

Udział tkanki łącznej w gojeniu zawału serca

The role of the connective tissue in healing process in myocardial infarction

Jacek Drobniak, Joanna Ciosek, Lucjusz Jakubowski

Zakład Patofizjologii, Katedra Patofizjologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Abstract

Myocardial infarction is followed by the inflammatory response of mesenchymal tissue leading to the debridement of the necrotic area as well as to initiation of repair followed by scar formation. The healing is a complex sequence of events consisted of four overlapping phases. Repair of the heart is under control of local and systemic regulatory factors. The knowledge of the mechanism of myocardial infarction allows to develop new strategies aimed at minimizing necrotic area and optimizing cardiac repair. This approach gives a chance to reduce the complications of myocardial infarction and to improve the quality of patients life.

Streszczenie

Odczyn zapalny będący konsekwencją zawału serca prowadzi do oczyszczenia obszaru martwicy oraz inicjuje gojenie i tworzenie blizny. Gojenie zawału jest złożonym procesem składającym się z czterech faz. Procesy naprawcze zachodzą pod kontrolą czynników miejscowej i systemowej regulacji (mediatory zapalenia, czynniki wzrostu, układ dokrewny). Poznanie mechanizmów gojenia zawału pozwoli na opracowanie nowych strategii redukujących obszar martwicy i poprawiających gojenie. Pozwoli to na ograniczenie powikłań choroby i poprawę jakości życia pacjentów.

Kardiologia Pol 2005; 63; 4 (Supl. 2): 428-439

Czynniki środowiskowe oraz zaburzenia wewnątrzustrojowe mogą powodować uszkodzenie struktury i funkcji narządów lub tkanek. Procesy naprawcze prowadzą do wypełnienia uszkodzonego miejsca tkanką łączną i powstania blizny, która pozwala na zachowanie integralności uszkodzonego organu, ale jego funkcja nie jest w pełni odtworzona. Przebieg gojenia w układzie krążenia jest w znacznym stopniu uwarunkowany czynnikami lokalnymi i nie jest identyczny we wszystkich jego częściach [1]. Dzięki postępom w leczeniu zawału serca (terapia trombolityczna, leczenie antyarytmiczne) coraz więcej pacjentów przeżywa fazę ostrą zawału serca i wchodzi w okres gojenia, a jest to równoznaczne ze wzrostem częstości powikłań zawału. Poznanie mechanizmów gojenia umożliwi stworzenie nowych metod terapii pozwalających ograniczyć powikłania zawału. Gojenie zawału serca jest procesem złożonym i składa się z czterech nakładających się faz.

Faza uszkodzenia, martwica tkanki

Zahamowanie dopływu krwi powoduje śmierć kardiomiocytów. Już w pierwszych minutach niedokrwienia obserwujemy duży spadek ATP w komórkach i upośledzenie ich kurczliwości. Po ok. 6 godz. następuje uwolnienie z martwych kardiomiocytów markerów zawału serca: troponiny T, kinazy kreatyninowej (izoenzymu CK-MB), transaminazy glutamino-szczawiooctowej (GOT), dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz białka wiążącego kwasy tłuszczowe (FABP – *fatty acid binding protein*). Śmierć kardiomiocytów w obszarze niedokrwionym może przebiegać w mechanizmie apoptozy lub nekrozy. Obecnie uważa się, że apoptoza, określana jako programowana śmierć komórki, pojawia się głównie między 6. a 8. godz. zawału. Natomiast nekrotyczną śmierć komórek stwierdzano między 12. godz. a 4. dobą zawału. Badania przeprowadzone u ludzi zmarłych na zawał poka-

Adres do korespondencji:

Zakład Patofizjologii, Katedra Patofizjologii, Uniwersytet Medyczny, ul. Narutowicza 60, 90-136 Łódź, tel./faks: +48 42 630 61 87, e-mail: drob@bg.am.lodz.pl

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji – grant nr 3P05A 005 24 oraz Uniwersytet Medyczny w Łodzi – grant nr 502-16-266

zały obecność licznych komórek apoptotycznych zlokalizowanych w obwodowej strefie zawału [2]. Eksperymenty na zwierzętach ujawniły, że w centralnym obszarze zawału od 5% do 33% komórek ginie w mechanizmie apoptozy. Głównym czynnikiem powodującym apoptozę w ognisku niedokrwienia jest hipoksja, która zwiększa ekspresję białka p53 [3]. Apoptozie ulega również 0,7% komórek zlokalizowanych poza ogniskiem zawału w nieobjętej niedokrwieniem części mięśnia sercowego. Zjawisko to stwierdzono pomiędzy 3. i 28. dniem. W miejscach tych po śmierci komórek rozpoczyna się włóknienie. Ponadto, stres oksydacyjny po reperfuzji zwiększa ilość komórek apoptotycznych w sercach zwierząt. Doświadczenia przeprowadzone na myszach udowodniły, że 17 β -estradiol hamuje apoptozę kardiomiocytów oraz redukuje obszar zawału. Badania te, obok wielu innych, są próbą stworzenia postępowania terapeutycznego ograniczającego apoptozę w ognisku niedokrwienia.

W ognisku martwicy stosunkowo wcześniej rozpoczyna się degradacja kolagenu. Już 1–3 godz. po podwiązaniu naczyń wieńcowych u szczurów, w niedokrwionej części serca następuje spadek poziomu kolagenu nierozpuszczalnego. Zjawisko to wiąże się ze wzrostem ekspresji metaloproteinaz (MMPs) w obszarze zawału bezpośrednio po podwiązaniu tętnicy wieńcowej. Synteza i aktywacja MMPs jest powodowana przez lokalne i ogólnoustrojowe czynniki regulacyjne, takie jak cytokiny (TNF- α , IL-1), katecholaminy, angiotensyna II i endoteliny. Wzrost aktywności MMPs powoduje, następującą w 2. dobie niedokrwienia, zwiększenie poziomu tkankowego inhibitora metaloproteinaz (TIMPs). Następnie zawartość TIMPs opada, osiągając niskie wartości w 14. dobie zawału. Wczesna ekspansja zawału może być efektem nadmiernego rozkładu białka kolagenowego. Aktywacja MMPs decyduje o prawidłowym przebiegu zapalnej fazy gojenia zawału. U myszy transgenicznym pozbawionych MMP-9 stwierdzono zmniejszony napływ makrofagów do ogniska martwicy i redukcję poziomu kolagenu, ale zmianom tym towarzyszyła znacznie mniejsza ilość pęknięć serca po zawale [4]. Migracja leukocytów, fibroblastów, miofibroblastów i komórek śródbłonna możliwa jest dzięki degradacji macierzy międzykomórkowej obszaru martwicy. Opisany proces zależy nie tylko od metaloproteinaz, ale również od plazminy. W obszarze martwicy u myszy pozbawionych plazminogenu stwierdzono obecność martwych miocytów do 5. tygodnia zawału oraz brak migracji komórek zapalnych, miofibroblastów i komórek śródbłonna, a zawartość kolagenu w ziarninie była zmniejszona. Mimo że liczba komórek w obszarze zawału u myszy pozbawionych plazminogenu była znacznie mniejsza niż w grupie kontrolnej, to jednak ich parametry określające wzrost lub apoptozę nie ulegały zmianie. Stwierdzono również mniejszą aktywność metaloproteinaz MMP-9 i MMP-2 u badanych myszy [5].

