

MATERIAŁY DYDAKTYCZNE
SEKCJI KARDIOLOGII EKSPERYMENTALNEJ
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
KARDIOLOGICZNEGO

Redakcja

Andrzej Beręsewicz

Krzysztof S. Gołba

Marcin Malinowski

Receptory β -adrenergiczne w układzie krążenia. Udział niewrażliwych na propranolol receptorów β -adrenergicznych w regulacji układu krążenia

β -adrenergic receptors in the cardiovascular system. The participation of propranolol insensitive β -adrenoceptors in the regulation of the cardiovascular system

Barbara Malinowska, Hanna Kozłowska, Agnieszka Zakrzaska, Grzegorz Kwolek

Zakład Fizjologii Doświadczalnej, Akademia Medyczna, Białystok

Streszczenie

W pracy opisano udział receptorów β -adrenergicznych w regulacji układu krążenia. Szczególną uwagę zwrócono na scharakteryzowanie oraz określenie funkcji, w sercu zdrowym i niewydolnym, receptorów β -adrenergicznych niewrażliwych na propranolol (antagonistę receptorów β_1 -/ β_2 -adrenergicznych). Są to pobudzające pracę serca receptory β_1 -adrenergiczne o niskim stanie powinowactwa i osłabiające kurczliwość serca receptory β_3 -adrenergiczne. Dodatkowo omówiono rozszerzające naczynia krwionośne działanie ligandów tych receptorów.

Abstract

In this paper we described the participation of β -adrenoceptors in the regulation of the cardiovascular system. We characterized mainly the low-affinity state of β_1 -adrenoceptors and β_3 -adrenoceptors, which are insensitive to propranolol (the antagonist of β_1 -/ β_2 -adrenoceptors). We also illustrated their function in the healthy and failing heart. In addition the vasodilatory effects of these receptors ligands were described.

Kardiologia Polska 2005; 63; 4 (Supl. 2): 399-408

Według najnowszej klasyfikacji [1] do receptorów β -adrenergicznych zaliczamy sklonowane już w chwili obecnej receptory β_1 -, β_2 -, β_3 -adrenergiczne (β -AR), przy czym wśród receptorów β_1 -AR wyróżnia się receptory o wysokim i niskim stanie powinowactwa (*high- and low-affinity state of β -adrenoceptors*). Jak zaznaczono w Tabeli I, wszystkie receptory β -AR są utworzonymi z długich łańcuchów białkowych siedmiokrotnie przenikających przez błonę komórkową i sprzężonymi z białkiem Gs receptorami metabotropowymi. Ich pobudzenie aktywuje cyklazę adenylową, co prowadzi do wzrostu cAMP w komórce. Receptory β_2 - i β_3 -AR mogą ponadto działać za pośrednictwem białek Gi (dokładniejsze omówienie w dalszej części pracy). Długotrwała aktywacja receptorów β_1 -AR (zarówno o wysokim, jak i o niskim stanie powinowactwa) oraz β_2 -AR, ale nie

β_3 -AR, prowadzi do zmniejszenia ich wrażliwości (desensytyzacji, czyli odczulania). Wszystkie receptory β -AR są pobudzane przez endogenne katecholaminy – pochodzącą głównie z zakończeń włókien współczulnych noradrenalinę i uwalnianą z rdzenia nadnerczy adrenalinę, które, jak zaznaczono w Tabeli I, mają różne powinowactwo do poszczególnych typów receptorów. Do wzrostu wydzielania noradrenaliny dochodzi między innymi na skutek pobudzenia presynaptycznych receptorów β_2 -AR zlokalizowanych na zakończeniach włókien współczulnych unerwiających poszczególne elementy układu krążenia oraz inne narządy wewnętrzne. Obecnie nie ma jednoznacznych dowodów wskazujących na to, że endogenne katecholaminy pobudzają receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa. Prawdopodobieństwo takiego działania wynika jedynie z ba-

Adres do korespondencji:

Barbara Malinowska, Zakład Fizjologii Doświadczalnej Akademii Medycznej, ul. Mickiewicza 2A, 15-089 Białystok, tel./faks: +48 85 748 56 99, e-mail: bmalin@amb.edu.pl

dań z zastosowaniem znakowanego [³H]-CGP 12177, w których wykazano, że zarówno noradrenalina, jak i (w mniejszym stopniu) adrenalina posiadają powinowactwo do tych receptorów w zakresie stężeń mikromolarnych [2].

