszczowe stanowią integralną część lipidów błon komórkowych decydującą o ich płynności, o funkcji białek (receptorów, kanałów jonowych), jak i mobilności organelli komórkowych. Dostarczane z pożywieniem i syntetyzowane endogennie kwasy tłuszczowe (FFA) i ich metabolity są nie tylko substratem energetycznym, ale pełnią rolę regulatorów procesów metabolicznych (indukcja enzymów: katabolizm-termogeneza) i ekspresji genów związanych z różnicowaniem się komórek. Działają tak jako ligandy aktywujące czynniki transkrypcyjne lub bezpośrednio przyłączają się do miejsc regulatorowych w sekwencji promotorów genów (FARE, *fatty acid response element*). FFA mogą również regulować procesy potranskrypcyjne, wpływając na stabilność mRNA białek. Celem badań było wykazanie wpływu kwasów tłuszczowych na różnicowanie i odróżnicowanie komórek progenitorowych izolowanych z podskórnej tkanki tłuszczowej (tzw. SVF, *stromal vascular fraction*). Korelowano zmianę profilu lipidowego komórek (lipidomika) z ekspresją genów (transkryptomika) na różnych etapach różnicowania i odróżnicowania się komórek SVF. Komórki progenitorowe SVF izolowane z podskórnej tkanki tłuszczowej (metoda Haunera) były różnicowane *in vitro* do adipocytów [48 godzin — MDI, deksametazon (0,25 μ M), IBMX (0,5 mM), insulina (66 nM)]. Na ostatnie 24 godziny dodawano wybrane FFA (PA, OA, AA lub EPA w nietoksycznym stężeniu 30 μ M).

W celu pełnego zróżnicowania komórki hodowano przez kolejne 15 dni w medium adipogennym [DMEM, transferyna (10 mg/ml), insulina (66 nM), hydrokortyzon (100 nM), T3 (1 nM)]. Po tym okresie odróżnicowywano komórki przez kolejne 15 dni przez hodowlę w medium (DMEM) z dodatkiem FCS (10%). Oznaczenia profilu lipidowego komórek SVF na poszczególnych etapach różnicowania (48 godzin; 15 i 30 dni) wykonano metodą spektrometrii mas (*liquid chromatography/mass spectrometry* (LC/MS), *gas chromatography/mass spectrometry* (GC/MS), *ion mobility spectrometry* (IMS/MS), w ramach projektu UE Lipidomic-Net). Analizowano średnią procentową zawartość poszczególnych klas lipidów w komórkach oraz zawartość kwasów tłuszczowych o różnej długości węglowych łańcuchów w poszczególnych frakcjach lipidów. Analizowano równocześnie zmiany w ekspresji genów na różnych etapach różnicowania się komórek przy użyciu mikromacierzy oligonukleotydowych (Single Colored Agilent Array 23043). Uzyskane wyniki korelowano programem ExPlain 3,0 (we współpracy z międzynarodową firmą biotechnologiczną BIOBASE). Korelacja zależności pomiędzy ekspresją poszczególnych genów a klasami lipidów oraz z długością łańcuchów węglowych kwasów tłuszczowych budujących te lipidy w analizowanych procesach wykazała, że zawartość kwasu tłuszczowego o 40 węglowym łańcuchu i 4 wiązaniach nienasyconych w fosfatydyloserynie była związana z ekspresją genów związanych ze stresem siateczki endoplazmatycznej, co wydaje się mieć istotny związek z tworzeniem kropli lipidowych.

Praca finansowana ze środków FP7 EU LIPIDOMICNET projekt nr 202272.

1753

Mitochondria-related activity of different free fatty acids in endothelial cells exposed to stress

Joanna Góralska, Anna Polus, Agnieszka Śliwa, Anna Knapp,
Anna Gruca, Urszula Czech, Aldona Dembińska-Kieć

Department of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University Medical College, Cracow

Background: Exposition of endothelium to free fatty acids may exert different effects depending on saturation and length of chain, including induction of apoptosis and lipotoxicity, as well as prosurvival effects against cell death. Omega-3 fatty acids have been found to favorably modulate impaired endothelial function, as determined by *in vitro* assessment of vasodilation mechanisms and vasoconstrictive responses, potentially due to enhanced nitric oxide formation and increased vascular smooth muscle relaxation but the mechanism remains elusive.

Aim: The aim of the study was to investigate the mitochondria-related effect of FFAs in endothelium model cells (HUVEC) exposed to metabolic stressor.

Methods: Endothelial cells (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) were preincubated with FFAs: palmitic acid (PA), oleic acid (OA), arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA) at 30 μ M for 24 h. For the last 4 hours of incubation, HUVEC cells were exposed to TNF-alpha at 5 ng/ml as cellular stressor. Mitochondrial metabolic activity was monitored by measurements of the mitochondrial oxygen consumption rates (ORO-BOROS® Oxygraph-2k) and ATP level. Measurement of mitochondrial membrane potential (MMP) was performed by flow cytometry using JC-1 by and BD Bioimager 855 microscopy.

Results: HUVEC cells were affected by TNF-alpha which decreased the MMP, though the other mitochondrial functions studied were changed not significantly. The mitochondrial respiration, mitochondrial membrane potential and ATP generation was significantly increased by pretreatment of endothelial cells with EPA. This study has demonstrated that EPA may improve mitochondrial function in endothelium and exert protective effect in the stressed cells.

Supported by: CMUJ K/ZBW/000577, Polish-Norwegian grant PNR-104-AI-1/07, Lipidomicnet (Grant 202272).

1754

Asymetria zmienności rytmu serca

Monika Petelczyc, Jan J. Żebrowski

Pracownia Fizyki Układu Krążenia, Wydział Fizyki, Politechnika Warszawska, Warszawa

Nocne zapisy zmienności rytmu serca zostały poddane analizie wymagającej wyznaczenia momentów warunkowych. Są one znane jako współczynniki rozwinięcia Kramersa-Moyala i służą do opisu właściwości badanego procesu w obrazie fizyki procesów stochastycznych (procesów przypadkowych). Na szczególną uwagę zasługują dwa pierwsze momenty (czyli współczynniki dryfu oraz dyfuzji), gdyż mogą być wykorzystane do rekonstrukcji szeregów czasowych. Ich analiza umożliwiła przedstawienie zmienności rytmu serca jako procesu regulowanego przez dwa współdziałające mechanizmy przyspieszania oraz zwalniania rytmu. Właściwości otrzymanych współczynników dyfuzji pozwalają wprowadzić parametry charakteryzujące te mechanizmy. Nowe parametry zaproponowane w pracy są miarą zdolności do przyspieszania (skracania interwału RR) oraz zwalniania (wydłużania interwału RR) w kolejnych cyklach pracy serca. Ich interpretacja wynika z zaproponowanego uproszczonego modelu dynamiki zmienności rytmu serca, a także ze sposobu obliczania momentów warunkowych. Okazuje się, że zwalnianie rytmu jest łatwiejsze fizjologicznie i dominuje nad przyspieszaniem rytmu. Procesy zwalniania oraz przyspieszania rytmu serca nie są równorzędne i w tym sensie można wprowadzić pojęcie asymetrii zmienności rytmu serca. Posługując się modelami fizycznymi, można pokazać związek obserwowanej asymetrii z niemiarkowością od-

dechową rytmu serca, która jest odbiciem stanu aktywności obu gałęzi autonomicznego układu nerwowego. Opisane wyniki będą porównane z innymi metodami oceny asymetrii rytmu serca.

1755

Zmiany aktywności układu autonomicznego serca po stymulacji TENS

Agata Furgała, Joanna Szmigiel, Anna Machowska, Katarzyna Ciesielczyk, Piotr Thor

Katedra Patofizjologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wstęp: Przeszkórna elektryczna stymulacja nerwów (TENS) jest metodą neuromodulacji o wielu zastosowaniach. Mechanizm działania TENS polega na bezpośrednim wpływie na zmiany napięcia układu autonomicznego oraz na pobudzeniu wydzielania neurotransmiterów.

Cel: Celem pracy była ocena zmian aktywności układu autonomicznego w odpowiedzi na stymulację nerwów za pomocą TENS.

Metody: Do badania zakwalifikowano 30 ochotników (wiek $22,5 \pm 2$ lata, 11 mężczyzn, 19 kobiet). Wykluczono osoby z cukrzycą, otyłością, chorobami układu sercowo-naczyniowego, stosujące leki wpływające na aktywność układu autonomicznego. Podczas badania rejestrowano aktywność autonomicznego układu nerwowego poprzez ocenę parametrów: zmienności rytmu serca (HRV) i zmienności ciśnienia tętniczego (BPV), aktywności baroreceptorów (BRS) oraz hemodynamicznych serca za pomocą aparatu Task Force Monitor 3040i (CNSystems, Austria) w warunkach podstawowych (20 min), w trakcie 15-minutowej stymulacji TENS (Sinus 5 stimulator – impuls – 0,1 ms, 10–20 mA) oraz po stymulacji (20 min). Dwukrotnie pobrano krew do oznaczenia stężenia noradrenaliny (przed i po stymulacji).

Wyniki: Po stymulacji TENS zmianie uległy wartości wskaźników hemodynamicznych serca: spadek CI ($3,2 \pm 0,65$ v. $2,97 \pm 0,52$; $p = 0,001$) i LVWI, natomiast wzrost TPR (1212 ± 275 v. 1341 ± 254 ; $p = 0,001$). Częstość rytmu serca nie uległa zmianie. W zakresie widma HRV zanotowano wzrost lnLF ($6,94 \pm 0,81$ v. $7,35 \pm 0,85$; $p = 0,0001$) oraz wzrost współczynnika LF/HF ($1,22 \pm 1,06$ v. $1,59 \pm 1,36$; $p = 0,004$). W zakresie widma BPV stwierdzono spadek wartości lnTP, lnLF i lnHF. Aktywność baroreceptorów BRS zmniejszyła się z $33,78 \pm 13,5$ ms/mm Hg do $31,32 \pm 13,5$ ms/mm Hg; $p = 0,049$. Aktywność osoczowa noradrenaliny wzrosła pod wpływem stymulacji z $342,57 \pm 153,40$ do 418 ± 210 pg/ml; $p = 0,03$.

Wnioski: Zmiany wartości wskaźników hemodynamicznych układu krążenia (TPR), wzrost wartości parametrów HRV (lnLF, LF/HF) oraz zmniejszenie aktywności baroreceptorów i wskaźników zmienności ciśnienia tętniczego, jak również wzrost stężenia noradrenaliny w osoczu jednoznacznie wskazują na pobudzenie komponenty współczulnej układu autonomicznego.

1756

Białko wiążące lipopolisacharyd w chorobie niedokrwiennej serca, związek z dynamiką objawów i rozległością procesu miażdżycowego tętnic wieńcowych

Tomasz Rechciński¹, Agnieszka Matusiak²,
Małgorzata Kurpesa¹, Wiesława Rudnicka²,
Jarosław D. Kasprzak¹, Magdalena Chmiela²

¹II Katedra i Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

²Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Wstęp: Białko wiążące lipopolisacharyd (LBP) to „pierwszoliniowe” białko reagujące z bakteryjnym lipopolisacharydem, umożliwiające dalsze interakcje ze strukturami w docelowych komórkach. Sugeruje się, że jego obecność to wiarygodny marker pobudzenia wrodzonej odporności, jak również marker procesu aterosklerozy.

Cel: Celem tego badania była ocena, czy pacjenci (pts.) z różnym stopniem zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych, a także ci w stabilnej i niestabilnej fazie choroby wieńcowej (CAD) różnią się między sobą i w porównaniu z osobami zdrowymi osoczowymi stężeniami LBP.

Metody: Badaniem objęto 140 pts. z CAD potwierdzoną w koronarografii i 60 zdrowych ochotników. Pacjenci z CAD zostali sklasyfikowani do 3 kategorii: stabilna angina CCS I i II (STAB) — 75 pts., troponino-dodatni ostry zespół wieńcowy (OZW) — 34 pts., choroba trójnaczyńowa z kwalifikacją do planowego zabiegu „by-passów” (CABG) — 31 pts. Pacjenci z grupy STAB to osoby po planowej angioplastyce z powodu stenozy $\geq 70\%$ w jednej lub dwóch tętnicach wieńcowych. Pacjenci w grupie STAB i CABG mieli negatywne wyniki testu na troponinę I. Żaden z uczestników nie miał ostrej infekcji podczas pobierania próbek krwi. Krew na badanie pobierano w ciągu 12 godzin po planowej koronarografii w grupie STAB i CABG lub w ciągu 12 godzin od początku spoczynkowego bólu zamostkowego w grupie OZW. Próbkę przechowywano w temperaturze -70°C do dnia, w którym jednocześnie wykonano oznaczenia ze wszystkich próbek. Do określenia osoczowych stężeń LBP zostały użyte komercyjne zestawy ELISA.