Kardiomiocyty są komórkami całkowicie zróżnicowanymi (tzw. postmitotycznymi), dlatego też uważa się, że nie mogą proliferować w uszkodzonym mięśniu sercowym. Powszechnie sądzi się, że podczas procesów naprawczych w sercu tylko komórki niemięśniowe, które zachowały zdolność do podziałów mitotycznych, są odpowiedzialne za wypełnienie uszkodzonej przestrzeni i wytworzenie blizny. Jednakże ostatnie dane sugerują, że miocyty serca mogą powtórnie ulegać podziałom komórkowym i wchodzić w cykl komórkowy. Badania pacjentów zmarłych na zawał serca dowiodły obecności wrzecion kariokinetycznych, kariokinezy i cytokinezy w kardiomiocytach. Zwiększoną ekspresję antygenu jądrowego Ki-67, którego obecność jest dowodem podziałów komórkowych, stwierdzono w 5% miocytów strefy okołozawałowej [6]. Obecne w sercu miocyty proliferujące mogą pochodzić z dwóch źródeł: wielopotentjalnych komórek pnia, których obecność stwierdzono w sercu dorosłych ludzi, myszy i szczurów lub komórek pnia krążących we krwi i osiedlających się w sercu [7]. Uważa się, że komórki macierzyste szpiku mogą osiedlać się w strefie uszkodzenia i różnicować się do miocytów. Zjawisku temu sprzyja SCF (*stem cell factor*) i niektóre cytokiny. Proliferację miocytów sercowych można wywołać eksperymentalnie poprzez manipulacje genetyczne pierwotnych hodowli komórek mięśnia sercowego (wprowadzenie genów dla FGF2, TAG, tsTAG ii) lub dodanie substancji egzogennych do hodowli komórkowej (FGF-1, FGF-2, IGF, EGF, TGF- β , IL-1 β ii). Wywołanie kontrolowanej kardiomiogenezy w sercu dorosłych osobników jest szansą na opracowanie nowej metody leczenia zawału serca.

Odczyn zapalny

Zapalenie jest określane jako miejscowy proces obronny obejmujący zmiany w mikrokrążeniu oraz reakcje komórek mezenchymy. Odczyn zapalny spowodowany niedokrwieniem mięśnia sercowego rozpoczyna się od aktywacji układu dopełniacza, uwolnienia wolnych rodników oraz cytokin. Kardiolipina oraz białka mitochondrialne pochodzące z martwych kardiomiocytów mogą aktywować układ dopełniacza. Nie wiadomo, który z mechanizmów aktywacji układu dopełniacza (drogi klasyczna, properdynowa i lektynowa) ma podstawowe znaczenie w inicjacji odpowiedzi zapalnej podczas zawału serca. Natomiast w doświadczalnym niedokrwieniu serca i reperfuzji stwierdzono dominację lektynowej drogi aktywacji układu dopełniacza. Zablokowanie aktywacji układu dopełniacza w doświadczalnym zamknięciu tętnicy wieńcowej zwierząt zmniejszyło obszar zawału mięśnia sercowego [8]. Składniki dopełniacza są chemoatraktantami dla leukocytów. Aktywność chemotaktyczna chłonki pobranej z niedokrwionego serca jest hamowana przez przeciwciała skierowane przeciw składnikowi C5a dopełniacza [9].

Wolne rodniki tlenowe (ROS) mogą powstawać w obszarze niedokrwionym podczas rozwoju reakcji zapalnej oraz reperfuzji mięśnia sercowego. Wolne rodniki tlenowe są odpowiedzialne za uszkodzenie kardiomiocytów, komórek śródbłonna oraz potencjalizację procesu zapalnego toczącego się w niedokrwionym sercu (pobudzają sekrecję cytokin, działają chemotaktycznie dla leukocytów, powodują aktywację układu dopełniacza, zwiększają ekspresję selektyny P, pobudzają syntezę chemokin oraz zwiększają zdolność wiązania neutrofilii). Uszkodzenia wywołane przez wolne rodniki pojawiają się już w ciągu 40 min trwania reperfuzji. Doświadczenia przeprowadzone na psach pokazały, że podanie enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy) zmniejszało stopień uszkodzenia serca i obszar zawału tylko wówczas, kiedy substancje te zostały podane odpowiednio wcześniej (15 min przed udrożnieniem naczynia wieńcowego). Infuzja obydwu substancji w 40 min reperfuzji nie miała żadnego znaczenia leczniczego [10]. U myszy transgenicznych z nadekspresją zależnej od miedzi i cynku dysmutazy ponadtlenkowej stwierdzono mniejsze uszkodzenie serca spowodowane przez niedokrwienie w porównaniu z kontrolą [11]. Zastosowanie rekombinowanej dysmutazy ponadtlenkowej u pacjentów z zawałem serca leczonych trombolitycznie lub za pomocą angioplastyki wieńcowej nie udowodniło wpływu antyoksydantów na poprawę funkcji lewej komory [12]. Różne wnioski wypływające z prac doświadczalnych i klinicznych można tłumaczyć większym prawdopodobieństwem zaistnienia zmian nieodwracalnych u ludzi, u których niedokrwienie trwa dłużej i nie może być precyzyjnie kontrolowane jak w modelach doświadczalnych na zwierzętach. W badaniach *in vitro* udowodniono również, że podanie melatoniny podczas reperfuzji znacząco zmniejszało poziom wolnych rodników w sercu oraz hamowało apoptozę komórek mięśniowych serca [13]. Ponadto hormon ten redukował częstość arytmii podczas reperfuzji. Zjawisko to można wytłumaczyć antyoksydacyjnym działaniem hormonu szyszynki oraz pobudzeniem aktywności antyoksydantów przez melatoninę. Warto wspomnieć, że niektóre leki (β -blokery, blokery kanałów wapniowych, benzodiazepiny oraz niesterydowe leki przeciwzapalne) zmniejszają stężenie endogennej melatoniny.

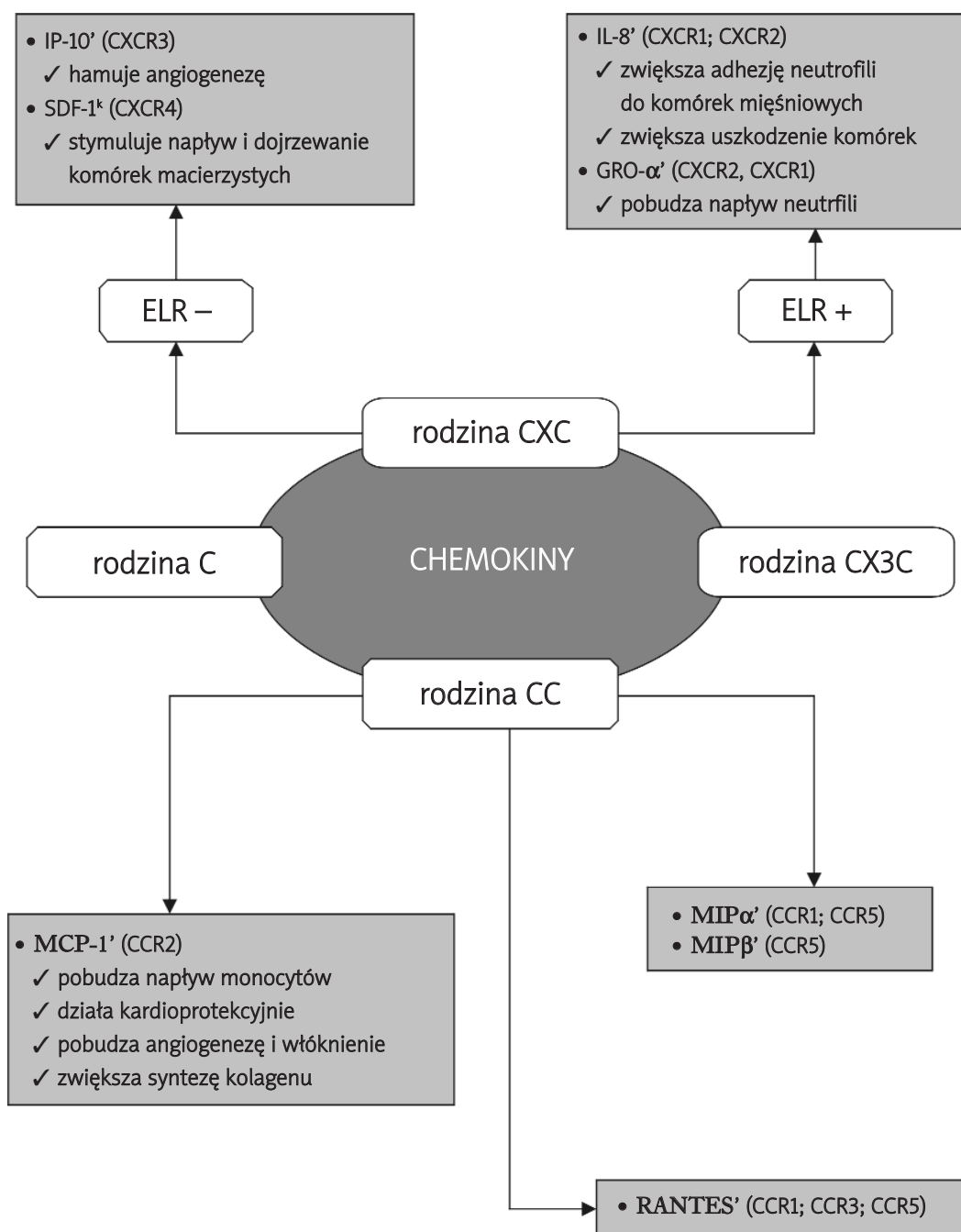
Odpowiedź zapalna komórki jest regulowana na poziomie genomu przez czynniki transkrypcyjne, takie jak $\text{NF-}\kappa\text{B}$. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ jest grupą białek wpływających na ekspresję genów odpowiedzialnych za procesy zapalne, wzrostowe oraz adhezji. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ połączony jest z $\text{I}\kappa\text{B}$ w nieaktywny kompleks, który dopiero po pobudzeniu komórki (wolne rodniki, cytokiny) ulega rozpadowi. W efekcie tego, aktywny $\text{NF-}\kappa\text{B}$ przemieszcza się z cytoplazmy do jądra, łącząc się z promotorem genu docelowego i aktywując jego transkrypcję. Aktywację $\text{NF-}\kappa\text{B}$