W sercu człowieka zdecydowanie przeważają receptory β_1 -AR. Stosunek receptorów β_1 -AR: β_2 -AR wynosi w komorach 70–80:30–20%, a w przedsionkach 60–70:40–30%. Powyższa sytuacja ulega charakterystycznym zmianom w niewydolności mięśnia sercowego, kiedy pod wpływem zwiększonej aktywności układu współczulnego dochodzi do zmniejszenia liczby (tzw. *down regulation* – regulacja w dół) receptorów β_1 -AR (może dojść aż do 50% spadku mRNA dla tych receptorów). Nie notuje się przy tym istotnych zmian w ilości i aktywności białka G_s. Nie obserwuje się także spadku (lub obserwuje w znacznie mniejszym stopniu) w gęstości receptorów β_2 -AR. Dochodzi natomiast do wzrostu ilości i aktywności białka G_i [3, 4].

Pobudzenie receptorów β_1 -/ β_2 -AR zarówno przez endogenne, jak i egzogenne agonistów powoduje zwiększenie częstości i siły skurczu, a także prędkości rozkurczu (są to odpowiednio tzw. dodatnie efekty

chronotropowe, inotropowe i luzitropowe). Stymulacja receptorów β_1 -/ β_2 -AR prowadzi także do zwiększenia pobudliwości oraz szybszego przewodzenia potencjałów czynnościowych (dodatni efekt batmo- i dromotropowy). W przypadku nasilonego pobudzenia zarówno receptorów β_1 -AR, jak i β_2 -AR dochodzi do arytmii (Tabela I).

W ostatnich latach coraz częściej zwraca się uwagę na kardioprotekcyjne działanie receptorów β_2 -AR. Jak wykazano bowiem na modelach zwierzęcych (i to zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*) ich pobudzenie hamuje apoptozę w kardiomiocytach, co związane jest, jak się sugeruje, z działaniem zachodzącym za pośrednictwem białka G_i. Z kolei stymulacja receptorów β_1 -AR nasila apoptozę i działa toksycznie na miocyty. Co ważne, do nasilenia ochronnej funkcji receptorów β_2 -AR dochodzi w obecności antagonistów receptorów β_1 -AR. Natomiast blokada receptorów β_2 -AR zwiększa niekorzystny wpływ pobudzenia receptorów β_1 -AR [3, 4].

W naczyniach krwionośnych przeważają receptory β_2 -AR, których pobudzenie prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych, a tym samym do zmniejszenia całkowitego oporu obwodowego i obniżenia ciśnienia

Tabela I. Charakterystyka receptorów β -adrenergicznych (β -AR) i ich rozmieszczenie w układzie krążenia człowieka. NA – noradrenalina:

¹działanie występujące w stężeniach wyższych w porównaniu do ich wpływu na receptory β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa lub na receptory β_2 -AR;

²zbadane tylko w 1 przypadku [25] – brak danych. W Tabeli I nie wymieniono antagonistów receptorów β_1 -/ β_2 -AR umieszczonych w Tabeli II.

RECEPTORY				
	β_1 -adrenergiczne		β_2 -adrenergiczne	β_3 -adrenergiczne
	o wysokim stanie powinowactwa	o niskim stanie powinowactwa		
białko G	G _s	G _s	G _s G _i	G _s G _i
wtórny przekaźnik	cAMP	cAMP	cAMP	cAMP
endogenne agonisty	NA >adrenalina	NA (?)	Adrenalina >NA	NA ≈ Adrenalina
egzogenne agonisty	prenalterol, ksamoterol, izoprenalina	CGP 12177 ¹ , cyjanopindolol ¹ , pindolol ¹	fenoterol, salbutamol, prokaterol, izoprenalina,	CL 316243, BRL 37344, SR 58611, ZD 2079; CGP 12177 ¹ , cyjanopindolol ¹
antagonisty	propranolol , bupranolol CGP 20712A, CGP 12177, cyjanopindolol	CGP 20712A ¹ , bupranolol ¹	propranolol, ICI 118551, CGP 12177 bupranolol	SR 59230A, L 748337, bupranolol ¹
desensytyzacja	+	+	+	–
efekt pobudzenia w sercu:				
chronotropowy	dodatni	dodatni	dodatni	b.d.
inotropowy	dodatni	dodatni	dodatni	ujemny
luzitropowy	dodatni	dodatni	dodatni	ujemny (?) ²
arytmia	arytmogenny	arytmogenny	arytmogenny	b.d.

krwi. Receptory β_1 -AR rozszerzają, obok receptorów β_2 -AR, naczynia wieńcowe i mózgowe.