Wyniki: W grupie osób z CAD średnie \pm SD stężenie LBP wynosiło $41,5 \pm 33,9 \mu\text{g/ml}$, a w grupie kontrolnej osób zdrowych $13,8 \pm 13,3$ ($p < 0,0001$). Wśród osób z CAD: należący do grupy STAB mieli średnie \pm SD stężenie LBP: $24,8 \pm 23,3 \mu\text{g/ml}$, do grupy CABG: $47,2 \pm 32,1 \mu\text{g/ml}$, a ci z OZW: $72,4 \pm 32,2 \mu\text{g/ml}$. Różnice stężeń LBP pomiędzy trzema grupami pacjentów z CAD były znamienne: $p < 0,001$. Także różnica średniego stężenia LBP między osobami zdrowymi a grupą STAB była znamienna: $p = 0,0015$.

Wnioski: Powyższe dane potwierdzają, że pacjenci z miażdżycą tętnic wieńcowych charakteryzują się zdolnością do syntezy białka wiążącego lipopolisacharyd w wysokich stężeniach, które są zależne nie tylko od zaostrej fazy choroby, lecz także od liczby naczyń zajętych procesem miażdżycowym.

1757

Oznaczenia parametrów gospodarki lipidowej u pacjentów poddawanych angiografii naczyń wieńcowych

Paweł Burchardt¹, Tomasz Kubacki²,
Jakub Żurawski², Henryk Wysocki¹

¹Katedra i Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

²Katedra Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Wstęp: Wysokie stężenia LDL, cholesterolu całkowitego (TC), triglicerydów (TG) i niskie HDL są uznanymi czynnikami ryzyka choroby niedokrwiennej serca (CNS) w populacji ogólnej. Niemniej, oznaczenie tych parametrów wydaje się niewystarczające w ocenie zaawansowania choroby u osób już stosujących preparat statyny. Projekt zakładał, na podstawie rutynowo stosowanych w praktyce klinicznej oznaczeń parametrów gospodarki lipidowej, próbę wyznaczenia wskaźnika wykazującego związek ze stopniem zaawansowania CNS u pacjentów stosujących terapię hipolipemizującą, kwalifikowanych do badania angiograficznego tętnic wieńcowych.

Metody: Oznaczenia apoproteiny B100, apoproteiny A1, LDL, TC, HDL, TG za pomocą rutynowo stosowanych technik laboratoryjnych wykonano u 140 kolejnych pacjentów zakwalifikowanych do badania koronarograficznego. Miażdżycę naczyń wieńcowych oceniano na podstawie istotności pojedynczego zwężenia oraz ilościowo z wykorzystaniem skali/kalkulatora Gensiniego.

Wyniki i wnioski: Stwierdzono, że stosunek osoczowych stężeń cholesterolu całkowitego do apoproteiny B100 był istotnie statystycznie niższy w grupie osób z hemodynamicznie istotnymi zwężeniami w świetle tętnic wieńcowych przyjmujących leczenie hipolipemizujące (niezależnie od stopnia intensywności terapii) w porównaniu z osobami bez jakichkolwiek zmian w naczyniach wieńcowych stosujących preparat statyny. Mechanizm odpowiedzialny za to zjawisko pozostaje w sferze spekulacji. Z kolei u osób bez angiograficznych zmian w świetle tętnic wieńcowych stosunek stężeń cholesterolu całkowitego do apoproteiny B100 był istotnie statystycznie wyższy w grupie stosującej preparat statyny w porównaniu z osobami bez takiego leczenia. Wyniki analizy wymagają potwierdzenia w większej grupie badanej.

1758

Angiotensin-converting enzyme inhibitors modulate activation of the tissue factor-thrombin pathway within aortic valves in patients with aortic stenosis: links between coagulation, inflammation and neovascularisation

Joanna Natorska¹, Grzegorz Grudzien², Jerzy Sadowski¹, Anetta Undas¹

¹Institute of Cardiology, Jagiellonian University School of Medicine, Cracow

²John Paul II Hospital, Cracow

Background: There is evidence that tissue factor (TF) and prothrombin expression coexists with inflammatory infiltrate and calcification within human aortic stenosis (AS) valves.

Aim: To investigate clinical variables that might affect the magnitude of expression of selected coagulation proteins and inflammatory markers in AS valves.

Methods: 111 consecutive patients with AS (62 M, 49 F, aged 63.3 ± 11.2 years, mean transvalvular gradient, 58.8 ± 23 mm Hg) scheduled for isolated valve replacement were studied. Valvular TF, TF pathway inhibitor (TFPI), prothrombin, C-reactive protein (CRP), and interleukin-6 (IL-6) expression was evaluated by immunostaining, and their transcripts were analysed by real-time quantitative PCR. Plasma TF, TFPI, prothrombin fragment F1+2, CRP and IL-6 were also determined.

Results: TF-, TFPI-, and prothrombin expression within valve leaflets was not related to demographics, body mass index, concomitant diseases, statin administration as well as plasma TF, free-TFPI, IL-6 and F1+2. Unexpectedly, patients treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs, $n = 37$) showed decreased percentage of immunoreactive areas for TF ($13.64 \pm 6.43\%$ vs. $18.05 \pm 6.81\%$, $p = 0.03$), TFPI ($32.6 \pm 7.8\%$ vs. $47.15 \pm 9.5\%$, $p = 0.04$), prothrombin ($23.47 \pm 1.93\%$ vs. $26.61 \pm 1.4\%$, $p = 0.002$), and CRP ($0.75 [0-9]\%$ vs. $1.4 [0-8]\%$, $p = 0.03$) within aortic valve leaflets. The 4 antigens were colocalised. Valvular mRNA expression for prothrombin (0.13 ± 0.07 vs. 0.81 ± 0.37 , $p = 0.001$) and TF (1.22 ± 0.47 vs. 2.27 ± 1.42 , $p = 0.041$) was also lower in patients treated with ACEI. IL-6 expression was unaffected by ACEIs.

Conclusions: Use of ACEIs, but not statins, is associated with reduced expression of TF, and prothrombin along with CRP within aortic valves in AS patients, which might suggest novel potentially beneficial effects of these agents on AS progression.

1759

Identification of SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in human myocardium

Marcin Syzdzół¹, Wojciech Wojakowski¹, Ewa Zuba-Surma², Adam Kowalówka³, Justyna Drukała⁴, Ryszard Bachowski³, Stanisław Woś³, Józef Dulak², Mariusz Ratajczak⁵, Michał Tendera¹

¹3rd Clinic of Cardiology, Silesian Medical University, Katowice

²Department of Medical Biotechnology, Jagiellonian University, Cracow

³2nd Department of Cardiac Surgery, Silesian Medical University, Katowice

⁴Department of Cell Biology, Jagiellonian University, Cracow

⁵Stem Cell Institute, Louisville, USA

Background: Very small embryonic-like cells (VSELs) is rare population of cells expressing pluripotent stem markers (Oct-4, Nanog, SSEA-4). The adult bone marrow-derived VSELs may be expanded and differentiated into all three germ layers. VSELs were identified in murine bone marrow and solid organs, umbilical cord blood and peripheral blood in humans.

Aim: Was to assess the endogenous presence of VSELs in human hearts and their mobilisation induced by cardiac surgery.

Methods: Patients with CAD undergoing CABG were enrolled. Fragments of right atrial appendage (RAA), internal mammary artery and BM samples were harvested. Blood samples (VSELs, EPCs, SDF-1, HGF, SCF, VEGF) were taken before, after weaning from cardiopulmonary bypass, after 24 h and 5–7 days. Fragments of RAA were cut ($0.5-1.0 \text{ cm}^3$), and enzymatically digested in collagenase I (2 mg/ml) for 30–45 min in 37°C . Cell suspension was stained with antibodies against stem cell markers, CD34 (FITC), CD133 (APC), SSEA-4 (PE), and CD45 (APC-Cy7) for 30 min. Cell were washed, fixed in 2% paraformaldehyde and resuspended in PBS. Nuclei were stained with 10 mM of Hoechst 33342 10 min before the analysis. Analyses were carried out on ImageStream X cytometer which is a platform combining classical flow cytometer and fluorescence microscope and collects real images of identified cells.

Results: Cardiac tissue contains very small ($4.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$) roundish (aspectratio 1:1) nucleated VSEL cells expressing embryonic antigens. ImageStreamsystem showed the presence of early developmental marker SSEA-4 on the surface of these cells. The cells express CD34 and CD133 stem cellmarkers and lack CD45 indicating their non-hematopoietic origin.

Conclusions: We demonstrated for the first time the presence of VSEL cells expressing embryonic marker SSEA-4 in adult human myocardium.

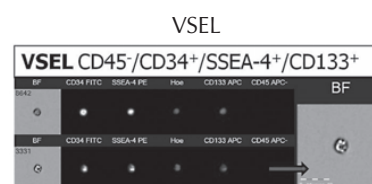


Figure. [1759]

Tabela. [1760]

Parametr	Pacjenci: heterozygoty	Pacjenci: zmutowane homozygoty	Pacjenci: oba warianty łącznie	Ochotnicy	Istotność: p hetero- v. homozygoty
SDDN	125 ± 30	115 ± 24	121 ± 28	142 ± 41	0,16
rMSSD	26 ± 12	26 ± 10	26 ± 11	27 ± 8	0,66
LF	1079 ± 1716	651 ± 725	865 ± 1389	510 ± 388	0,18
HF	248 ± 263	407 ± 512	326 ± 407	632 ± 631	0,17
LF/HF	5,18 ± 4,65	2,58 ± 2,22	4,9 ± 4,22	2,5 ± 3,5	0,01

1760

Ocena aktywności układu autonomicznego na podstawie monitorowania EKG metodą Holtera a haplotypy genu interleukiny-1beta u pacjentów z chorobą wieńcową

Tomasz Rechciński¹, Agnieszka Matusiak², Barbara Uznańska¹, Urszula Cieślak-Guerra¹, Ewa Trzos¹, Dominik Strapagiel³, Małgorzata Kurpesa¹, Jarosław D. Kasprzak¹, Magdalena Chmiela²

¹II Katedra i Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

²Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

³Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Wstęp: Celem pracy było porównanie wpływu układu parasympatycznego na rytm serca na podstawie 24-godzinnych holterowskich zapisów EKG w zależności od wariantu genetycznego związanego z intensywnością biosyntezy prozapalnej interleukiny-1beta (IL-1b). Zbadano polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w locus -511 i -31 regionu promotorowego genu IL-1b. Za wariant związany z tendencją do silnej produkcji IL-1b przez monocyty i makrofagi uznano zmutowane homozygoty, tj. TT w locus -31 i CC w -511, a za wariant ze słabą odpowiedzią — heterozygoty w obu loci.

Metody: Badaniem objęto 80 pacjentów po OZW z potwierdzoną angiograficznie miażdżycą tętnic wieńcowych (20% kobiet, 25% z cukrzycą typu 2 i 65% z nadciśnieniem tętniczym) oraz 20 ochotników bez choroby wieńcowej. Do rejestracji i analizy zmiennych analizy czasowej i częstotliwościowej HRV (SDNN, rMSSD, LF, HF, LF/HF) użyto aparatu i oprogramowania firmy Delmar Reynolds. Genotypowanie przeprowadzono metodą real-time PCR, używając technologii TaqMan SNP Genotyping Assays.

Wyniki: Haplotyp -31TT i -511CC zidentyfikowano u 27 pacjentów, a -31CT, -511CT u 20 osób. Wartości uzyskane z analizy zapisów holterowskich w całej badanej grupie oraz po uwzględnieniu haplotypów przedstawiono w tabeli.

Wnioski: Przedstawione wyniki wskazują na możliwość adaptacji aktywności układu parasympatycznego do uwarunkowanych genetycznie cech wpływających na intensywność subklinicznego stanu zapalnego.

1761

Mobilisation of Oct4+ very small embryonic-like cells induced by physical exercise in patients with coronary artery disease

Ecyta Nabiałek¹, Wojciech Wojakowski¹, Bogusław Machaliński², Maciej Kotowski², Ewa Zuba-Surma³, Maciej Kaźmierski¹, Magda Kucia⁴, Sebastian Dworowy¹, Mariusz Ratajczak⁴, Michał Tendera¹

¹3rd Clinic of Cardiology, Silesian Medical University, Katowice

²Department of General Pathology, Pomeranian Medical University, Szczecin

³Department of Medical Biotechnology, Jagiellonian University, Cracow

⁴Stem Cell Institute, Louisville, USA

Background: Very small embryonic-like cells (VSELs) is rare population of cells expressing pluripotent stem markers (Oct-4, Nanog, SSEA-4). The adult bone marrow-derived VSELs may be expanded and differentiated into all three germ layers. VSELs were identified in murine bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood in humans. They may be mobilised in acute coronary syndromes and stroke and participate in tissue repair.

Aim: To assess the mobilisation of VSELs in healthy subjects and patients with CAD following physical exercise during treadmill stress test.

Methods: 60 patients with previous acute myocardial infarction treated with PCI and 30 healthy subjects were enrolled. Blood (10 mL) samples were taken before, 15 and 60 minutes after the treadmill exercise test. VSELs (CD34+lin-CD133+CD45-) were sorted using multiparameter cell sorting system (FACS Aria) and used for real-time RT-PCR, Image Stream and immunochemistry. Plasma levels of von Willebrand factor, IL-18, SDF-1, HGF, VEGF, SCF were measured.