w zawałe serca potwierdzono eksperymentalnie [14]. Natomiast zahamowanie czynnika transkrypcyjnego podczas niedokrwienia i reperfuzji redukowało odpowiedź zapalną i zmniejszało obszar zawału serca [15].

Istotnym źródłem mediatorów zapalenia, chemokin i czynników wzrostu w niedokrwionym mięśniu sercowym są komórki tuczne. Postuluje się, że czynnikami odpowiedzialnymi za degranulację mastocytów w niedokrwionym sercu są wolne rodniki tlenowe, adenozylna i element układu dopełniacza C5a. W badaniach histologicznych udowodniono gwałtowną degranulację komórek tucznych w obszarze niedokrwienia. W chłonce zebranej z serca psów, u których wywołano niedokrwienie i reperfuzję, ujawniono, po okresie niedokrwienia, istotny wzrost histaminy i $\text{TNF-}\alpha$. Uwolniony z mastocytów $\text{TNF-}\alpha$ pobudza syntezę IL-6 w komórkach jednojądrzastych. Przeciwciało blokujące $\text{TNF-}\alpha$ hamuje wzrost IL-6 w obszarze niedokrwienia, a u myszy z deficytem $\text{TNF-}\alpha$ stwierdzono mniejszą ekspresję chemokin i czynników adhezji [16]. Ponadto, u myszy transgenicznych pozbawionych receptorów dla $\text{TNF-}\alpha$ (TNFR1/TNFR2), u których podwiązano tętnicę wieńcową, wykazano znacznie większy obszar zawału i wzrost liczby apoptotycznych miocytów w porównaniu z grupą kontrolną. Doświadczenia te pokazują ochronny wpływ $\text{TNF-}\alpha$ w niedokrwionym sercu [17]. Mediatory zapalenia wydzielane z komórek tucznych biorą również istotny udział w inicjacji i regulacji procesów gojenia. Dąbrowski i wsp. w badaniach ran skórnych stwierdzili, że stabilizatory komórek tucznych hamują gojenie ran i zmniejszają poziom kolagenu w ziarninie [18]. Histamina, działając poprzez receptory H_2 , pobudza gojenie ran i kolagenogenezę [19].

Dopełniacz, wolne rodniki, $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{NF-}\kappa\text{B}$ są odpowiedzialne za wzrost ekspresji chemokin w niedokrwionym sercu (Rycina 1.). Chemotaktyczne cytokiny działają przez receptory błonowe sprzężone z białkiem G. Mają wpływ na regulację angiogenezy, napływ leukocytów, gojenie zawału serca oraz uczestniczą w przebudowie nieobjętej zawałem części mięśnia sercowego [20]. Chemokiny z podrodziny CXC posiadające sekwencję aminokwasów ELR wykazują właściwości chemotaktyczne dla neutrofilii. W eksperymentalnym zawałe serca stwierdzono wzrost syntezy IL-8 (Interleukina -8) i $\text{GRO-}\alpha$ (*growth related oncogene*). IL-8 zwiększa przyleganie neutrofilii do izolowanych komórek mięśniowych, a komórki zapalne powodują efekt cytotoksyczny. Natomiast doświadczalne blokowanie działania IL-8 zmniejszało martwicę komórek w sercu poddanym niedokrwieniu i reperfuzji, ale nie wpływało na infiltrację neutrofilii do pola martwicy.

Chemokiny z grupy CXC (ELR-) określane są jako czynniki angiostatyczne. W modelu doświadczalnym niedokrwienia z reperfuzją stwierdzono wzrost zawartości IP-10 (*Interferon- γ inducible Protein 10*) – znanego czynni-



Rycina 1. Chemokiny (chemotaktyczne cytokiny) są grupą białek zasadowych o masach cząsteczkowych od 8 do 14 kDa i zbliżonej strukturze trzeciorzędowej. Posiadają one przeważnie 4 cysteiny tworzące dwa mostki dwusiarczkowe. W oparciu o liczbę aminokwasów pomiędzy dwoma cysteinami chemokiny podzielono na rodziny. W rodzinie chemokin CXC są wyróżnione 2 podrodziny w zależności od obecności w amino-końcowej części cząsteczki trójaminokwasowego motywu kwas glutaminowy-leucyna-arginina (ELR). Uważa się, że obecność (ELR+) lub brak sekwencji (ELR-) ma istotny wpływ na działanie chemokiny. Rysunek przedstawia podział chemokin, których obecność i zadania, jakie spełniają w zawałe serca, zostały doświadczalnie potwierdzone. (I – synteza chemokiny indukowana, K – konstytutywny charakter wydzielania chemokiny, w nawiasach podano symbole receptorów dla danej chemokiny). Grafika: T. Staszewska.

ka angiostatycznego. Przypuszcza się, że czynnik ten ma za zadanie opóźnić angiogenezę do momentu zakończenia oczyszczania rany z fragmentów martwych komórek. Natomiast poziom mRNA dla IP-10 spada w ciągu 24 godz. od momentu rozpoczęcia reperfuzji. SDF-1 (*Stromal Derived Factor-1*) to chemokina z tej samej grupy charakteryzująca się wpływem na angiogenezę oraz komórki pnia, której obecność stwierdzono w obszarze zawału serca u szczura. Rola SDF-1 prawdopodobnie wiąże się z regulacją napływu komórek pnia do pola martwicy. W eksperymentalnym zawału serca stwierdzono również wzrost poziomu chemokin z grupy CC tzn. MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), RANTES (*Regulated Upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*), MIP (*Macrophage Inflammatory Protein*).

Napływ komórek zapalnych do miejsca zawału jest istotnym celem procesu zapalnego. Udowodniono, że nieobecność neutrofilów w ranie powoduje zwiększenie poziomu infekcji, lecz nie zmienia tempa gojenia. Natomiast brak monocytów/makrofagów lub limfocytów znacząco opóźniają procesy reparacyjne ran skórnych (Rycina 2.).

Badania ostatnich lat pokazują istotną rolę chemokin w regulacji napływu komórek zapalnych do obszaru martwicy (IL-8, IP-10, MCP-1). Jako pierwsze do miejsca zawału przedostają się neutrofile, za których napływ odpowiedzialne są: IL-8, leukotrieny, PAF (*Platelet Activating Factor*), układ dopełniacza. Obecność neutrofilów może upośledzać reperfuzję w obszarze niedokrwionym (*no reflow phenomenon*). Udowodniono również, że komórki te przylegają do kardiomiocytów, a wydzielane przez nie wolne rodniki i proteazy wywołują efekt cytotoksyczny. Napływ monocytów do obszaru gojenia odbywa się pod wpływem: MCP-1, C5a, TGF- β . Komórki te ulegają transformacji do makrofagów pod wpływem M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*). MCP-1 pobudza limfocyty T do uwalniania IL-10, cytokiny odpowiedzialnej za przebudowę istoty międzykomórkowej podczas gojenia. Monocyty i limfocyty T są źródłem czynników wzrostu i cytokin przyspieszających gojenie.