Niewrażliwe na propranolol receptory β -adrenergiczne

Jak wynika z Tabeli I, receptory β_1 - i β_2 -AR są hamowane między innymi przez ich niespecyficznego antagonistę propranolol. W latach 80. pojawiły się pierwsze prace, w których wykazano, że niektóre efekty agonistów receptorów β_1 - i β_2 -AR są niewrażliwe na propranolol lub innych klasycznych antagonistów receptorów β -AR (zestawienie ligandów receptorów β_1 -/ β_2 -AR – Tabela I). Sugerowało to istnienie nowego typu receptora β -AR. Z czasem okazało się, że istnieją dwa typy niewrażliwych na propranolol receptorów. Pierwszy z nich, receptor β_3 -AR, został sklonowanego w 1989 r. Drugi określany był jako atypowy receptor β -AR [5]; receptor β_4 -AR [2, 6], a obecnie przyjmuje się, że jest to receptor β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa (dokładne omówienie dalej). Do dziś dochodzi jednak często do mylnego określania, czy dana reakcja zachodzi za pośrednictwem receptorów β_3 -AR czy też receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa. Wiąże się to przede wszystkim z dwoma faktami:

1. jak już wspomniano, obydwa typy receptorów są niewrażliwe na niespecyficznego antagonistę receptorów β_1 -/ β_2 -AR: propranolol lub innych, konwencjonalnych antagonistów receptorów β_1 -/ β_2 -AR;
2. brak jest specyficznych ligandów (zarówno agonistów, jak i antagonistów) tych receptorów (w tym przede wszystkim receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa).

Według Kaumanna i Molenaara [2] receptory β_3 -AR:

1. są pobudzane przez selektywnych agonistów receptorów β_3 -AR (spis: Tabela I);
2. są także pobudzane przez tzw. częściowych niekonwencjonalnych agonistów receptorów β -AR, czyli związki, które w niższych stężeniach blokują receptory β_1 - i β_2 -AR, a w wyższych stężeniach stymulują efekty niewrażliwe na propranolol. Zaliczamy do nich takie substancje, jak CGP 12177, cyjanopindolol czy pindolol;
3. pośredniczą w reakcjach, które nie są hamowane przez wysokie stężenia klasycznych antagonistów receptorów β_1 -/ β_2 -AR (w tym propranololu; spis w Tabeli I);
4. stymulują efekty osłabiane przez antagonistów receptorów β_3 -AR (pierwszym i najczęściej stosowanym antagonistą jest SR 59230A; spis w Tabeli I).

Receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa nie spełniają pierwszego warunku, a ponadto – w odróżnieniu od receptorów β_3 -AR – nie są lub są słabiej an-

tagonizowane przez SR 59230A. Są natomiast hamowane przez wysokie stężenie antagonisty receptora β_1 -AR CGP 20712A [2, 5, 7]. Z kolei obecność receptorów β_3 -AR można jednoznacznie potwierdzić, wykazując w danej tkance specyficzne dla nich mRNA. Jak wynika z powyższego zestawienia oraz z danych zawartych w Tabeli I, cechą wspólną łączącą receptory β_3 -AR i receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa jest fakt, że są pobudzane przez częściowych niekonwencjonalnych agonistów receptorów β -AR, a antagonizowane przez wysokie stężenia bupranololu [2, 5-8].

Wszystkie opisane poniżej badania związane z oceną funkcji receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa oraz receptorów β_3 -AR zostały wykonane w obecności propranololu (bądź innego klasycznego antagonisty receptorów β_1 -/ β_2 -AR) lub też w doświadczeniach wstępnych wykazano, że dany efekt nie jest blokowany przez tych antagonistów. W celu uproszczenia tekstu, nie będziemy tego powtarzać w dalszej części pracy. Nie będziemy także wymieniać szczegółowo zastosowanych w danym badaniu ligandów danych receptorów, których spis znajduje się w Tabeli I.