Results: In healthy subjects and CAD patients number of circulating VSELs is low (1.4 ± 0.3 cells/ μ L). After treadmill exercise test VSELs were mobilised into peripheral blood after 60 min (3.2 ± 0.8 ; $p < 0.03$ vs. baseline). VSELs are small (7–8 μ m), enriched in mRNA of PSC (Oct-4, Nanog), cardiac (GATA-4, Nkx2.5/Csx, MEF2C) and endothelial markers (VE-cadherin), coexpressed Oct-4, Nanog and CXCR4. Mobilisation was positively correlated with SCF levels ($R = 0.36$; $p = 0.04$) and nega-



Figure. [1761]

tively with extent of CAD in angiography (1- vs. 2- and 3-vessel disease).

Conclusions: Short period of physical exercise induces mobilisation of VSELs expressing early developmental markers. Mobilisation is reduced in patients with diffuse coronary atherosclerosis.

1762

Nieinwazyjna ocena hemodynamiki osób z zespołem Williamsa

Tomasz Wierzba¹, Piotr Gutknecht², Andrzej Molisz²,
Bartosz Trzeciak², Krzysztof Malinowski¹

¹Katedra i Zakład Fizjologii, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

²Katedra Medycyny Rodzinnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

Wprowadzenie nowych metod nieinwazyjnych diagnostyki układu sercowo-naczyniowego rozszerzyło zakres etycznie akceptowalnych badań diagnostycznych, z udziałem osób, u których nie występują bezpośrednie wskazania do diagnostyki inwazyjnej. Dotychczas nie przeprowadzono analizy czynnościowej układu krążenia w reprezentatywnej grupie osób z zespołem Williamsa, w którym opisano liczne warianty uszkodzenia genów, wiążących się z zaburzeniem struktury ścian naczyń krwionośnych i elementów podporowych serca. Zespół Williamsa jest rzadkim, genetycznie uwarunkowanym zespołem wad wrodzonych występującym z częstotliwością 1:10 000 urodzeń, z charakterystyczną dysmorfia twarzy, częstym współistnieniem wad serca i naczyń i niepełnosprawnością intelektualną. Zmniejszona wytrzymałość na rozciąganie i na czynniki metaboliczne o właściwościach utleniających, związana z niedoborem lub nieprawidłową budową elastyny, mogą prowadzić do przyspieszonej destrukcji ścian naczyń, czego efektem jest przedwczesne starzenie i zwiększone ryzyko nagłego zgonu. Celem badań była ocena czynnościowa układu krążenia u osób z zespołem Williamsa, w tym wyznaczników: objętości wyrzutowej, kurczliwości serca, dystrybucji osocza i płynu tkankowego w klatce piersiowej, rozprzestrzeniania fali tętna, obciążenia ciśnieniowego ścian tętnic i serca, odruchowego sterowania rytmem serca przy użyciu nieinwazyjnych metod diagnostycznych: elektrokardiografii o wysokiej rozdzielczości, kardiografii impedancyjnej i tonometrii aplanacyjnej. Badaną grupę stanowiło 15 osób z zespołem Williamsa w wieku 10–22 lata oraz 15 zdrowych osób w równoważnym wieku stanowiących grupę kontrolną. W grupie osób z zespołem Williamsa odnotowano: zwiększony opór naczyń obwodowych, ze zwiększoną dynamiką fali tętna i współczynnikiem odbicia, obniżonymi wskaźnikami kurczliwości lewej komory serca i większą zawartością płynu w klatce piersiowej. Ponadto zarejestrowano większą spoczynkową czę-

stość akcji serca, związaną ze zwiększonym udziałem komponenty współczulnej autonomicznej regulacji rytmu serca, na co wskazuje podwyższona wartość współczynnika LF/HF zmienności rytmu serca (HRV). Profil hemodynamiczny osób z zespołem Williamsa odpowiada charakterystyce krążeniowej osób zdrowych o 20–30 lat starszych, co potwierdza koncepcję przedwczesnego starzenia się. Dotychczasowe wstępne badania wskazują natomiast na prawidłową odpowiedź sercową i ciśnieniową podczas próby wysiłkowej o umiarkowanej intensywności, co nie potwierdza potencjalnych przeciwwskazań do rutynowej aktywności fizycznej tych osób.

1763

Mast cells in stenotic aortic valves: associations with inflammation and the severity of stenosis

Ewa Wypasek¹, Joanna Natarska¹, Grzegorz Grudzień²,
Jerzy Sadowski¹, Anetta Undas¹

¹Institute of Cardiology, Jagiellonian University School of Medicine, Cracow

²John Paul II Hospital, Cracow

Aortic stenosis (AS) is characterised by fibrosis and infiltration of inflammatory cells notably macrophages, T lymphocytes, and mast cells (MCs). The presence of activated MCs and their mediators in the fibrotic lesions of the aortic valves suggest that they may participate in the induction of fibrosis and calcification with ensuing valve stiffening (Helske 2006, 2004). The aim of the current study was to investigate the presence of MCs expressed in aortic valves obtained from AS patients vs. patients with aortic insufficiency (AI) and their correlations with echocardiographic parameters and inflammatory and fibrinolytic protein expression within aortic valves. We studied 40 patients (16 men, 24 women) with dominant AS (age 62.2 ± 11.12 years, mean gradient 59.55 ± 19.16 mm Hg), and 20 well matched patients with dominant aortic insufficiency (AI) undergoing elective aortic valve replacement. Immunohistochemistry was performed on decalcified leaflets using appropriate primary antibodies and followed by avidin-biotin complex immunoperoxidase system. AS valves were characterised by an increased (all, $p < 0.001$) percentage of MC positive ($7.5 \pm 2.95\%$) and macrophages containing ($27.6 \pm 7.1\%$) areas detected mainly on the aortic side of the leaflets, compared with AI valves ($1 \pm 3.91\%$ and $7.4 \pm 2.3\%$, $p < 0.001$, respectively). Macrophages and MCs colocalised in the valvular tissue. Percentage of MC positive areas positively correlated with aortic jet velocity (V_{max} , $r = 0.68$, $p = 0.0005$), maximal ($r = 0.73$, $p < 0.0001$) and mean ($r = 0.78$, $p < 0.0001$) gradients and calcification degree ($r = 0.44$, $p = 0.004$). The inverse correlation with aortic valve area (AVA, $r = -0.71$, $p = 0.00004$) was observed. Moreover, expression of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and C-reactive protein (CRP) were positively

correlated with percentage of MC-positive cells ($r = 0.54$, $p = 0.0003$ and $r = 0.58$, $p = 0.0001$, respectively). We conclude that MCs may enhance inflammation and impair fibrinolysis within stenotic aortic valves thus contributing to AS progression. One might speculate that high shear stress in advancing AS may activate MC and increase their infiltration within aortic valves. Like in atherosclerosis, in AS MCs are implicated in the development of the disease.

1764

Potential role of osteoprotegerin in stem cells homing behavior after hypoxia

Ewa Stępień¹, Elżbieta Stankiewicz², Małgorzata Sekuła³, Mieczysław Pasowicz⁴, Grzegorz Grudzień⁵, Krzysztof Żmudka⁶, Jerzy Sadowski⁵

¹Chair of Clinical Biochemistry, Jagiellonian University, Medical College, Krakow

²Cardiac Homograft Cryobank of The Children's Memorial Hospital, Warsaw

³Department of Transplantology, Jagiellonian University, Medical College, Krakow

⁴John Paul II Hospital, Krakow

⁵Department of Cardiac and Vascular Surgery and Transplantology, Jagiellonian University, Medical College, Krakow

⁶Institute of Cardiology, Jagiellonian University, Medical College, Krakow

Background: Hypoxia induces stem cells migration through different mechanisms. We tested the hypothesis that osteoprotegerin may contribute to hypoxia-associated migration of non-differentiated stem cells.

Methods: Osteoprotegerin, SDF-1 and the phenotype and the number of circulating stem cells were determined in 14 STEMI patients admitted within 12 hours after the pain chest onset and 14 healthy control subjects matched by sex and age. In the *in vitro* model, the osteoprotegerin release and chemotaxis of hypoxic endothelial cells were investigated.

Results: Plasma osteoprotegerin and SDF-1 levels were significantly elevated in STEMI patients compared to control: 3.79 (2.54–5.83) vs. 3.0 (1.3–6.5) pM, $p < 0.005$ and 3446 (2478–4459) vs. 2256 (1871–2881) pg/mL, $p < 0.001$, respectively. A trend toward decrease in cell number of different populations of lymphocytes was observed 72 hours after percutaneous cardiac intervention. The significantly lower number of CD34+CD133+CXCR4+ and CD34+CD117+ circulating cells after angioplasty was detected ($p < 0.005$). Hypoxia stimulated endothelial cells to secretion of osteoprotegerin as demonstrated in the *in vitro* study. The percentage of migrated non-differentiated stem cells in response to the hypoxia preconditioned endothelial cell medium was significantly higher than in harvested during normoxia medium (58% [53–62] vs. 68% [63–71], $p < 0.005$).

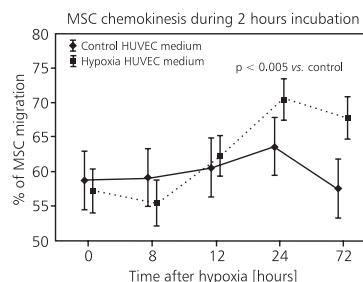


Figure. Chemokinesis of mesenchymal stem cells induced by hypoxia preconditioned HUVEC medium [1764]

Conclusions: Above findings indicate that osteoprotegerin may contribute to migration and homing of the non-differentiated cells after myocardial infarction by the hypoxia-induced endothelial guidance.

1765

Wpływ kardiowersji elektrycznej na agregację płytek krwi

Marcin Makowski¹, Ireneusz Smora², Andrzej Bissinger¹, Tomasz Grycewicz¹, Konrad Masiarek¹, Karolina Szymańska¹, Andrzej Lubiński¹, Zbigniew Baj²

¹Klinika Kardiologii Interwencyjnej i Kardiodiabetologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

²Zakład Patofizjologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź

Wstęp: Migotanie przedsionków jest jedną z głównych przyczyn kardiogenego 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 są w pełni wyjaśnione.

Cel: Celem badania jest ocena wpływu kardiowersji elektrycznej migotania przedsionków na aktywację płytek krwi wyrażoną liczbą agregatów płytkowych, płytkowo-leukocytarnych oraz mikroplatek.

Metody: Do badania włączono grupę 30 mężczyzn z samoistnym migotaniem przedsionków kierowanych do planowej kardiowersji elektrycznej. Sposób przeprowadzenia kardiowersji elektrycznej (EC, *electric cardioversion*) był zgodny z obowiązującymi standardami Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. Pacjenci z przetrwałym migotaniem przedsionków zgodnie z zaleceniami PTK otrzymywali leki przeciwkrzepliwe (Acenocumarol pod kontrolą INR 2,0–3,0) na 4 tygodnie przed kardiowersją. Każdy pacjent kierowany do kardiowersji elektrycznej wyraził świadomą zgodę na sposób przerwania arytmii — kardiowersję oraz na włączenie do badania. Kardiowersję wykonywano energią dwufazową 50–200 J (defibrylator Zoll–Zoll Corp. USA). Krew obwodową w celu oceny płytek krwi oraz stężenia fibrynogenu (Fbg) pobierano w dwóch punktach

czasowych: T0 — w trakcie trwania migotania przedsionków, T1 — 30 minut po wykonaniu kardiowersji elektrycznej. Ocena aktywacji płytek krwi, tworzenia agregatów płytkowych i płytkowo-leukocytarnych, średniej objętości płytek (MPV) oraz liczby mikroplatek została przeprowadzona z użyciem cytometru przepływowego Becton Dickinson. Stężenie fibrynogenu oznaczono metodą Claussa (Multifibren U; Dade Behring Diagnostics; Behring Fibrintimer).

Wyniki: Odsetek agregatów płytkowych i mikroplatek istotnie statystycznie zwiększyły się po wykonaniu kardiowersji elektrycznej (T0 v. T1 $4,9 \pm 1,6\%$ v. $6,7 \pm 1,6\%$; $p < 0,01$, mikroplatek — $1,68 \pm 0,98$ v. $2,25 \pm 1,45$; $p < 0,005$). MPV uległa znaczącemu obniżeniu w T1 (T0 v. T1 $9,3 \pm 0,4$ fl v. $8,8 \pm 0,5$ fl; $p < 0,01$). Liczba agregatów płytkowo-leukocytarnych i ekspresja składowej receptora dla fibrynogenu CD41 (MFI) nie uległy istotnym zmianom. Stwierdzono istotne zmniejszenie stężenia Fbg po wykonaniu EC (T0 v. T1: $350,3 \pm 33,1$ mg/dl v. $297,7 \pm 45,1$ mg/dl; $p < 0,0005$).