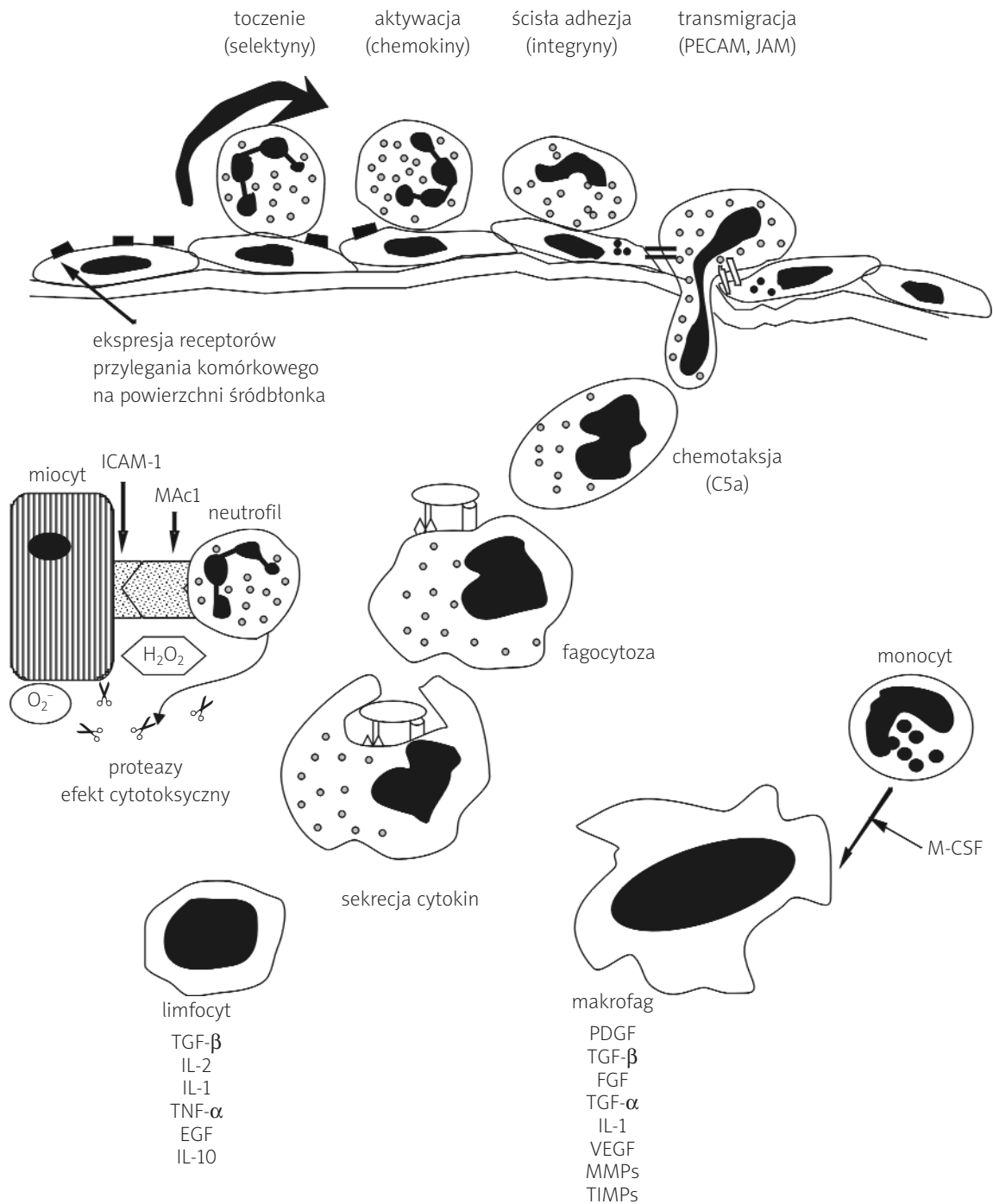
Proliferacja komórek i synteza macierzy międzykomórkowej

Zapalenie ma na celu uprzątnięcie martwych komórek i wytworzenie pierwotnego medium, w którym zachodzić będą procesy reparacyjne. W fazie zapalnej gojenie jest zahamowane. IL-10, wydzielana przez limfocyty i pobudzane endotoksyną monocytów, jest mediatorem sygnalizującym zakończenie fazy zapalnej i rozpoczęcie reparacji. Głównym jej źródłem w miejscu zawału mięśnia sercowego u psów są limfocyty CD5 [21]. IL-10 powoduje wzrost syntezy metaloproteinaz i tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP). W monocytach pobranych z chłonki niedokrwionego serca stwierdzono wzrost po-

ziomu mRNA dla TIMP. Zjawisko to nie było widoczne u zwierząt, którym podano przeciwciała skierowane przeciwko IL-10 [22]. Ponadto IL-10 pobudza proces angiogenezy. IL-10, hamując wydzielanie prozapalnych cytokin, redukuje odczyn zapalny i zmniejsza obszar martwicy. W zawału u myszy pozbawionych możliwości syntezy IL-10 stwierdzono większy niż w kontroli odczyn zapalny związany ze wzrostem napływu neutrofilów do miejsca zawału, wzrost poziomu TNF- α i ICAM-1 [23]. Podobną rolę spełnia TGF- β , hamując ekspresję chemokin [24] oraz aktywując geny odpowiedzialne za regulację włóknienia.

Komórki tuczne są istotnym źródłem mediatorów zapalenia, będących również regulatorami procesów reparacyjnych. Pobudzające działanie histaminy na proliferację fibroblastów i syntezę kolagenu stwierdzono *in vitro* [25]. Inne mediatory pochodzące z mastocytów, np.: heparyna, prostaglandyny, czynniki wzrostu, również wpływają na procesy tworzenia tkanki łącznej ziarnistej i angiogenezę. W sercu niedokrwionym z następującą reperfuzją znaleziono dużą liczbę komórek tucznych zwłaszcza w miejscach, gdzie martwe miocyty były zastępowane tkanką łączną ziarnistą. Nie stwierdzono natomiast proliferacji mastocytów w gojącym się sercu [26]. Komórki tuczne obecne w obszarze gojenia pochodzą z komórek hematopoetycznych pnia CD34+. Niedojrzałe prekursorzy mastocytów krążą we krwi, skąd przechodzą do obszaru gojenia pod wpływem SCF. Wzrost poziomu mRNA dla SCF stwierdzono podczas niedokrwienia i reperfuzji mięśnia sercowego [26].

Hipoksja, kwasica oraz wysoki poziom kwasu mlekowego pojawiające się w ognisku niedokrwienia stanowią impuls do neoangiogenezy. Szczególną rolę przypisuje się hipoksji. Sensorem poziomu tlenu jest w komórce hydroksylaza prolinowa i asparaginowa. Wspomniane enzymy kontrolują ekspresję HIF-1 oraz HIF-2, czynników transkrypcyjnych, których synteza jest pobudzana przez niedotlenienie. Czynniki HIF zwiększają ekspresję VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), który pobudza tworzenie naczyń. Badanie wykonane na niedokrwionym sercu poddanych reperfuzji pokazało, że mimo warunków sprzyjających angiogenezie, tworzenie naczyń ulega opóźnieniu i rozpoczyna się dopiero po 24 godz. od momentu rozpoczęcia reperfuzji. Badania eksperymentalne pokazały, że w okresie niedokrwienia zwiększa się poziom TGF- α , który pobudza ekspresję genu dla IP-10. Wzrost poziomu mRNA dla działającego angiostatycznie IP-10 już w pierwszych godzinach reperfuzji został udowodniony doświadczalnie. Dopiero po 24 godz. następuje spadek stężenia IP-10. Frangogianis [24] uważa, że wzrost angiogenezy w tym czasie wiąże się z przewagą VEGF i IL-8 (Rycina 3.). Hamowanie ekspresji czynników angiostatycznych powodowane jest również przez TGF- β . Podczas gojenia zawału serca obok angiogenezy zachodzi również neowaskulo-



Rycina 2. Głównym celem zapalenia jest dostarczenie komórek zapalnych do miejsca uszkodzenia. Emigracja komórek do obszaru zapalenia jest procesem wieloetapowym poprzedzonym przez aktywację śródbłonna przez mediatory zapalenia. Badania anatomopatologiczne udowodniły, że do obszaru objętego zawałem napływają leukocyty wielojądrzaste, monocyty/makrofagi i limfocyty. Komórki te fagocytują uszkodzone lub martwe miocyty, mogą wywierać efekt cytotoksyczny oraz wydzielają czynniki regulujące reakcję zapalną i gojenie. (ICAM-1 – *Intercellular Adhesion Molecule-1*, Mac1 – integryna CD11b/CD18, PECAM – *Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule*, JAM – *Junctional Adhesion Molecule*). Pozostałe objaśnienia w tekście. Grafika: T. Staszewska.

geneza inicjowana przez napływające i różnicujące się do komórek śródbłonna komórki macierzyste [27].