Atypowy receptor β -adrenergiczny receptorem β_1 -adrenergicznym o niskim stanie powinowactwa

Receptor β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa nie został sklonowany. Nie jest on receptorem β_3 -AR, gdyż – jak wykazano w prowadzonych równolegle badaniach – zarówno w warunkach *in vitro* [6] jak i *in vivo* [5, 7] specyficzni agoniści receptorów β_3 -AR stymulowali reakcje charakterystyczne dla receptorów β_3 -AR (odpowiednio relaksację izolowanego jelita i termogenezę w brunatnej tkance tłuszczowej szczura), ale nie pobudzały pracy serca (charakterystyczne dla receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa; dokładne omówienie poniżej). Ponadto pobudzające pracę serca działanie agonistów receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa pozostało niezmienione u myszy transgenicznych pozbawionych receptorów β_3 -AR [9]. Z kolei fakt, że występowanie receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa jest uzależnione od obecności receptorów β_1 -AR został jednoznacznie potwierdzony w badaniach z użyciem myszy transgenicznych, u których niewrażliwe na propranolol, pobudzające działanie CGP 12177 obserwowano we fragmentach serca izolowanych od zwierząt kontrolnych oraz pozbawionych receptorów β_2 -AR. Działanie to było natomiast całkowicie zniesione w grupie myszy pozbawionych zarówno receptorów β_1 -, jak i β_2 -AR [10].

W chwili obecnej przyjmuje się istnienie dwóch stanów aktywności receptorów β_1 -adrenergicznych [1, 10–17]:

- o wysokim stanie powinowactwa (*high-affinity state of β_1 -adrenoceptors*) – pobudzane i antagonizowane odpowiednio przez ich klasycznych agonistów (np. katecholaminy) i antagonistów (np. propranolol, niskie stężenie CGP 20712A);
- o niskim stanie powinowactwa (*low-affinity state of β_1 -adrenoceptors*) – pobudzane przez częściowych, niekonwencjonalnych agonistów receptorów β -adrenergicznych (CGP 12177, cyjanopindolol, pindolol), a blokowane przez wysokie stężenie CGP 20712A oraz bupranolol, ale niewrażliwe na propranolol.

Niewątpliwie czynnikami łączącymi receptory β_1 -AR o wysokim i niskim stanie powinowactwa jest ich funkcja – pobudzenie pracy serca, a także fakt działania za pośrednictwem tego samego II przekąźnika – cAMP. Jak wykazano bowiem w warunkach *in vitro* CGP 12177 aktywuje kinazę białkową A, zwiększa poziom cAMP, a efekty jego pobudzenia we fragmentach serca człowieka i szczura są nasilone w obecności inhibitora fosfodiesterazy, nie ulegając przy tym modyfikacji w obecności toksyny krztuśca [2, 13–15].

Hipoteza o dwóch stanach powinowactwa receptorów β_1 -AR została udowodniona w oparciu o doświadczenia na izolowanych fragmentach serca człowieka, szczura i fretki oraz hodowli komórek linii CHO (pochodzących z jajnika chomika chińskiego) z ludzkimi lub szczurzymi rekombinowanymi receptorami β_1 -AR. Badanymi odpowiedziami, w zależności od modelu doświadczalnego, były stymulowane za pośrednictwem agonistów obydwu stanów receptorów β_1 -adrenergicznych, w warunkach kontrolnych oraz w obecności poszczególnych antagonistów, kurczliwość kardiomiocytów oraz poziom cAMP. Dodatkowych dowodów dostarczyły doświadczenia, w których wykazano, że (-)-[³H]-CGP 12177 ma zdolność do wiązania się z miejscami o wysokim i niskim powinowactwie we fragmentach serca człowieka [15] i szczura [16] oraz hodowli komórek CHO z ludzkimi rekombinowanymi receptorami β_1 -adrenergicznymi [11, 12]. Co ciekawe, okazało się przy tym, że w przedsionkach serca człowieka [15] i lewej komorze serca szczura [16] jest 4 razy większa gęstość receptorów β_1 -AR o niskim niż o wysokim stanie powinowactwa.

Do chwili obecnej nie została wyjaśniona molekularna natura dwóch różnych aktywnych stanów konformacyjnych receptora β_1 -AR. Przypuszcza się, że mogą się one wiązać z modulacją allosteryczną receptora, z wpływem na inne białko modyfikujące jego aktywność, z krótkoterminowymi zmianami na poziomie II przekąźnika bądź długoterminową zmianą związaną z transkrypcją genu [11, 12, 17].