Wnioski: Zwiększona ilość agregatów płytkowych, mikroplatek oraz obserwowane zmiany w objętości płytek krwi wskazują na bezpośredni aktywujący wpływ impulsu elektrycznego stosowanego w kardiowersji na układ płytek. Zmiany stężenia Fbg po kardiowersji elektrycznej oraz wzrost liczby agregatów płytkowych mogą odgrywać rolę w patogenezie powikłań zakrzepowo-zatorowych w następstwie kardiowersji elektrycznej migotania przedsionków.

1766

Influence of ezetimibe on antioxidant parameters in rat liver subjected to ischaemia/reperfusion

Małgorzata Trocha, Anna Merwid-Łąd, Ewa Chlebda, Tomasz Sozański, Małgorzata Pieśniewska, Lidia Fereniec-Gołębiewska, Adam Szelaż

Department of Pharmacology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

Elevation of cholesterol and lipoproteins are well-known risk factors of atherosclerosis. Ezetimibe is a new class of selective inhibitors of cholesterol intestinal absorption, but its pleiotropic effects are not well known till known. Antioxidant action of this drug might play a great role in organ undergoing ischaemia/reperfusion e.g. liver. In such conditions overproduction of reactive oxygen species is observed what results in liver cells damages. Aim of the study was to evaluate influence of ezetimibe on the oxido-redox status in rat liver subjected to ischaemia/reperfusion (I/R). The study was carried out on Wistar male rats. Four experimental groups of rats ($n = 8-9$), were housed in standard laboratory conditions. Rats in groups C0 and C-I/R did not receive ezetimibe, groups E0 and E-I/R were treated with ezetimibe intragastrically at the daily dose of 5 mg/kg b.w.,

Table 1. Antioxidant parameters in rat liver [1766]

	SOD [U/mg of protein]; mean \pm SD	GSH [micromol/L]; mean \pm SD
C0	1021.55 \pm 117.6	90.69 \pm 8.87
C-I/R	989.83 \pm 90.51	90.51 \pm 4.21
		($p < 0.05$, C-I/R vs. E-I/R)
E0	971.338 \pm 75.56	96.56 \pm 6.65
E-I/R	962.38 \pm 69.32	99.91 \pm 9.01

once a day for 21 days. Rats were anaesthetised with intramuscular injection of ketamine (7 mg/kg) and medetomidine (0.1 mg/kg). After a suitable level of anaesthesia was achieved, the rats underwent midline laparotomy. In groups: C-I/R and E-I/R rats were subjected to ischaemia/reperfusion. A 70% liver ischaemia (left lateral and median lobes) was achieved by occluding the branches of the portal vein and hepatic artery using a microvascular clip. Rats were given heparin (200 U/kg) to prevent blood coagulation. After 60 min of ischaemia, the clip was removed to allow reperfusion for 4 h. The abdomen was subsequently closed and the rats were observed during reperfusion. Thereafter, the experiment was terminated and the livers were isolated, weighted and homogenised on ice using lysis buffer (140 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 1% NP40, 20 mM Tris base, pH 7.5). The homogenised tissues were thereafter centrifuged at 14,000 rpm for 25 min at 4°C and supernatants were collected. In liver homogenates superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were estimated using the colorimetric methods. SOD activity was expressed as U/mg of protein. Ezetimibe did not alter significantly SOD activity. Significant difference was also found between groups subjected to I/R. In ezetimibe-treated group GSH level was significantly higher than in non-treated group (C-I/R vs. E-I/R, $p < 0.05$). In our work antioxidant effect of ezetimibe in rat liver subjected to IR was revealed. These results may indicate that ezetimibe administered chronically could have a protective action in patients undergoing such procedures as liver transplantation (tab.).

1767

Zaburzenia czynności kinaz Src jako substrat czynnościowy predysponujący do migotania przedsionków

Tomasz Bonda¹, Magdalena Dziemidowicz¹, Tomasz Hirnle², Iwona Dmitruk², Karol Kamiński³, Maria M. Winnicka¹

¹Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

²Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

³Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

Wstęp: Migotanie przedsionków (MP) jest związane z zaburzeniami funkcjonowania kanałów jonowych, w tym przede

wszystkim z zaburzeniem funkcji wolnego kanału wapniowego. Wykazano, że kinaza tyrozynowa Src wywiera efekt hamujący na kanał wapniowy, stąd hipoteza, iż białko to może brać udział w patogenezie migotania przedsionków.

Cel: Celem niniejszej pracy była ocena ekspresji i aktywności kinazy Src w tkance prawego przedsionka u chorych poddawanych operacjom kardiologicznym i jej powiązanie z wystąpieniem pooperacyjnego migotania przedsionków.

Metody: Fragment uszka prawego przedsionka pobrano od 42 pacjentów bez wcześniejszego wywiadu MP poddawanych operacjom kardiologicznym, których następnie obserwowano pod kątem wystąpienia epizodu pooperacyjnego MP w okresie pobytu w szpitalu. Ekspresję całkowitą oraz stopień fosforylacji białka Src, a także ekspresję białek regulujących aktywność Src wykonano metodą western blot.

Wyniki: Pooperacyjne MP wystąpiło u 14 chorych, różniących się od pozostałych pod względem podstawowych wskaźników demograficznych i echokardiograficznych. Ekspresja i fosforylacja Src w grupie pooperacyjnego MP była istotnie wyższa niż u osób bez arytmii. Nadekspresja Src w grupie MP wykazywała istotną dodatnią korelację z podwyższonym poziomem receptorów dla PDGF oraz czynnika STAT3.

Wnioski: Nadmierna aktywność kinazy Src może być substratem czynnościowym predysponującym do wystąpienia pooperacyjnego migotania przedsionków, a jej dodatnie korelacje z ekspresją PDGFR oraz STAT3 sugerują zaangażowanie w patogenezę tej arytmii lokalnych mechanizmów zapalnych.

1768

Rola interleukiny-6 w zależnej od stymulacji beta-adrenergicznej aktywacji szlaku MEK/ERK w sercu myszy

Magdalena Dziemidowicz¹, Karol Kamiński²,
Tomasz Bonda¹, Andrzej Taranta¹, Włodzimierz Musiał²,
Maria Małgorzata Winnicka¹

¹Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

²Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

Przewlekła aktywacja układu współczulnego (w przebiegu takich chorób, jak nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa, niedokrwienie mięśnia sercowego) może doprowadzić do niekorzystnych zmian w mięśniu sercowym. Wynikają one między innymi z aktywacji procesu zapalnego oraz indukcji apoptozy, aczkolwiek dokładny patomechanizm tych procesów nie został jeszcze poznany. Dotychczasowe doniesienia sugerują, że interleukina-6 może być zaangażowana w efekty stymulacji beta-adrenergicznej. Celem pracy była ocena wpływu IL-6 na aktywację szlaków przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowego po długotrwałym podawaniu izoproterenolu. Badania prowadzono na 12-tygodniowych 28 samcach myszy (w tym połowa zwierząt transgenicznych, niewytwarzających IL-6); 16 zwie-

rząt otrzymywało izoproterenol w dawce 50 mg/kg/d. *i.p.* przez 15 dni; pozostałe 12 myszy otrzymywało placebo. Dwadzieścia cztery godziny po ostatniej iniekcji zwierzęta uśmiercono oraz pobrano mięsień lewej komory serca do dalszych badań. Wykonano ocenę ekspresji szeregu genów biorących udział w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnałów na poziomie transkrypcji (ilość mRNA metodą RT-PCR), a następnie ocenę ilości oraz aktywności wybranych białek metodą Western Blotting. U zwierząt pozbawionych IL-6 otrzymujących izoproterenol stwierdzono wyższą fosforylację białek ERK1 i ERK2 (należących do szlaku MEK/ERK), co było komplementarne z nadekspresją mRNA czynników zależnych od szlaku MEK/ERK (*myc* (2,3x), *CEBPB* (1,95x), *BMP4* (3,6x), *Fasn* (3,2x), *Tert* (2x), *Tank* (2,1x). Ponadto u zwierząt transgenicznych zaobserwowano zwiększoną ekspresję mRNA dla czynników prozapalnych należących do kaskad Jak-Stat, NFAT, PKC, NFkB oraz szlaku inicjowanego przez insulinę. IL-6 wydaje się pełnić istotną rolę w hamowaniu nadmiernej aktywacji szlaku MEK/ERK w sercu w odpowiedzi na stymulację beta-adrenergiczną.

1769

Które spośród parametrów osoczowych najlepiej odzwierciedlają poziom żelaza w sercu oraz białek odpowiedzialnych za jego metabolizm?

Przemysław Leszek¹, Barbara Sochanowicz²,
Małgorzata Szperl¹, Piotr Kolsut¹, Kamil Brzoska²,
Walerian Piotrowski¹, Tomasz Rywik¹, Bożena Danko²,
Jacek Różański¹, Marcin Kruszewski²

¹Instytut Kardiologii, Warszawa

²Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa

Wstęp: Na podstawie badań klinicznych wiadomo, że *i.v.* korekta niedoboru żelaza (Fe) prowadzona w terapii niewydolności serca (NS) przynosi obiecujące krótkotrwałe wyniki, podczas gdy jej długotrwały efekt jest nieznan. Rozpoznanie niedoboru oraz dalsza kwalifikacja do suplementacji Fe prowadzone są na podstawie oceny osoczowych markerów gospodarki Fe: poziom ferrytyny (FR), transferyna/wysycenie (TR/TSAT). Brakuje prac oceniających w niewydolnym miokardium zawartość Fe (Fe-M), ferrytyny (FR-M) i receptora transferyny (sTfR-M) oraz związku z uznanymi osoczowymi markerami gospodarki Fe. FR to główne białko wiążące, sTfR zaś reguluje akwizycję Fe do komórki.

Cel: Celem pracy było ocena związku pomiędzy Fe-M, FR-M, sTfR-M a osoczowymi markerami Fe w populacji chorych z zaawansowaną NS.

Metody: Grupa badana to 33 pacjentów poddanych transplantacji serca (średni wiek 48 lat), w której oceniono parametry: Fe, FR, TR/TSAT, sTfR sTfR/logFR TIBC, UIBC, EPO w osoczu. W NS oceniono: Fe-M (Neutron Activation Analysis — $\mu\text{g/g}$), FR-M, sTfR-M (ELISA — ng/mg białka), porównując do zdrowych serc.

Wyniki: Grupa NS prezentowała: powiększenie lewej komory (LK) (EDD/ESD $69 \pm 10/60 \pm 13$ mm; EF $22 \pm 11\%$), prawej komory (PK) ($31,5 \pm 10$ mm); NTproBNP (5464 ± 4825 pg/ml); hsCRP ($0,71 \pm 0,99$ mg/dl), TNF α ($15,5 \pm 9,7$ pg/ml). Analiza regresji wielu zmiennych/korelacja Pearsona pomiędzy oznaczonymi markerami osoczymymi niezależne czynniki dla LK: Fe-M-sTfR/logFR ($R^2 = 0,18$; $p = 0,04$; $r = -0,49$, $p = 0,04$, odpowiednio), sTfR-M-sTfR/logFR ($R^2 = 0,52$; $p < 0,0001$; $r = -0,77$; $p < 0,0001$), FR-M-FR ($R^2 = 0,17$; $p = 0,03$; $r = 0,42$; $p = 0,03$); PK: Fe-M-sTfR ($R^2 = 0,29$; $p = 0,03$; $r = -0,44$; $p = 0,03$, odpowiednio), sTfR-M-sTfR/logFR ($R^2 = 0,38$; $p = 0,0005$; $r = -0,62$; $p = 0,0005$), FR-M-TR ($R^2 = 0,24$; $p = 0,009$; $r = -0,48$; $p = 0,009$). W zależności od Fe-M chorych podzielono na dwie podgrupy: z obniżonym ($n = 14$) i nieobniżonym Fe-M ($n = 19$). Obie podgrupy prezentowały podobny stopień uszkodzenia LK/PK, NT-proBNP. Poziom FR-M był niższy w podgrupie z obniżonym Fe-M (LK: 178 ± 80 v. 199 ± 51 ; $p = 0,08$) oraz (PK: 159 ± 46 v. 189 ± 39 ; $p = 0,024$), bez różnic w sTfR-M.

Wnioski: W niewydolnym mięśniu sercowym adekwatna charakterystyka gospodarki Fe wymaga oznaczenia w osoczu TR, FR, jak również sTfR i kalkulacji sTfR/logFR. W podgrupie z obniżonym Fe-M stężenie białka wiążącego Fe-FR-M jest niższe, przy braku istotnych różnic w stopniu uszkodzenia LK/PK.

1770

Wpływ wieku na czynność rozkurczową okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej

Marek Deja, Marcin Malinowski, Krzysztof Gołba, Stanisław Woś

II Klinika Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Cel: Celem pracy była ocena, czy wpływ rozkurczowy ludzkiej okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej zależy od czynników klinicznych.