Podczas gojenia zawału z otaczającej ognisko niedokrwienia zdrowej tkanki napływają fibroblasty. W tkance łącznej ziarnistej, powstającej podczas gojenia zawału serca spotykane są natomiast miofibroblasty (*fibroblast-like cell*), komórki pochodzenia mezenchymatycznego posiadające cechy fenotypowe charakterystyczne dla fibroblastów oraz komórek mięśniowych. Identyfikacja miofibroblastów możliwa jest za pomocą mikroskopii elektronowej (wrzecionowaty kształt, bogate retikulum endoplazmatyczne granularne, miofilamenty oraz obecność na powierzchni komórki substancji przypominającej błonę podstawną) oraz testów immunologicznych (obecność α -aktyny i wimentyny oraz brak miozyny, kalponiny i desminy). Miofibroblasty pojawiają się w bliźnie u człowieka 4–6 dni po zawale i są one głównym źródłem kolagenu. W ranach skórnych komórki te ulegają apoptozie w 4.–6. tygodniu gojenia, natomiast w bliźnie pozawałowej spotykano je nawet po 17–20 latach. Nasze doświadczenia wskazują również, że komórki izolowane z blizny pozawałowej do celów hodowli *in vitro* są miofibroblastami, charakteryzującymi się znacznie bardziej aktywnym metabolizmem niż komórki pochodzące ze zdrowego mięśnia sercowego. Obecnie wiadomo, że napływające do rany fibroblasty ulegają, pod wpływem TGF- β 1, transformacji fenotypowej do miofibroblastów [28]. Dodanie TGF- β 1 do hodowli fibroblastów, pobranych z serca, powodowało trwały wzrost syntezy kolagenu w hodowli. Efekt ten wiązał się z inicjowaniem przemiany fenotypowej fibroblastów do miofibroblastów, które charakteryzują się znacznie szybszą syntezą tego białka (Rycina 3.). Przemiana fenotypowa badanych komórek była nieodwracalna, a TGF- β 1 nie wpływał na stopień syntezy tego białka po transformacji.

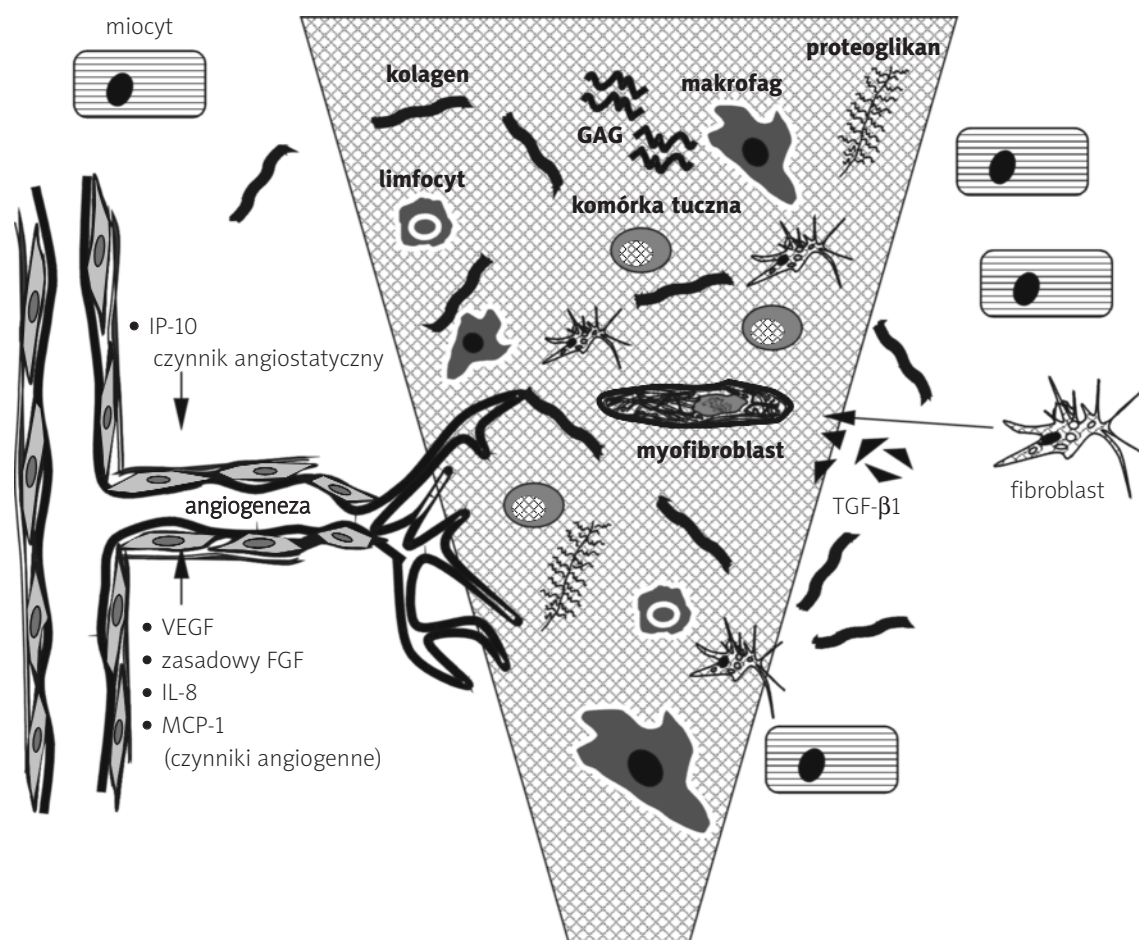
Orientacja przestrzenna komórek napływających do obszaru gojenia jest kontrolowana przez aparat genetyczny komórki, a jej zaburzenie może powodować wystąpienie powikłań zawału, np. niewydolność serca, rozstrzeń komory, pęknięcie serca. Blankenteijn i wsp. zidentyfikowali gen *rfz2* odpowiedzialny za kontrolę orientacji przestrzennej komórek w bliźnie po zawale serca [29]. Największą ekspresję genu *rfz2* stwierdzono w miofibroblastach w 2. tygodniu po zawale. Zauważono również, że zwiększona ekspresja genu występowała tylko podczas migracji komórek, natomiast po zatrzymaniu się komórki i utworzeniu w ranie struktur równoległych podobnych do tych, jakie spotyka się w bliznach dojrzałych, białko *rfz2* powraca do poziomu podstawowego. Podobne zmiany stwierdzono w przypadku *dvl-1*. Białka kodowane przez gen *rfz2* zostały zidentyfikowane jako receptory dla rodziny białek Wnt. Pobudzenie receptora (*rfz2*) przez białko Wnt powoduje hamowanie, za pośrednictwem przekaźnika *dvl-1*, aktywności 3β -ki-

nazy syntetazy glikogenu (GSK3 β). Kinaza ta jest odpowiedzialna za fosforyzację β -kateniny, a jej zahamowanie blokuje degradację β -kateniny i powoduje wzrost jej poziomu w komórce. β -katenina razem z VE kadheryną jest odpowiedzialna za przyleganie komórek [30].

Napływające do rany miofibroblasty rozpoczynają syntezę składników macierzy pozakomórkowej, którymi są: 1) białka włókniste (kolagen i elastyna) spełniające funkcje strukturalne oraz białka adhezyjne (fibronektyna i laminina), 2) proteoglikany (PG) złożone z polisacharydowych łańcuchów kowalencyjnie połączonych z rdzeniem białkowym. Związki te są odpowiedzialne za wytworzenie odpowiedniej struktury macierzy pozakomórkowej, która wpływa na czynność komórek.

Cząsteczki kolagenu są zbudowane z 3 łańcuchów polipeptydowych skręconych wokół siebie. Istotnym etapem syntezy kolagenu są modyfikacje posttranslacyjne (glikozylacja i hydroksylacja), które mają ważne znaczenie dla zapewnienia właściwości białka. Warunkiem hydroksylacji jest odpowiednia sekwencja hydrolizowanego łańcucha. W przykładowym łańcuchu -x-pro-gly- aminokwas w pozycji x decyduje o hydroksylacji proliny. Przedwczesne wytworzenie potrójnej helisy uniemożliwia hydroksylację. Natomiast szybkość hydroksylacji decyduje o tempie tworzenia potrójnej spirali. Zmniejszenie ilości hydroksyproliny o 20% powoduje obniżenie temperatury topnienia kolagenu poniżej 37°C i świadczy o obniżeniu stabilności białka, podwyższeniu jego podatności na proteolizę i zmniejszeniu jego powinowactwa do innych składników macierzy międzykomórkowej. Hydroksyprolina jest aminokwasem charakterystycznym dla kolagenu, toteż zawartość kolagenu całkowitego w tkance może być oznaczona na podstawie określenia ilości tego aminokwasu. Angiotensyna, działając przez receptory AT1, zwiększa ekspresję hydroksylazy prolinowej w sercu. Nadmierna glikozylacja białka hamuje jego rozpad i sprzyja jego gromadzeniu. Właściwości mechaniczne zależą nie tylko od ilości białka, ale również jego polimeryzacji tzn. wytworzenia wiązań krzyżowych między cząsteczkami kolagenu i formowania włókien. Młody kolagen ulega polimeryzacji, dając dojrzałe włókno zapewniające ranie odpowiednią wytrzymałość mechaniczną (Rycina 4.).

Wzrost poziomu mRNA dla kolagenu u królika jest widoczny 2 dni po zawale, a pierwsze cząsteczki białka są obecne w 3. dniu gojenia. Dojrzałe włókna kolagenowe stwierdza się dopiero w 7. dniu zawału. We wczesnym etapie gojenia dominuje kolagen typu III, którego szczyt stwierdzono między 11. a 28. dniem po zawale, natomiast najwyższy poziom kolagenu typu I obserwowano między 21. a 28. dniem gojenia. Obydwa białka występują w postaci włókien, a ich obecność gwarantuje utrzymanie odpowiednich parametrów mechanicznych blizny. Przewaga typu I kolagenu nad typem III skorelowana jest z większą odpornością



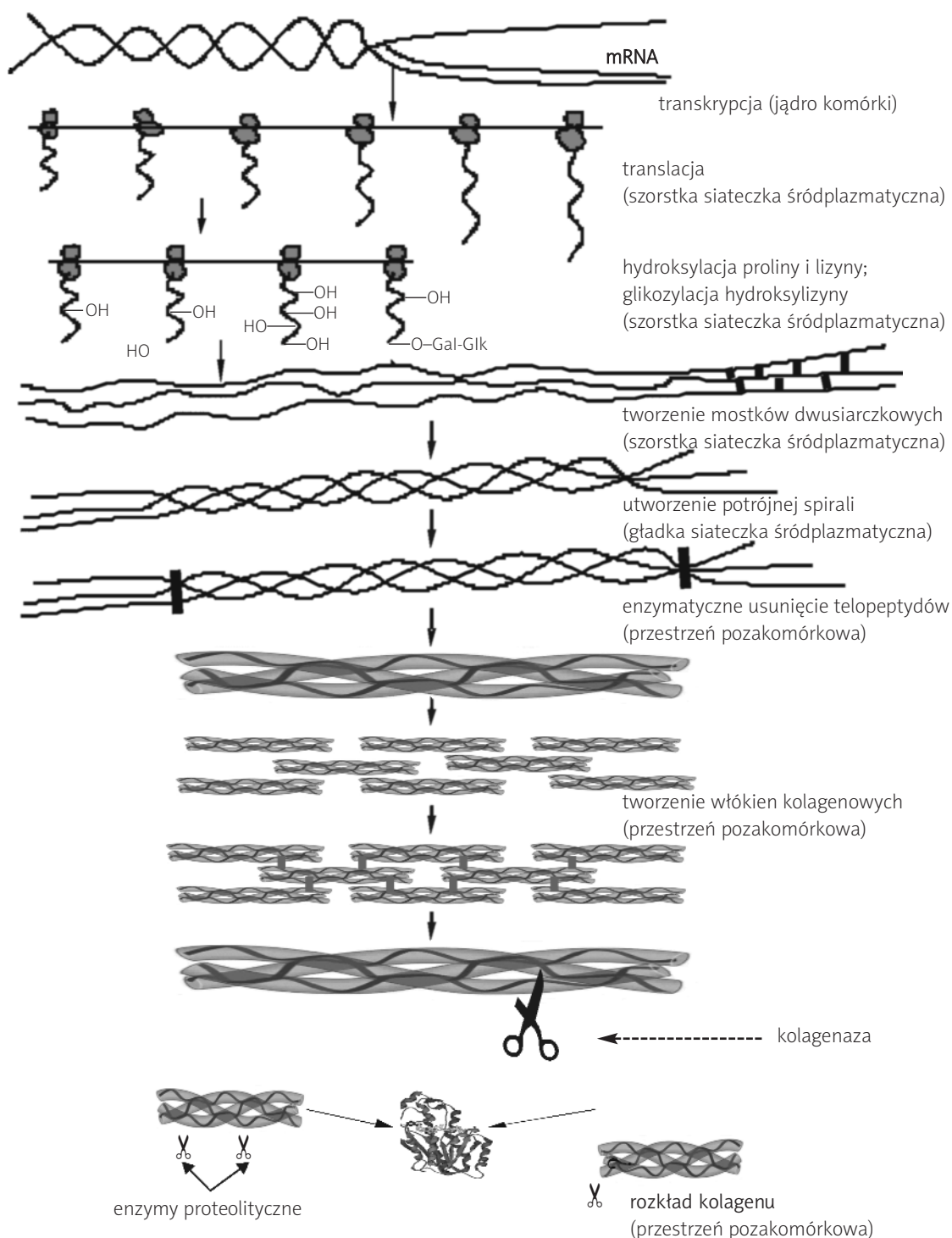
Rycina 3. Tworzenie tkanki łącznej ziarnistej w polu martwicy mięśnia sercowego. Okres ten charakteryzuje się napływem do rany: monocytów/makrofagów, limfocytów i komórek tucznych, będących źródłem cytokin i mediatorów regulujących proliferację, migrację komórek, syntezę istoty międzykomórkowej i angiogenezę. Ponadto, w ranie rozpoczyna się neoangiogeneza zależna od równowagi między czynnikami angiogennymi i angiostatycznymi. Do obszaru zawału napływają również fibroblasty ulegające transformacji do miofibroblastów, które są głównym źródłem kolagenu i innych elementów istoty międzykomórkowej.

blizny na rozciąganie. Natomiast obecność kolagenu typu IV stwierdzano już po 3. dniu gojenia ze szczytem pomiędzy 7. a 11. dniem. Później zawartość tego białka spada. Kolagen typu IV nie formuje włókien, a jego funkcja polega na tworzeniu podścieliska dla komórek. Zawartość kolagenu całkowitego rośnie podczas kilku tygodni gojenia. Po 4 tygodniach reparacji poziom kolagenu w bliźnie jest 5 razy większy w porównaniu z pozostałą częścią serca.