Metody: Analizie poddano rekcję rozkurczową w odpowiedzi na ADRF wydzielany z tkanki okołonaczyniowej ludzkiej tętnicy piersiowej wewnętrznej (ITA). W trakcie operacji kardiologicznych pobierano odrzucone fragmenty ITA. W laboratorium tętnice uwalniano z otaczającej tkanki i 3 mm pierścienie montowano w kąpielni tkankowej natlenianej karbogenem. Osobno inkubowano tkankę okołonaczyniową. Po okresie stabilizacji i normalizacji napięcia ściany naczyniowej fragmenty naczyń obkurczano 60 mM KCl. Po odpłukaniu naczynie obkurczono $10^{-5.5}$ M serotoniny. Następnie do kąpeli tkankowej wprowadzano fragment tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej i obserwowano rozkurcz, który zgodnie z wcześniejszymi doświadczeniami przypisujemy wydzielaniu ADRF. Wielkość rozkurczu wyrażano procentach skurczu wywołanego serotoniną. Równocześnie odnotowywano szereg cech demograficznych i klinicznych pacjenta.

Wyniki: Przebadano segmenty tętnic pochodzące od 168 pacjentów (125 mężczyzn; wiek $65,3 \pm 8,4$ roku). Rozkurcz pod

wplywem tkanki tłuszczowej wynosił średnio $50,4 \pm 2,1\%$. Średnia waga segmentu tłuszczu to 713 ± 501 g. Nie stwierdzono jednoznacznej zależności wielkości rozkurczu od masy fragmentu tkanki tłuszczowej ($p = 0,059$). Obserwowano wzrost siły rozkurczu wraz z nasileniem otyłości ($r = 0,14$; $p = 0,04$) oraz spadek siły rozkurczu wraz z wiekiem ($r = -0,28$; $p = 0,002$). Nie obserwowano zmian siły rozkurczu w cukrzycy ani w nadciśnieniu. Obserwowano mniejszy wpływ rozkurczowy tkanki okołonaczyniowej u pacjentów z wyższą klasą dławicy wg CCS: odpowiednio CCS 0: $57,7 \pm 7,9\%$, CCS 1: $51,9 \pm 4,5\%$, CCS 2: $56,9 \pm 3,1\%$, CCS 3: $46,7 \pm 3,6\%$, CCS 4: $30,2 \pm 6,9\%$ ($p = 0,005$). W analizie wieloczynnikowej najsilniejszym predyktorem siły działania rozkurczowego tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej był wiek.

Wnioski: Zmienność wpływu rozkurczowego tkanki okołonaczyniowej w zależności od parametrów klinicznych i demograficznych może wskazywać na rolę fizjologiczną tego zjawiska.

1771

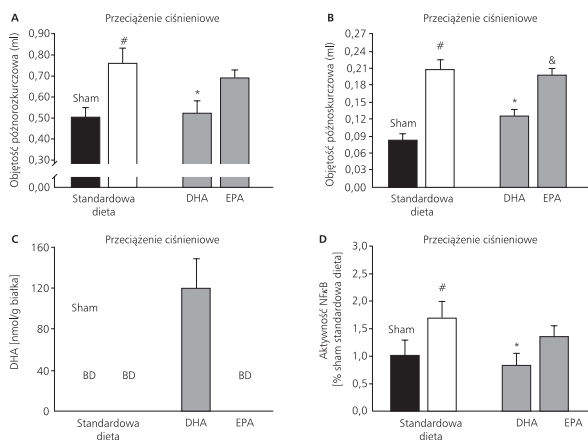
Suplementacja kwasem dokozaheksaenowym, ale nie kwasem eikozapentaenowym, hamuje aktywność NF-kappaB i zapobiega dysfunkcji lewej komory serca w odpowiedzi na przeciążenie ciśnieniowe

Monika Duda¹, Paweł Dobrzyń², Michał Mączewski¹, Agnieszka Dobrzyń², Urszula Mackiewicz¹

¹Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

²Pracownia Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego, Warszawa

Wzrost aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B oraz NF- κ B-zależnych ścieżek sygnalizacyjnych odgrywa istotną rolę w rozwoju niewydolności serca. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 — kwas dokozaheksaenowy (DHA) i kwas eikozapentaenowy (EPA) — są inhibitorami NF- κ B, co może być skuteczne w zapobieganiu rozwojowi niewydolności serca. Badania pokazują, że suplementacja diety mieszaniną kwasów DHA i EPA działa kardioprotekcyjnie, natomiast niewiele wiadomo o efekcie, jaki wywiera na serce każdy z kwasów niezależnie. Celem pracy było poznanie i porównanie wpływu DHA i EPA na aktywność NF- κ B i patologie lewej komory serca (LV) w odpowiedzi na przeciążenie ciśnieniowe. U szczurów karmionych dietą kontrolną oraz dietami wzbogaconymi DHA lub EPA (3% całkowitej energii) indukowano przeciążenie ciśnieniowe, zwięzając aortę brzuszna. Po 12-tygodniowej obserwacji wykonano badanie echokardiograficzne i oceniono aktywność NF- κ B (ELISA), aktywność metaloproteinazy MMP-2 (zymografia), ekspresję genów szlaków NF- κ B-zależnych (RT-PCR) i skład lipidowy LV (chromatografia). Po 12 tygodniach u zwierząt karmionych dietą standardową przeciążenie ciśnieniowe prowadziło do 40% przerostu lewej komory (stosunek masy LV do długości skurczowej) oraz przebudowy i upośledzenia funkcji skurczowej LV, co przejawiało się odpowiednio wzrostem objętości późnorozkurczowej (ryc. 1A) i późnoskur-



Rycina 1. Objętość późnorozkurczowa (A) i późnoskurczowa (B) LV oraz zawartość DHA we krwi wolnych kwasów tłuszczowych LV (C) i aktywność NF-kappaB w LV (D) po 12 tygodniach przecięcia ciśnieniowego; #p < 0,05 v. Sham, *p < 0,05 v. Standardowa dieta [1771]

czowej (ryc. 1B). Towarzyszył temu wzrost aktywności NF- κ B (ryc. 1D) oraz zmiany w NF- κ B-zależnych ścieżkach sygnalizacyjnych: (a) wzrost ekspresji mRNA dla prozapalnych cytokin TNF α i IL-1 β , (b) wzrost ekspresji mRNA dla proapoptycznej kaspazy 3, (c) wzrost ekspresji mRNA dla sztywnego kolagenu typu I, (d) wzrost aktywności MMP-2. Suplementacja diety DHA zwiększała zawartość DHA we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych (ryc. 1C), zapobiegała wzrostowi masy oraz objętości późnorozkurczowej i późnoskurczowej. Dodatkowo obserwowano spadek aktywności NF- κ B oraz (a) spadek ekspresji mRNA dla TNF α i IL-1 β , (b) wzrost ekspresji mRNA dla czynnika bcl2 hamującego kaspazę 3, (c) spadek ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, (d) wzrost ekspresji mRNA dla tkankowych inhibitorów metaloproteinaz TIMP1 i TIMP4, (e) spadek aktywności MMP-2. Efektów tych nie obserwowano w przypadku suplementacji diety EPA. Podsumowując, suplementacja diety jedynie DHA, a nie EPA, zapobiega przerostowi, przebudowie i upośledzeniu funkcji skurczowej LV. Efekty te są związane ze zmniejszoną aktywnością NF- κ B oraz NF- κ B-zależnych ścieżek sygnalizacyjnych regulujących odpowiedź zapalną, apoptozę i strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej miokardium. Zmiany te mogą być wtórne do pojawienia się we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych LV DHA, który może bezpośrednio regulować aktywność jądrowych czynników transkrypcyjnych.

1772

Zmienność rytmu oddechowego jako dominujący czynnik w zmienności rytmu serca?

Teodor Buchner

Pracownia Fizyki Układu Krążenia, Wydział Fizyki, Politechnika Warszawska, Warszawa

Istnieje coraz więcej przesłanek za przyjęciem tezy, że dominującą rolę w zmienności rytmu serca ma rytm oddechowy i to jego zmienność obserwujemy. Niniejsze doniesienie porządkuje dane literaturowe na ten temat i na ich podstawie prezentuje wyniki działania modelu matematycznego, wskazując na jego ścisłe związki z obserwacjami fizjologicznymi. Od czasu eksperymentów Katony i wsp. [1] wiadomo, że wychłodzenie nerwu błędnego prowadzi do redukcji zmienności rytmu, podobnie jak farmakologiczny blok gałęzi przywspółczulnej AUN. Resztkowa zmienność rytmu w tych warunkach pozbawiona jest zupełnie informacji klinicznych, decydujących chociażby o wartości rokowniczej zmienności rytmu. W związku z tym nasuwa się pytanie o faktyczne źródło zmienności rytmu serca: czy nie jest nim zmienność rytmu oddechowego? Zmienność rytmu oddechowego obserwowana jest przede wszystkim w paśmie HF, ale brak aktywności w tym paśmie nie świadczy jeszcze o braku związku pomiędzy rytmem oddechowym a rytmem serca. W nerwie błędnym obserwuje się także aktywność w paśmie LF. Także związek pomiędzy średnimi częstościami obu rytmów (a ściślej rzecz biorąc pomiędzy przepływem w łożysku płucnym a wentylacją) ma charakter homeostatyczny, jest bardzo silny i gwarantuje utrzymanie właściwego poziomu pCO₂ we krwi. Rytm oddechowy wykazuje również zmienność w paśmie LF i VLF, zaś widmo mocy we wszystkich pasmach niskich częstotliwości ma cechy szumu 1/f. Co więcej, także lokalizacja anatomiczna ośrodków AUN mających wpływ na zmienność rytmu serca i rytmu oddechowego pokrywa się [2]. Wszystkie te obserwacje skłaniają do postawienia pytania o to, czy i na ile HRV daje informację niezależną od (trudniejszej do oceny) zmienności rytmu oddechowego i czy można uważać ją za wielkość autonomiczną, czy jedynie za pochodną zmienności rytmu oddechowego. Prezentowane w pracy wyniki dla modelu matematycznego wykazują silną współzależność obu rytmów.

1. Katona PG, Jih F. Respiratory sinus arrhythmia: noninvasive measure of parasympathetic cardiac control. *J Appl Physiol*, 1975; 39: 801–805. 2. Richter DW. Neural regulation of respiration: Rhythmogenesis and afferent control. In: Greger R, Windhorst U eds. *Comprehensive human physiology*. Vol. 2, Springer Verlag, Berlin 1996.

1773

Histological assessment of myocardium and coronary vessels in lethal ethanol intoxication

Paweł Łaskowski¹, Elżbieta Litwiejko-Pietryńczak¹, Magdalena Szkudlarek¹, Janusz Dziecioł¹, Anna Niemcunowicz-Janica², Magdalena Okłota², Andrzej Namioł¹, Beata Klim¹, Urszula Łapińska³, Andrzej Szpak³

¹Department of Human Anatomy, Medical University of Białystok, Białystok

²Department of Forensic Medicine, Medical University of Białystok, Białystok

³Department of Public Health, Medical University of Białystok, Białystok

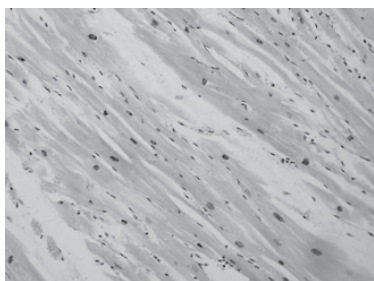


Figure. Hypertrophy of individual cardiomyocytes with significant enlargement of cell nuclei. HE, mag. 200× [1773]

The aim of the study is the histological assessment of myocardium and coronary vessels in lethal ethanol intoxication. The study was based on the histological assessment of specimens of myocardium and coronary vessels taken from 30 deceased males in the 29–45 age range. Autopsies were carried out in the Department of Forensic Medicine of UMB. Material for examination was taken from free wall of left ventricle, myocardium of interventricular septum, and part of myocardium directly after arising of left coronary artery from aorta. Material was fixed in the buffered formalin and embedded in paraffin blocks. After fixation material was stained (H+E) and examined in standard histological procedure. Morphometric examination was carried out in the Department of Human Anatomy of UMB. The results of the examinations revealed: 1) hypertrophy of individual cardiomyocytes with significant enlargement of cell nuclei, 2) separation of particular cardiomyocytes by connective tissue and visible fibroblasts, 3) proliferation of small vessels, 4) distinct perivascular fibrosis.