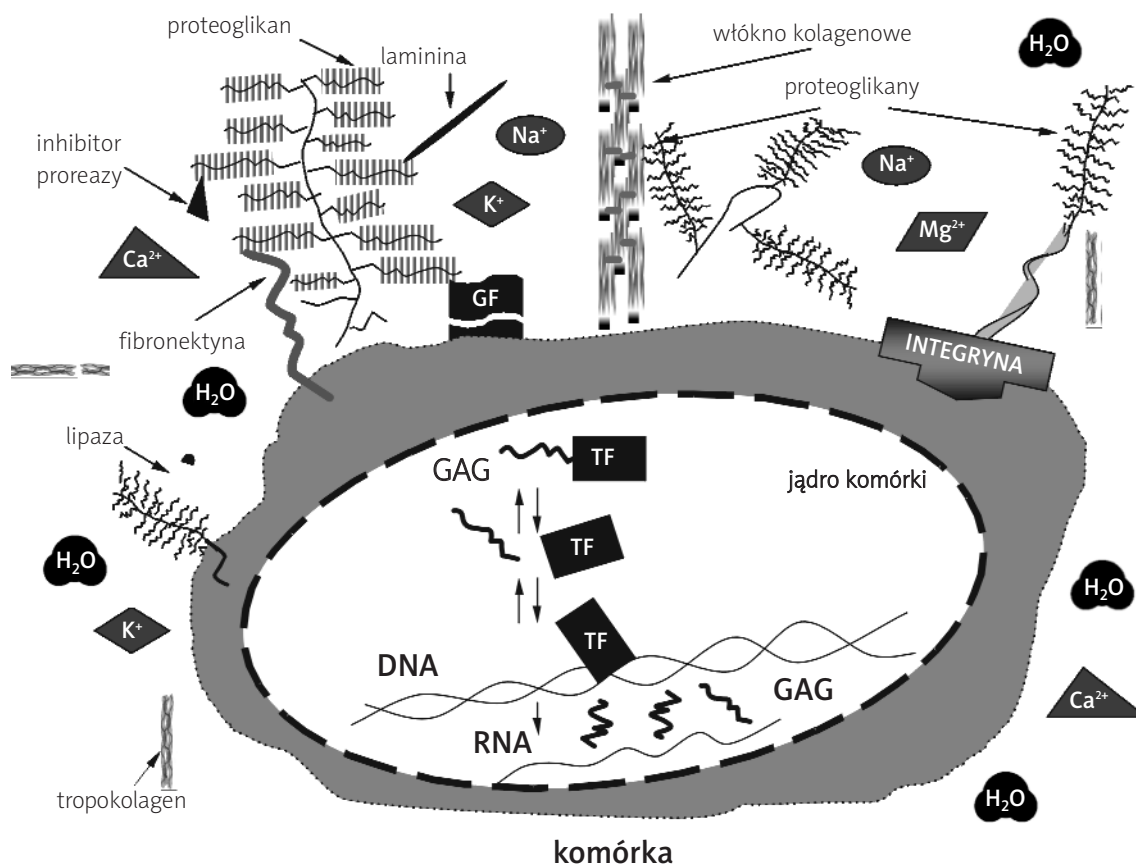
Synteza kolagenu kontrolowana jest przez miejscowe i ogólnoustrojowe układy regulacji. TGF-β1 nie tylko powoduje transformację fibroblastów, ale nasila też ekspresję czynnika CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*). CTGF, którego zawartość zwiększa się w zawałe u szczurów, pobudza syntezę kolagenu typu I, fibronektyny

i zwiększa ekspresję integrzyn w fibroblastach. Czynnikiem ten, określany jako marker włóknienia w sercu, jest prawdopodobnie wydzielany przez miofibroblasty. Ponadto inne czynniki wzrostu, takie jak PDGF, EGF, TGF-α, bFGF, IGF zwiększają poziom kolagenu w tkance. Natomiast zawartość tego białka jest obniżana przez TNF-α.

Poziom mRNA dla angiotensynogenu i reniny w sercu wzrasta już we wczesnym okresie zawału. Ponadto w miejscu zawału zawartość ACE i angiotensyny II wielokrotnie przekracza poziom spotykany w zdrowych tkankach, a gęstość receptorów AT1 jest również większa. W hodowlach miofibroblastów i gojącym się zawałe serca, angiotensyna II zwiększa ekspresję TGF-β1, zmniejsza aktywność MMP-1 i podwyższa syntezę TIMP-1. Podanie inhibitorów ACE lub zablokowanie re-



Rycina 4. Synteza kolagenu. Szczególne znaczenie dla zapewnienia odpowiednich właściwości białka ma hydroksylacja lizyny i proliny, katalizowana przez hydroksylazy prolinową i lizynową (w obecności tlenu, Fe^{2+} , α -ketoglutaranu i kwasu askorbinowego). Glikozylacja polega na przekształceniu reszt hydroksylizynowych do galaktozylohydroksylizyny i glikozylohydroksylizyny. Na zewnątrz komórki następuje odcięcie telopeptydów od cząsteczki kolagenu. Wytrzymałość mechaniczna białka zależy od ilości wytworzonych wiązań krzyżowych. Proces ten jest katalizowany przez oksydazę lizynową w obecności Cu^{2+} . Grafika: T. Staszewska.



Rycina 5. Glikozaaminoglikany (GAG) łączą się z białkami rdzeniowymi, tworząc proteoglikany (PG). PG stabilizują włókna kolagenowe, czyniąc je mniej podatnymi na proteolizę. Ponadto, GAG zapewniają odpowiednie uwodnienie tkanki, a także mogą łączyć się z lipazą, czynnikami wzrostu, inhibitorami proteaz, jonami metali oraz białkami adhezyjnymi (lamininą i fibronektyną), wpływając w ten sposób na środowisko międzykomórkowe i czynność komórek. Działanie heparynazy może np. uwalniać czynnik wzrostu (GF), umożliwiając jego kontakt z receptorem i zainicjowanie proliferacji. GAG, wiążąc się z czynnikami transkrypcyjnymi (TF), mogą regulować ekspresję genów oraz stabilizować mRNA. Grafika: T. Staszewska.

ceptorów AT1 obniża zawartość hydroksyprowliny w bliźnie u zwierząt doświadczalnych. Efekt ten może być również zależny od bradykininy, która obniża poziom kolagenu i zmniejsza wytrzymałość mechaniczną blizny.

Prace Fraccarollo i wsp. pokazały udział endoteliny w regulacji włóknienia w polu zawału. Endotelina ma działanie mitogenne na fibroblasty, zwiększa syntezę kolagenu typu I i III oraz hamuje aktywność kolagenolityczną. Endotelina poprzez receptory Et_A zwiększa akumulację kolagenu w obszarze zawału, przyspieszając jego gojenie. Natomiast zablokowanie receptora Et_A powodowało obniżenie ekspresji genów dla I i III typu kolagenu, TGF- β 1 oraz zwiększenie aktywności metaloproteinaz. Obniżenie zawartości kolagenu w bliźnie było prawdopodobnie przyczyną większej ekspansji zawału. [31].

Hormon wzrostu zwiększa zawartość kolagenu w bliźnie i obniża częstość występowania tętniaków serca.

Podwyższenie zawartości kolagenu w bliźnie obserwowano po wieczornym podaniu melatoniny, natomiast chirurgiczna lub farmakologiczna (wieczorne podanie metoprololu) pinealektomia wywierała efekt przeciwny. Podawanie melatoniny pinealektomizowanym szczurom normalizowało zawartość kolagenu w ziarninie. Hormon ten zwiększał poziom białka kolagenowego w hodowlach miofibroblastów izolowanych z blizny pozawałowej. Przedstawione dowody świadczą o regulacyjnym wpływie melatoniny na zawartość białka kolagenowego w bliźnie zawałowej.

Katecholaminy i glikokortykoidy zmniejszają syntezę białka kolagenowego w ranach. Katastrofalne wyniki prób leczenia zawału metyloprednizolonem wiążą się

z hamowaniem syntezy kolagenu przez zastosowany lek. Cukrzyca również opóźnia gojenie zawału serca.

Elastyna to białko, które nadaje bliznie sprężystość, odporność na rozerwanie oraz zapewnia odpowiedni układ przestrzenny w ranie. Zwiększona ekspresja elastyny w ranie zwierząt transgenicznych powoduje ograniczenie ekspansji zawału, zmniejsza objętość komory i poprawia parametry hemodynamiczne serca [32].

Glikoaminoglikany (GAG), heteropolisacharydy liniowe, pojawiają się w obszarze zawału jeszcze przed rozpoczęciem syntezy kolagenu (Rycina 5.). Poziom GAG w bliznie i pozostałej części lewej komory ulega zmianom w trakcie gojenia zawału. Zawartość GAG w sercu zwiększała się, uzyskując maksymalny poziom w 6. tygodniu po zawale, a w bliznie była wtedy 40 razy większa niż w sercu przed zawalem. Dopiero w 12. tygodniu poziom GAG osiągał najniższe wartości. Podwiązanie tętnicy wieńcowej nie powodowało zmian poziomu GAG w mięśniu prawej komory oraz w skórze zwierząt podczas całego przebiegu doświadczenia. Można zatem sądzić, że mechanizm powodujący czasowy wzrost zawartości GAG w bliznie, w mięśniu lewej komory i przegrodzie ma charakter lokalny i nie jest uwarunkowany procesami regulacyjnymi o charakterze ogólnoustrojowym [33]. Zwiększenie poziomu mRNA dla białek rdzeniowych różnych proteoglikanów (biglikanu, fibroglikanu, syndekanu-1 i 4) obserwowano już 2. dnia zawału, a jego normalizacja następowała w 42. dniu. Wzrost syntezy białek rdzeniowych proteoglikanów obserwowano głównie do 4 tygodni po zawale, a następnie ich zawartość powracała do normy. Stężenie syndekanu we krwi pacjentów wzrastało w 2.–3. tygodniu zawału.

Fibronektyna jest glikoproteiną odpowiedzialną za łączenie komórek z otaczającą je istotą pozakomórkową oraz wpływającą na wzrost i migrację komórek. Poziom mRNA dla fibronektyny i osteopontyny oraz zawartość wymienionych białek była znacząco podwyższona w obszarze zawału w stosunku do innych części serca. Głównym źródłem obu białek są miofibroblasty [34]. Połączenia osteopontyny z fibronektyną są odpowiedzialne za stabilizację i organizację macierzy pozakomórkowej. Podczas zamknięcia tętnicy wieńcowej następuje również wzrost ekspresji genów dla lamininy.

Przebudowa i obkurczanie się blizny

Już 2–3 tyg. po zawale obserwujemy wyraźną redukcję liczby komórek w polu zawału. Apoptoza jest zjawiskiem odpowiedzialnym za ich eliminację podczas gojenia. Obserwacje komórek w ranach skórnych i bliznach pozawałowych sugerują, że miofibroblasty z obszaru zawału są mniej podatne na apoptozę. Świadczy o tym obecność miofibroblastów w bliznie jeszcze wiele lat po zawale i brak tych komórek w starych bliznach skórnych.

Blizna w sercu staje się cieńsza w ciągu 8 tygodni po zawale. Proces ten (obkurczanie blizny) jest zależny od miofibroblastów, a nie, jak wcześniej sądzono, od polimeryzacji białka kolagenowego. Badania *in vitro* pokazały, że stopień obkurczania się macierzy kolagenowej, w której są hodowane komórki, jest proporcjonalny do ich liczby. Warto również podkreślić, że blizna jest tkanką dynamiczną, w której zachodzi ciągła przebudowa macierzy międzykomórkowej. Zjawisko to dotyczy zwłaszcza kolagenu. Możemy zatem równolegle obserwować ciągły rozkład i syntezę tego białka.

Podsumowanie

Badania ostatnich lat wniosły wiele nowych informacji pozwalających zrozumieć zjawiska zachodzące podczas gojenia zawału serca. Wiedza ta staje się podstawą rozwoju nowych metod terapeutycznych. Ograniczenie martwicy komórek podczas niedokrwienia i gojenia, tonizacja odczynu zapalnego, zastosowanie komórek macierzystych i modyfikacje macierzy pozakomórkowej to podstawowe kierunki prób terapii zawału serca. Wyniki pierwszych eksperymentów klinicznych (stosowanie komórek macierzystych, przeciwciał skierowanych przeciwko CD18) są wyzwaniem dla współczesnej nauki, ale jednocześnie pokazują, że aby osiągnąć szybki przełom w terapii zawału serca, należy jeszcze lepiej poznać badane zjawiska.

Piśmiennictwo

1. Drobniak J, Dąbrowski R, Szczepanowska A, et al. Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vassopressin-induced hypertension or hypercholesterolemia. *J Physiol Pharmacol* 2000; 51: 521-33.
2. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95: 320-3.
3. Long X, Boluyt MO, Hipolito ML, et al. p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1997; 99: 2635-43.
4. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000; 106: 55-62.
5. Creemers E, Cleutjens J, Smits J, et al. Disruption of the plasminogen gene in mice abolishes wound healing after myocardial infarction. *Am J Pathol* 2000; 156: 1865-73.
6. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 1750-7.
7. Maroko PR, Carpenter CB, Chiariello M, et al. Reduction by cobra venom factor of myocardial necrosis after coronary artery occlusion. *J Clin Invest* 1978; 61: 661-70.
8. Dreyer WJ, Michael LH, Nguyen T, et al. Kinetics of C5a release in cardiac lymph of dogs experiencing coronary artery ischemia-reperfusion injury. *Circ Res* 1992; 71: 1518-24.

10. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, et al. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res* 1984; 54: 277-85.
11. Wang P, Chen H, Qin H, et al. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4556-60.
12. Murohara Y, Yui Y, Hattori R, et al. Effects of superoxide dismutase on reperfusion arrhythmias and left ventricular function in patients undergoing thrombolysis for anterior wall acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991; 67: 765-7.
13. Dobsak P, Siegelova J, Eicher JC, et al. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. *Pathophysiology* 2003; 9: 179-87.
14. Chandrasekar B, Freeman GL. Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Lett* 1997; 401: 30-4.
15. Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, et al. In vivo transfection of cis element „decoy” against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 1997; 3: 894-9.
16. Maekawa N, Wada H, Kanda T, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1229-35.
17. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, et al. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5456-61.
18. Dąbrowski R, Drobnik J. The effect of disodium cromoglycate on the skin wound healing and collagen content in the wounds of rats. *Acta Physiol Pol* 1990; 41: 195-8.
19. Dąbrowski R, Maśliński Cz. The effect of histamine on collagen formation and collagen polymerisation in the skin wound healing of guinea-pigs. *Life Sci II*; 1970: 189-202.
20. Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, et al. Evidence for an active inflammatory process in the hibernating human myocardium. *Am J Pathol* 2002; 160: 1425-33.
21. Rossen RD, Michael LH, Kagiya A, et al. Mechanism of complement activation after coronary artery occlusion: evidence that myocardial ischemia in dogs causes release of constituents of myocardial subcellular origin that complex with human C1q in vivo. *Circ Res* 1988; 62: 572-84.
22. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol* 2000; 165: 2798-808.
23. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2000; 101: 1019-26.
24. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lewallen M, et al. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J* 2001; 15: 1428-30.
25. Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, et al. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 237-46.
26. Frangogiannis NG, Perrard JL, Mendoza LH, et al. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1998; 98: 687-98.
27. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-8.
28. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension* 2002; 39: 258-63.
29. Blankesteyn WM, Essers-Janssen YP, Verluyten MJ, et al. A homologue of Drosophila tissue polarity gene frizzled is expressed in migrating myofibroblasts in the infarcted rat heart. *Nat Med* 1997; 3: 541-4.
30. Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 95-102.
31. Fraccarollo D, Galuppo P, Bauersachs J, et al. Collagen accumulation after myocardial infarction: effects of ETA receptor blockade and implications for early remodeling. *Cardiovasc Res* 2002; 54: 559-67.
32. Mizuno T, Mickle DA, Kiani CG, et al. Overexpression of elastin fragments in infarcted myocardium attenuates scar expansion and heart dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2819-27.
33. Drobnik J, Szczepanowska A, Dąbrowski R. Temporary augmentation of glycosaminoglycans content in the heart after left coronary artery ligation. *Pathophysiology* 2004; 11: 35-9.
34. Kossmehl P, Schonberger J, Shakibaei M, et al. Increase of fibronectin and osteopontin in porcine hearts following ischemia and reperfusion. *J Mol Med* 2005; 83: 626-37.