1775

Morphometric assessment of cardiomyocytes in lethal ethanol intoxication

Beata Klim¹, Elżbieta Litwiejko-Pietrzyńczak¹, Anna Niemcunowicz-Janica², Magdalena Okłota², Magdalena Szkuclarek¹, Justyna Klimek¹, Andrzej Namiot¹, Paweł Łaskowski¹, Janusz Dzieciot¹

¹Department of Human Anatomy, Medical University of Białystok, Białystok

²Department of Forensic Medicine, Medical University of Białystok, Białystok

The reason of sudden cardiac death caused by ethanol intoxication is not entirely explained. Morphologic alterations of the cardiomyocytes may affect the conduction of electrical stimuli, which can result in dangerous arrhythmias and cardiac conduction disturbances. The aim of the study was assessment of the circular deviation (CD), area of the cardiomyocytes and their nuclei and nuclear-cytoplasmic ratio. Examined group consisted of 30 males who died from ethanol intoxication in the 29–45 age range. The concentration of ethanol in the samples of blood

of the analysed cases ranged between 2.5–4.4%. The control group consisted of 10 male patients who died of the cerebral stroke. Material for examination was taken from free wall of the left ventricle and interventricular septum of the heart, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin blocks. The 6 μm sections was routinely HE-stained and examined in standard histological procedure. The morphometric measurements were made only on transverse sections using the morphometric set of Olympus BX41 system Camedia 3030 digital photography and the program Cell-Imaging Software for Life Sciences Microscopy. Differentiation was observed and the shape of the nuclei of cardiomyocytes, increasing their area and decreased nuclear-cytoplasmic ratio. Obtained initial results may indicate the influence of ethanol on the morphology of the cardiomyocytes, which may be manifested clinically as a sustained ventricular tachycardia or ventricular fibrillation resulting in death.

1776

Przebudowa kardiomiocytów, cytoszkieletu komórkowego i macierzy zewnątrzkomórkowej w mysim modelu genetycznie uwarunkowanej kardiomiopatii

Urszula Mackiewicz¹, Elżbieta Czarnowska², Magdalena Brudek², Gabor Csanyi³, Andrzej Fedorowicz³, Elżbieta Grochal³, Urszula Tyrankiewicz⁴, Tomasz Skórka⁴, Bohdan Lewartowski¹, Stefan Chłopicki³

¹Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

²Zakład Patologii, Instytut Pomnik — Centrum Zdrowia Dziecka, Warszawa

³Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Katedra Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

⁴Zakład Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej, Instytut Fizyki Jądrowej, Polska Akademia Nauk, Kraków

Wstęp: Patologiczna przebudowa serca prowadząca ostatecznie do jego niewydolności zachodzi zarówno na poziomie kardiomiocytów, jak i macierzy zewnątrzkomórkowej. Ostatnio za ważny czynnik prowadzący do rozwoju niewydolności serca uznawane są również zaburzenia transmisji sygnałów pomiędzy macierzą a kardiomiocytami, wynikające ze zmian ekspresji i struktury białek cytoszkieletu komórkowego. Pomimo licznych badań nad patomechanizmami rozwoju niewydolności serca kolejność zmian pojawiających się na poziomie poszczególnych elementów mięśnia sercowego i ich wzajemna zależność nie jest znana. Rozwój niewydolności serca u myszy transgenicznym Tgαq*44 jest następstwem nadekspresji stale aktywnej podjednostki α białka Gq. Naśladuje to przewlekłą stymulację neurohormonalną (prowadzącą do aktywacji białka Gq) odgrywającą kluczową rolę w rozwoju niewydolności serca, zarówno w modelach zwierzęcych, jak i u ludzi. Myszy

Tg α q*44 stanowią dogodny model niewydolności serca pozwalający na ustalenie czasowej sekwencji pojawiających się w mięśniu sercowym zmian. Wynika to z faktu, że spadek funkcji lewej komory i objawy niewydolności serca w tym modelu pojawiają się stosunkowo późno (w 12.–14. miesiącu życia).

Metody: U Myszy Tg α q*44 w wieku 4, 8, 12 i 14 miesięcy i u równowiekowych myszy szczepu kontrolnego FVB zbadano funkcję skurczową i rozkurczową lewej komory *in vivo* metodą obrazowania rezonansowo-magnetycznego, wymiary i funkcję skurczową kardiomiocytów, wewnątrzkomórkowy obieg Ca²⁺ (amplitudę sygnału Ca²⁺ i funkcję głównych transporterów wapniowych: ATP-azy Ca²⁺ siateczki sarkoplazmatycznej-SERCA i wymiennika Na⁺/Ca²⁺ -NCX) za pomocą sondy fluorescencyjnej INDO-1, stopień zwłóknienia mięśnia sercowego (barwienie Trichromem Massona) oraz ekspresję, lokalizację i strukturę głównego białka cytoszkieletu komórkowego, jakim jest desmina (metodą immunohistochemiczną).

Wyniki: Spadek funkcji skurczowej lewej komory pojawił się w 12. miesiącu życia myszy Tg α q*44. W 14. miesiącu obecny był już spadek funkcji skurczowej i rozkurczowej, odpowiednio o 40% i 30%. Mimo to parametry skurczu i rozkurczu izolowanych kardiomiocytów były zachowane nawet u myszy 14-miesięcznych. Amplituda sygnału Ca²⁺ rosła u myszy 12- i 14-miesięcznych, odpowiednio o 33% i 49%. Jest to prawdopodobnie wynik retencji Ca²⁺ w komórce spowodowany spadkiem funkcji transportowej NCX (o 37% u myszy 14-miesięcznych). Funkcja transportowa SERCA była niezmienną. Z kolei u 4-miesięcznych myszy Tg α q*44 włóknienie było bardzo nasilone (20% v. 5% u myszy kontrolnych) i rosło z wiekiem (30% u myszy 14-miesięcznych). Zawartość desminy była 6-krotnie zwiększona w kardiomiocytach 4-miesięcznych myszy Tg α q*44 w porównaniu z równowiekowymi myszami kontrolnymi. Struktura i lokalizacja desminy pomimo ogromnego wzrostu zawartości były u młodych myszy Tg α q*44 prawidłowe. Poczynając od 8. miesiąca, zawartość desminy u myszy Tg α q*44 sukcesywnie spadała i w wieku 14 miesięcy nie różniła się od jej zawartości u myszy kontrolnych. Rozmieszczenie desminy w kardiomiocytach myszy Tg α q*44 po upływie 8 miesięcy życia było wysoce niehomogenne. U najstarszych badanych myszy Tg α q*44 ok. 20% kardiomiocytów zawierało śladowe ilości desminy, podczas gdy w pozostałych kardiomiocytach obserwowany był zanik formy filamentowej i pojawienie się formy ziarnistej desminy, co prawdopodobnie uniemożliwia prawidłową transmisję sygnału z kardiomiocytów do macierzy.

Wnioski: U myszy Tg α q*44 zmiany zachodzące na poziomie cytoszkieletu komórkowego i macierzy zewnątrzkomórkowej pojawiają się znacznie wcześniej niż te na poziomie białek odpowiedzialnych za aktywację skurczu kardiomiocytów i to one (a w szczególności zmiana struktury i lokalizacji desminy), a nie zaburzenia czynności skurczowej poszczególnych kardiomiocytów, są odpowiedzialne za rozwój niewydolności serca. Zmiany w wewnątrzkomórkowym obiegu Ca²⁺ mają charakter kompensacyjny i prawdopodobnie przyczyniają się do utrzymania funkcji skurczowej kardiomiocytów.

1777

Okołooperacyjna zmienność rytmu serca po pomostowaniu aortalno-wieńcowym a polimorfizm Ser49Gly genu beta-1 adrenoreceptora

Piotr Mazur¹, Ewelina Nowak¹, Łukasz Janik²,
Marcin Waligóra¹, Paweł Koźlik¹, Grzegorz Wasilewski²,
Łukasz Durajski¹, Ewa Stępień², Roman Pfitzner²

¹Studenckie Koło Naukowe Kardiochirurgiczne przy Klinice Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii, Instytut Kardiologii, *Collegium Medicum*, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

²Klinika Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii, Instytut Kardiologii, *Collegium Medicum*, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wstęp: Zmienność rytmu serca (HRV) pozwala skwantyfikować odpowiedź serca na impulsację autonomiczną. Choroby układu sercowo-naczyniowego i zabiegi kardiochirurgiczne negatywnie wpływają na autonomiczną regulację pracy serca, skutkując obniżeniem HRV. Podstawą pomiaru HRV jest analiza czasów trwania odcinków R-R w prawidłowym zapisie EKG. Polimorfizm Ser49Gly genu receptora beta-1 adrenergicznego (ADRB1) może wpływać na reaktywność receptora zarówno na agonistów, jak i antagonistów, czego efektem jest wpływ na częstość rytmu serca i ciśnienie tętnicze.

Cel: Celem pracy była weryfikacja wpływu polimorfizmu Ser49Gly genu ADRB1 na odpowiedź serca, wartości parametrów częstotliwościowych HRV po pomostowaniu aortalno-wieńcowym (CABG).

Metody: Do badania włączono 91 osób w średnim wieku 65,6 ± 7,6 roku, zakwalifikowanych do pierwszorazowego planowego CABG. Wykluczono osoby po ostrym zespole wieńcowym w ciągu miesiąca przed włączeniem do badania oraz pacjentów z chorobą organiczną serca (wady zastawkowe, tętniaki), zaburzeniami rytmu i chorych z rozrzuśnikiem. Pomiar HRV wykonano 2-krotnie metodą Short Time Measurement — przed operacją oraz w 6. dobie pooperacyjnej. Po usunięciu artefaktów i ekstrakcji analizy poddano wartości mocy spektrum HRV w zakresie bardzo niskich (VLF, *very low frequency*), niskich (LF, *low frequency*) i wysokich częstotliwości (HF, *high frequency*) oraz współczynnik LF/HF. Próbkę krwi żyłnej (2,6 ml) pobierano po pierwszym pomiarze HRV. Po odwirowaniu kózuszek leukocytny zamrażano w temperaturze –26°C. Genotypowanie polimorfizmu przeprowadzone zostało z użyciem znakowanych fluorescencyjnie sond TaqMan metodami Real time PCR. Wszyscy pacjenci udzielili pisemnej zgody na udział. Badanie zaakceptowała Komisja Bioetyczna *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Wyniki: Wartości VLF, LF i HF spadły po CABG odpowiednio o 47,6%, 71,7% i 47,6% w dobie 6. ($p < 0,0001$). Osoby z cukrzycą miały niższe wartości przedoperacyjne współczynnika LF/HF o 35,7% ($p < 0,025$). Pacjenci z chorobą trójnaczyńową wykazywali niższe wyjściowe wartości w zakresie

LF w porównaniu z pozostałymi osobami ($p < 0,0001$). Dystrybucja genotypów była zgodna z prawem Hardy-Weinberga ($p = 0,24$; $\chi^2 = 2,8$). W porównaniu z homozygotami Ser49Ser, heterozygoty Ser49Gly cechowały się niższymi wartościami wyjściowymi w zakresie LF ($p < 0,025$) oraz większym spadkiem LF po CABG ($p < 0,025$).

Wnioski: Regulacja autonomiczna pracy serca ulega upośledzeniu się po CABG. Bardziej zaawansowana choroba wieńcowa wiąże się z gorszą odpowiedzią serca na stymulację współczulną. Polimorfizm Ser49Gly genu ADRB1 wpływa na odpowiedź serca na okołoperacyjną stymulację współczulną.

1778

Ekspresja genów w świeżym zawale serca

Marek Kiliszek¹, Beata Burzyńska², Marcin Michalak¹, Monika Góra², Aleksandra Winkler¹, Monika Niewiadomska², Katarzyna Rawa², Grzegorz Opolski¹

¹Katedra i Klinika Kardiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

²Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

Wstęp: Zawały serca, mimo coraz lepszych metod diagnostyki i leczenia, nadal mają duży wpływ na śmiertelność w populacji. W świeżym zawale serca zwiększa się stężenie leukocytów i stanowi to czynnik prognostyczny kolejnych zdarzeń sercowo-naczyniowych. Dokładne poznanie patofizjologii zawału serca przyczyni się do poprawy skuteczności leczenia i prewencji ostrych zespołów wieńcowych.

Cel: Celem pracy było zbadanie ekspresji genetycznej w świeżym zawale serca w leukocytach.

Metody: Do badania włączano pacjentów ze świeżym zawałem serca z uniesieniem odcinka ST, leczonych pierwotną angioplastyką wieńcową. Od wszystkich chorych izolowano RNA z krwi obwodowej w pierwszej dobie zawału (grupa badana), a następnie po 6 miesiącach od zawału (kontrola). Analiza ekspresji genów została wykonana przy użyciu mikromacierzy firmy Affymetrix Human Gene 1.0 ST i systemu GCS3000 TG (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Analiz funkcjonalnych genów (modelowanie sieci genowych i ścieżek sygnałowych) dokonano za pomocą programu Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com).

Wyniki: Do badania włączono 28 pacjentów ze świeżym zawałem serca (średnia wieku $54,8 \pm 10,2$ roku; 7 kobiet (25%)). Wszyscy chorzy zgłosili się na badanie kontrolne po 6 miesiącach. Przyjmując kryteria zmiany ekspresji 1,5-krotnie oraz $p < 0,05$ (1. doba zawału serca v. kontrola po 6 miesiącach) stwierdzono zmianę ekspresji 91 genów, z czego 57 zmapowanych (3 duplikaty, w sumie 54 geny), 34 geny bez anotacji. W analizie funkcjonalnej największa zmiana ekspresji dotyczyła szlaków metabolicznych związanych z PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), IL-10, receptorem glukokortykosteroidów,

IL-6 oraz aktywacją LXR/RXR (*liver X receptor/retinoid X receptor*). Największe zmiany ekspresji genetycznej obejmowały geny kodujące następujące białka: SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*; $p = 1,60E20$), FAM198B (*family with sequence similarity 198, member B*; $p = 7,00E17$), ST14 (*suppression of tumorigenicity 14*; $p = 1,68E16$), ASGR2 (*asialoglycoprotein receptor 2*; $p = 5,82E16$) oraz AQP9 (*aquaporin 9*; $p = 1,71E15$).

Wnioski: Zawał serca powoduje szereg zmian w ekspresji genów w leukocytach krwi obwodowej. Najbardziej zmienia się ekspresja genów szlaków metabolicznych dotyczących PPAR, interleukiny 10 i 6 oraz receptora glikokortykosteroidów i LXR/RXR.

1779

Ocena farmakokinetyki i efektów tkankowych uwolnionego paklitakselu z cewnika balonowego w ścianie naczynia na modelu hiperplazji neointymy tętnic wieńcowych i obwodowych świni domowej

Piotr P. Buszman, Krzysztof Milewski, Michał Jelonek, Wanda Jackiewicz, Wojciech Wojakowski, Paweł E. Buszman

Centrum Badawczo Rozwojowe, Polsko-Amerykańskie Kliniki Serca, Ustroń

Wstęp: Jednym z osiągnięć ostatnich lat kardiologii interwencyjnej jest wprowadzenie balonów powlekanych lekami (DEB), które udowodniły swoją wyższość w leczeniu restenozy w porównaniu z balonami niepowlekanyymi i stentami elutującymi lek (DES). Szeroko przyjętym modelem eksperymentalnym potwierdzającym bezpieczeństwo i skuteczność DEB jest badanie farmakokinetyczne i efektów tkankowych na modelu tętnic wieńcowych świni domowej.

Metody: Do badania włączono 11 świń domowych. W pierwszym etapie badania farmakokinetyki przenikania paklitakselu do światła naczynia u 4 zwierząt wykonano po trzy angioplastyki badanymi cewnikami pokrytymi paklitakselem w stężeniu $2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ (Pax, Balton®) w każdej tętnicy wieńcowej i biodrowej. Eutanazję wykonano po 1, 24 i 72 godzinach oraz po 1 tygodniu, po jednym zwierzęciu na badany punkt czasowy. Badane segmenty tętnic zostały wypreparowane i podane analizie wysokosprawną chromatografią ciecząwą celem oznaczenia stężenia śródściennego i pozostałego na balonie paklitakselu. W drugim etapie do badania włączono 7 świń celem oceny efektów tkankowych badanych DEB. U każdego ze zwierząt dokonano implantacji stentów do trzech tętnic wieńcowych techniką nadmiernego rozprężenia celem uszkodzenia i indukcji proliferacji neointymy. Następnie po randomizacji wykonano postdylatację cewnikiem badanym (Pax), referencyjnym (Sequent Please, Braun®) oraz balonem niepowlekany. Po 28 dniach wykonano ilościową koronarografię (QCA), badanie ultrasonografii wewnątrznaczyniowej oraz ocenę histopatologiczną badanych stentów.

Wyniki: W pierwszym etapie badania uzyskano następujące stężenia paklitakselu w ścianie naczyń tętnic wieńcowych: $10,94 \pm 3,3 \mu\text{g/g}$ po jednej godzinie obserwacji; $0,40 \mu\text{g/g}$ po 24 godzinach; $0,20 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ po 72 godzinach oraz $0,05 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ po 7 dniach. Na balonach pozostało 12% dawki wyjściowej leku. W ścianie tętnic biodrowych dla powyższych długości obserwacji oznaczono następujące stężenia leku: $154,5 \pm 152,9 \mu\text{g/g}$; $3,0 \pm 1,5 \mu\text{g/g}$; $3,0 \pm 1,5 \mu\text{g/g}$; $3,0 \pm 1,5 \mu\text{g/g}$. Na balonach biodrowych pozostało 29% początkowej dawki leku. Badanie efektów tkankowych jest w trakcie, wyniki zostaną opublikowane podczas prezentacji.

Wnioski: Badane cewniki balonowe zapewniły dostarczenie paklitakselu do ściany w niskim stężeniu, utrzymującym się aż do 7. dnia obserwacji. Badanie efektów tkankowych rozstrzygnie, czy dostarczony lek zahamuje przerost neointymy.

1780

Modyfikacja genetyczna ludzkich macierzystych komórek mięśniowych proangiogenym genem endotelialnej syntazy tlenu azotu

Agnieszka Janeczek¹, Agnieszka Zimna¹, Monika Frączek¹, Monika Seidel¹, Marek Ruciński², Tomasz Miętkiewski², Maciej Kurpisz¹

¹Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

²Oddział Ortopedii i Chirurgii Urazowej Narządu Ruchu, Szpital Wojewódzki, Poznań

Komórki macierzyste mięśnia szkieletowego od lat badane są pod względem przydatności w regeneracji pozawałowego miokardium. Zastosowanie ich w terapii miałooby na celu wypełnienie zwłóknionego obszaru blizny pozawałowej komórkami mięśniowymi zdolnymi do skurczu, wykazującymi się wytrzymałością na warunki niedotlenienia. Kolejnym podejściem do terapii uszkodzonego mięśnia sercowego jest dążenie do zwiększenia ukrwienia wcześniej wspomnianej blizny pozawałowej, poprzez wytworzenie nowych naczyń krwionośnych w jej obrębie. Łatwość pozyskania mioblastów i ich modyfikacji genetycznej to kolejne czynniki przemawiające za ich wykorzystaniem, dzięki którym możliwe staje się osiągnięcie obu wyżej wymienionych celów. W przypadku terapii komórkowej mioblastami wykazującymi nadekspresję eNOS (endotelialnej syntazy tlenu azotu), proces angiogenezy może być indukowany pośrednio dzięki produktowi tego enzymu, który wpływa na wzrost syntezy czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF). Tlenek azotu (NO), o którym mowa, charakteryzuje się szerokim zasięgiem działań fizjologicznych, między innymi wpływa również na rozszerzenie naczyń krwionośnych, stymuluje rozwój śródbłonna i uniemożliwia adhezję leukocytów do niego oraz zapobiega agregacji płytek krwi. Celem pracy było uzyskanie populacji ludzkich mioblastów transfekowa-

nych przejściowo konstrukcją genową zawierającą ORF dla proangiogenego genu eNOS oraz ocena wpływu tej modyfikacji genetycznej na podstawowe procesy komórkowe w warunkach *in vitro*. Skuteczność modyfikacji określono na poziomie transkrypty i białka, oceniając jednocześnie jego funkcjonalność. Ponadto zbadano wpływ transfekcji na proliferację komórek oraz cykl komórkowy, jak również oceniono ekspresję czynników transkrypcyjnych szlaku miogenego. Określono też wpływ nadekspresji badanego enzymu na proces apoptozy oraz nekrozy w warunkach stresu oksydacyjnego. Uzyskane wyniki sugerują, że transplantacja mioblastów z wymuszoną ekspresją eNOS może zostać wykorzystana w przyszłości w próbie regeneracji pozawałowego mięśnia sercowego, stanowiąc podstawę dla badań przedklinicznych przeprowadzanych na mysim modelu zawału.

1781

Obserwacja zmian architektury jądrowej podczas procesu różnicowania ludzkich mioblastów w hodowli *in vitro*

Tomasz Kolanowski, Natalia Rozwadowska, Ewa Wiland, Michał Lach, Marta Olszewska, Maciej Kurpisz

Zakład Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych, Instytut Genetyki Człowieka, Polska Akademia Nauk, Poznań

Przez ostatnią dekadę mioblasty mięśni szkieletowych były szeroko wykorzystywane w badaniach klinicznych nad regeneracją pozawałowego miokardium. Niestety, mimo początkowych, obiecujących wyników, nie spełniły one pokładanych w nich oczekiwań. Analiza właściwości tych komórek wykazała brak sprzężenia elektrofizjologicznego między przeszczepianymi mioblastami a kardiomiocytami obecnymi *in situ*. Z tego powodu, mimo wielu pożądaných cech mioblastów (np. zdolność do skurczu bądź oporność na warunki hipoksji), istnieje potrzeba dokładnego scharakteryzowania subpopulacji mioblastów oraz czynników transkrypcyjnych, których odpowiednia, sekwencyjna obecność może mieć wpływ na ich późniejsze właściwości. Niestety, dotychczas nie poznano markerów umożliwiających dywersyfikację wspomnianych subpopulacji, jednak dokładne dane dotyczące czasu ekspresji odpowiednich czynników transkrypcyjnych wraz z obserwacją aktywacji regionów chromosomów oraz scharakteryzowaniem zmian terytoriów chromosomowych powinny umożliwić wspomniane zadanie. Ponadto ogólnodostępna literatura podaje niewiele danych na temat architektury chromosomowej ludzkich mioblastów oraz jej zmian podczas procesu różnicowania. Zamierzeniem przedstawianego projektu była ocena zmian topologii wyselekcjonowanych telomerów podczas hodowli *in vitro* oraz różnicowania ludzkich komórek macierzystych mięśni szkieletowych. Chromosomy poddawane badaniu wybrano na podstawie lokalizacji genomowej genów kodujących czynniki trans-

krypcyjne znaczące dla procesów utrzymania potencjału rozwojowego mioblastów lub ich różnicowania. Analizę przeprowadzono poprzez wykonanie dwu- bądź trójwymiarowej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z późniejszą analizą komputerową uzyskanych obrazów. W celu klasyfikacji jądra podzielono na 5 regionów, bazując na odległości sygnałów od punktu centralnego. Jak dotąd przeprowadzono analizę centromerów chromosomów 1, 7, 11, 12, 16 i 17 w dwóch punktach czasowych — tuż po izolacji oraz po zróżnicowaniu *in vitro* komórek w miotuby. Zmiany zaobserwowano w centromerach chromosomów 1, 11 i 12, co warte uwagi — we wszystkich przypadkach był to ruch w stronę peryferyjną. Podsumowując, wykonano pierwszy krok w kierunku zbadania zmian terytoriów chromosomowych podczas procesu różnicowania w ludzkich komórkach macierzystych mięśni szkieletowych. Niestety jednak zanim obserwowane zmiany zostaną dokładnie scharakteryzowane, należy wykonać analizę 3D FISH. Kolejnym krokiem będzie ocena modyfikacji terytoriów wybranych chromosomów z wykorzystaniem techniki malowania chromosomów. Ponadto przewiduje się śledzenie zmian lokalizacji jądrowej wybranych genów poprzez specyficzne sondy fluorescencyjne, umożliwiając porównanie danych molekularnych i cytogenetycznych oraz prawdopodobnie ustalenie wniosków końcowych badania.

1782

Wpływ wysiłku fizycznego na aktywność N-metylotransferazy nikotynamidu (NNMT) i wytwarzanie endogennego 1-metylonikotynamidu (MNA) u myszy — rola IL-6

Marta Kurdziel¹, Magdalena Sternak², Małgorzata Szafarz³, Joanna Szymura-Oleksiak³, Karol Kamiński⁴, Jerzy A. Żołądź¹, Stefan Chłopicki²

¹Zakład Fizjologii Mięśni, Katedra Fizjologii i Biochemii, Akademia Wychowania Fizycznego, Kraków

²Zakład Farmakologii Doświadczalnej, *Collegium Medicum*, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

³Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, *Collegium Medicum*, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

⁴Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

Wstęp: 1-metylonikotynamid (MNA), główny produkt reakcji metylacji katalizowanej przez NNMT, stanowi aktywny biologicznie metabolit posiadający właściwości naczynioprotekcyjne. Jednak mechanizm regulacji aktywności szlaku NNMT-MNA do tej pory nie został dobrze poznany.

Cel: Celem przedstawionej pracy była analiza udziału IL-6 w aktywacji szlaku NNMT-MNA podczas krótkotrwałego wysiłku fizycznego myszy.

Metody: Myszy FVB, C57Bl/6J IL6^{+/+} i C57Bl/6J IL6^{-/-} poddano próbie wytrzymałościowej polegającej na pływaniu przez

okres 90 minut. Następnie analizowano wywołane wysiłkiem fizycznym zmiany aktywności NNMT w wątrobie oraz zmiany stężenia MNA i jego metabolitów w osoczu.

Wyniki: W badaniach wykazano, że u dwóch szczepów myszy (FVB oraz C57Bl/6J IL6^{+/+}) poddanych wysiłkowi pływania przez 90 minut, 2–3-krotnie wzrosła aktywność NNMT (odpowiednio od 0,14 ± 0,03 do 0,421 ± 0,02 pmol/min/mg; p < 0,05 oraz od 0,2 ± 0,06 do 0,35 ± 0,07 pmol/min/mg; p < 0,01 dla FVB i C57Bl/6J IL6^{+/+}), a także nastąpił wzrost stężenia MNA w osoczu (odpowiednio od 157 ± 15,06 do 230 ± 16,2 ng/ml; p < 0,01 oraz od 77,05 ± 14,6 ng/ml do 152,55 ± 58,4 ng/ml; p < 0,01 dla FVB i C57Bl/6J IL6^{+/+}). Natomiast u myszy C57Bl/6J IL6^{-/-} po 90-minutowym czasie pływania nie zaobserwowano żadnych zmian w aktywności NNMT w wątrobie (od 0,25 ± 0,07 do 0,23 ± 0,06 pmol/min/mg), podczas gdy stężenie MNA w osoczu wzrosło prawie dwukrotnie (od 65,3 ± 30,9 ng/ml do 124,8 ± 35,8 ng/ml; p < 0,05).

Wnioski: Podsumowując, w przedstawionej pracy po raz pierwszy wykazano, że szlak NNMT-MNA jest aktywowany przez wysiłek fizyczny. Co więcej, wykazano, że za aktywację szlaku NNMT-MNA w wątrobie wywołaną przez wysiłek fizyczny odpowiada IL-6, podczas gdy wzrost stężenia MNA w osoczu jest częściowo niezależny od IL-6. Biorąc pod uwagę farmakologiczne właściwości MNA, można przypuszczać, że szlaki aktywacji NNMT, zarówno zależne od IL-6 (w wątrobie), jak i od niej niezależne (w innych tkankach) mogą mieć znaczenie w regulacji wydolności wysiłkowej.

1783

Zaburzenia czynności rozkurczowej mięśnia sercowego w mysim modelu kardiomiopatii rozstrzeniowej (myszy Tgαq*44) oraz miażdżycy (myszy ApoE/LDLR^{-/-})

Urszula Tyrankiewicz¹, Tomasz Skórka¹, Magdalena Jabłońska^{1, 2}, Stefan Chłopicki^{3, 4}

¹Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego, Polska Akademia Nauk, Zakład Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej, Kraków

²Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej, Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki, Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków

³Zakład Farmakologii Doświadczalnej, *Collegium Medicum*, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

⁴Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET), Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wstęp: Zaburzenia czynności skurczowo-rozkurczowej serca mogą być uwidaczniane na wczesnych etapach dysfunkcji, nie tyle w warunkach spoczynkowych, co za pomocą stymulacji beta-adrenergicznej (np. z wykorzystaniem dobutaminy).

Cel: Celem pracy była ocena zmian poszczególnych parametrów charakteryzujących czynność skurczową i rozkurczową lewej komory w przebiegu niewydolności serca w mysim mo-

delu kardiomiopatii rozstrzeniowej (myszy Tg α q*44) oraz choroby niedokrwiennej serca (myszy ApoE/LDLR $-/-$) z wykorzystaniem testu dobutaminowego w niskiej i wysokiej dawce.

Metody: Do badań wykorzystano (1) myszy Tg α q*44 (rozwijające stopniowo kardiomiopatię rozstrzeniową) w czterech punktach czasowych odpowiadających różnym etapom zmian czynnościowych lewej komory oraz (2) myszy ApoE/LDLR $-/-$ na stosunkowo wczesnym oraz zaawansowanym etapie choroby niedokrwiennej serca. Czynność lewej komory mierzono za pomocą obrazowania magnetyczno-rezonansowego, w anestezji izofluranowej, w osi krótkiej lewej komory, na poziomie mięśni brodawkowatych (grubość warstwy: 1,5 mm). Oceniano: powierzchnię końcowoskurczową/rozkurczową, dynamikę skurczu/rozkurczu, powierzchniową frakcję wyrzutową, warstwowy rzut i objętość wyrzutową oraz cykl serca. Badanie wykonano w warunkach spoczynkowych oraz po stymulacji beta-adrenergicznej (dobutaminą w dawkach: 0,5 i 5 mg/kg, *i.p.*).

Wyniki: Uzyskane wyniki potwierdziły wczesne upośledzenie czynności lewej komory serca u myszy Tg α q*44 już w wieku 4 miesięcy (jako mniejszą powierzchniową frakcję/objętość wyrzutową i zmniejszony rzut serca oraz nieznaczne zmiany w dynamice fazy wczesnorozkurczowej, przy stałej zachowanej rezerwie we wszystkich badanych parametrach). Zarówno u myszy Tg α q*44 w wieku 8 miesięcy, jak i u myszy ApoE/LDLR $-/-$ na wczesnym etapie choroby niedokrwiennej

zaobserwowano brak rezerwy rzutu serca przy stałej zachowanej rezerwie kurczliwości (powierzchniowej frakcji wyrzutowej), sugerujące wpływ zmian relaksacji serca na globalną funkcję lewej komory. Istotny spadek warstwowej objętości wyrzutowej i rzutu serca w grupie myszy Tg α q*44 w wieku 12 miesięcy przy jednoczesnym braku rezerwy powierzchniowej frakcji wyrzutowej wskazują na współistniejące i dominujące zaburzenia funkcji skurczowej serca. Na zaawansowanym etapie niewydolności serca w grupie myszy ApoE/LDLR $-/-$ oraz Tg α q*44 (w wieku 16–18 miesięcy), czynność lewej komory znacznie wzrosła po stymulacji dobutaminą w niskiej dawce (pomimo istotnie obniżonych wartości spoczynkowych) i spadła w odpowiedzi na wysoką dawkę, sugerując istotne upośledzenie perfuzji serca.

Wnioski: W obu badanych modelach wczesne oznaki niewydolności serca uwiadczniane są jedynie w warunkach stymulacji beta-adrenergicznej i wyprzedzają upośledzenie rezerwy inotropowej, co sugeruje wpływ dysfunkcji rozkurczu na wczesne zaburzenia globalnej czynności serca.

Praca współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (projekt nr WND-POIG.01.01.02-00-069/09-00 koordynowany przez Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków — Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics: JCET).

Indeks autorów streszczeń

Bachowski Ryszard	128	Klimek Justyna	136	Pfitzner Roman	137
Baj Zbigniew	131	Knapp Anna	125	Pieśniewska Małgorzata	123, 132
Bereświcz Andrzej	121	Kolanowski Tomasz	139	Pietrucha Artur	117
Białka Szymon	117	Kolsut Piotr	133	Piotrowski Walerian	133
Biezuńska-Kusiak Katarzyna	120	Konduracka Ewa	117	Polus Anna	125
Bissinger Andrzej	131	Konior Anna	121	Puchalska Liana	122
Bonda Tomasz	132, 133	Konovalova Tatiana	125	Ratajczak Mariusz	128, 129
Brudek Magdalena	136	Kopacz Maria	123	Ratajska Anna	118, 119
Brzoska Kamil	133	Korbut Ryszard	117, 122, 123	Rawa Katarzyna	138
Buchner Teodor	135	Korybalska Katarzyna	122	Raźny Urszula	125
Buczko Włodzimierz	118	Kotowski Maciej	129	Rechciński Tomasz	127, 129
Bujak-Gizycka Beata	122	Kowalewski Stanisław	122	Rostow Paweł	117
Burchardt Paweł	127	Kowalówka Adam	128	Rózański Jacek	133
Burzyńska Beata	138	Koźlik Paweł	137	Rozwadowska Natalia	139
Buszman Paweł E.	138	Kramkowski Karol	118	Ruciński Marek	139
Buszman Piotr P.	138	Kruszewski Marcin	133	Rudnicka Wiesława	127
Chlebda Ewa	123, 132	Krzemiński Tadeusz F.	117	Rywik Tomasz	133
Chłopicki Stefan	136, 140	Kubacki Tomasz	127	Saczko Jolanta	120
Chmiela Magdalena	127, 129	Kucia Magda	129	Sadowski Jerzy	128, 130, 131
Choromańska Anna	120	Kulbacka Julita	120	Schmitz Gerd	125
Chwilkowska Agnieszka	120	Kurdziel Marta	140	Seidel Monika	139
Ciesielczyk Katarzyna	126	Kurpesa Małgorzata	127, 129	Sekula Małgorzata	131
Cieślik Grażyna	117	Kurpisz Maciej	139	Sigruener Alexander	125
Cieslik-Guerra Urszula	129	Kustrzycki Wojciech	120	Skolucka Nina	120
Csanyi Gabor	136	Kuś Katarzyna	117	Skórka Tomasz	136, 140
Cudnoch-Jędrzejewska Agnieszka	120	Kuśnierz-Cabala Beata	124	Smorąg Ireneusz	131
Czarnowska Elżbieta	136	Kuźniar Anna	123	Sochanowicz Barbara	133
Czech Urszula	125	Kuźniewski Marek	124	Solnica Bogdan	124
Danko Bożena	133	Lach Michał	139	Sozański Tomasz	123, 132
Deja Marek	134	Lange Dariusz	117	Stachowicz Aneta	122
Dembińska-Kieć Aldona	125	Leszczyńska Agnieszka	118	Stankiewicz Elżbieta	131
Dmitruk Iwona	132	Leszek Przemysław	133	Sternak Magdalena	140
Dobrzyń Agnieszka	134	Lewartowski Bohdan	136	Stępień Ewa	131, 137
Dobrzyń Paweł	134	Liebisch Gerhard	125	Strapagiel Dominik	129
Drukala Justyna	128	Litwiejko-Pietryńczak Elżbieta	135, 136	Sulowicz Władysław	124
Duda Monika	134	Lubiński Andrzej	131	Suski Maciej	122
Dulak Józef	128	Łapińska Urszula	135	Sydzół Marcin	128
Dumański Andrzej	120	Łaskowski Paweł	135, 136	Szafarz Małgorzata	140
Dumnicka Paulina	124	Machaliński Bogusław	129	Szczepańska-Sadowska Ewa	120, 122
Durajski Łukasz	137	Machowska Anna	126	Szeląg Adam	123, 132
Dworowy Sebastian	129	Mackiewicz Urszula	134, 136	Szkudlarek Magdalena	135, 136
Dziemidowicz Magdalena	132, 133	Madej Maria	118, 119	Szmigiel Joanna	126
Dzięcioł Janusz	135, 136	Magdalan Jan	123	Szpak Andrzej	135
Fedak Danuta	124	Makowski Marcin	131	Szperl Małgorzata	133
Fedorowicz Andrzej	136	Malinowski Krzysztof	130	Szymańska Karolina	131
Fereniec-Gołębiowska Lidia	123, 132	Malinowski Marcin	134	Szymura-Oleksiak Joanna	140
Flaht Aleksandra	118, 119	Małecki Maciej	117	Śliwa Agnieszka	125
Frączek Monika	139	Masiarek Konrad	131	Taranta Andrzej	133
Furgała Agata	126	Matusiak Agnieszka	127, 129	Tendera Michał	128, 129
Galicka-Latała Danuta	117	Mazur Piotr	137	Thor Piotr	126
Gofba Krzysztof	134	Mączewski Michał	134	Trocha Małgorzata	123, 132
Góra Monika	138	Merwid-Łąd Anna	123, 132	Trzeciak Bartosz	130
Górska Joanna	125	Michalak Marcin	138	Trzos Ewa	129
Grochal Elżbieta	136	Miękiewski Tomasz	139	Tyrankiewicz Urszula	136, 140
Gruca Anna	125	Milewski Krzysztof	138	Undas Anetta	128, 130
Grudzień Grzegorz	128, 130, 131	Milik Elwira	120	Uznańska Barbara	129
Grycewicz Tomasz	131	Mitręga Katarzyna	117	Varghese Benoy	117
Gutknecht Piotr	130	Mogielnicki Andrzej	118	Waligóra Marcin	137
Hermanowicz Justyna Magdalena	118	Molisz Andrzej	130	Wasilewski Grzegorz	137
Hirnle Tomasz	132	Musiał Włodzimierz	133	Wierzba Tomasz	130
Jabłońska Magdalena	140	Nabiałek Edyta	129	Wiland Ewa	139
Jackiewicz Wanda	138	Namiot Andrzej	135, 136	Winkler Aleksandra	138
Janeczek Agnieszka	139	Natorska Joanna	128, 130	Winnicka Maria M.	132, 133
Janik Łukasz	137	Nessler Jadwiga	117	Witowski Janusz	122
Jankowska Ewa	119	Niemcunowicz-Janica Anna	135, 136	Wojakowski Wojciech	128, 129, 138
Jawień Jacek	117	Niepsuj Anna	123	Woś Stanisław	128, 134
Jelonek Michał	138	Niewiadomska Monika	138	Wsół Agnieszka	122
Kamiński Karol	132, 133, 140	Nowak Ewelina	137	Wypasek Ewa	130
Kapusta Maria	124	Nowicki Rafał	120	Wysocki Henryk	127
Kasprzak Jarosław D.	127, 129	Nożyński Jerzy	117	Zinna Agnieszka	139
Kawka Edyta	122	Oklota Magdalena	135, 136	Zuba-Surma Ewa	128, 129
Kaźmierski Maciej	129	Olszanecki Rafał	122, 123	Żebrowski Jan J.	126
Kieć-Wilk Beata	125	Olszewska Marta	139	Żmudka Krzysztof	131
Kiliszek Marek	138	Opolski Grzegorz	138	Żołądz Jerzy A.	140
Klemenska Emilia	121	Pasowicz Mieczysław	131	Żorniak Michał	117
Klim Beata	135, 136	Petelczyc Monika	126	Żurawski Jakub	127