Funkcja receptorów β_1 -adrenergicznych o niskim stanie powinowactwa w sercu

Obecnie udowodniono w sposób jednoznaczny, że receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa są receptorami pobudzającymi pracę serca. Ich obecność wykazano (badania ze znakowanym [³H]-CGP 12177) bądź się ją sugeruje na podstawie wyników badań funkcjonalnych *in vitro* na fragmentach izolowanego serca w węzle zatokowo-przedsionkowym, przedsionkach i komorach serca człowieka [2, 13–15, 17, 18], szczura [2, 6, 16, 17, 19], myszy [9, 10] i fretki [20–22]. Pobudzenie receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa prowadzi do dodatniego efektu chronotropowego, a także do nasilenia zarówno siły skurczu, jak i prędkości skracania przedsionków i komór (dodatni efekt inotropowy). Ponadto zaobserwowano nasilenie prędkości rozkurczu miokardium człowieka w większości [2, 14–17], ale nie wszystkich [13] doświadczeniach. Ten ostatni efekt jest bardzo korzystny, gdyż umożliwia prawidłowe wypełnianie komór przy nasilonej częstotliwości skurczów serca. Pod wpływem agonistów receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa dochodzi także do skrócenia potencjału czynnościowego komórek roboczych komór fretki [21]. Ponadto udowodniono, że związki te nasilają kurczliwość serca szczura poprzez wzrost poziomu wapnia w komórkach miocytów [2, 16]. Działanie pobudzające receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa uzyskiwano, stosując głównie CGP 12177 i rzadziej cyjanopindolol. Cyjanopindolol okazał się przy tym częściowym agonistą tych receptorów, gdyż efekty maksymalne uzyskiwane przy zastosowaniu jego wyższych stężeń wynosiły około 50% w porównaniu z pobudzającym pracę serca działaniem CGP 12177 [2, 6–8]. Jednocześnie udowodniono, że przy kumulacyjnym podawaniu kolejnych dawek CGP 12177 dochodzi do osłabienia dodatniego efektu inotropowego tego związku w izolowanych fragmentach przedsionka człowieka [18]. Związane jest to ze zjawiskiem desensytyzacji receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa, które jest także charakterystyczne dla receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa i receptorów β_2 -AR (Tabela I).

W przeciwieństwie do badań *in vitro* efekt pobudzenia receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa w warunkach *in vivo* został wykazany jedynie przez naszą grupę w badaniach z zastosowaniem modelu szczura odrdzienionego i poddanego obustronnej wago-tonii [5, 7, 8]. Model ten, dzięki zniszczeniu rdzenia przedłużonego i kręgowego, umożliwia ocenę jedynie obwodowych mechanizmów związanych z regulacją układu krążenia, a przecięcie nerwów błędnych wyklucza reakcje odruchowe. W przeprowadzonych doświadczeniach stwierdzono, że dożylnie podanie CGP 12177

nasila częstość akcji serca [5, 7, 8], a także, jak to wykazano za pomocą specjalnego przetwornika dosercowego, zwiększa ciśnienie w lewej komorze serca i prędkość jej skurczu [8] odpowiednio o ok. 40, 30 i 100% wartości wyjściowych. Jednocześnie zaobserwowano zwiększenie prędkości rozkurczu komór o ok. 70% [8]. Dodatni efekt chronotropowy, inotropowy i lusitropowy zanotowano także po dożylniej iniekcji cyjanopindololu. Również i w warunkach *in vivo* związek ten okazał się częściowym agonistą receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa, gdyż, pomimo że stosowano go w 10 razy wyższych dawkach, wszystkie stymulowane przez niego efekty związane z pobudzeniem pracy serca były mniejsze o około 30–50% w porównaniu do CGP 12177. Udział receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa w omówionych wyżej reakcjach potwierdzono, przeprowadzając analogiczne doświadczenia z zastosowaniem wymienionych w Tabeli I antagonistów tych receptorów. Maksymalny wzrost wszystkich czterech parametrów określających pracę serca zanotowano w 5. min po podaniu CGP 12177 i cyjanopindololu. Działanie obydwu agonistów było długotrwałe, przy czym efekt chronotropowy utrzymywał się dłużej niż inotropowy. W ciągu 30 min od momentu iniekcji agonistów nasilona częstość skurczów praktycznie nie obniżyła się, gdy tymczasem ciśnienie w lewej komorze i prędkość narastania siły skurczów zmalały odpowiednio o ok. 70–80 i 50%. Z kolei dodatni efekt lusitropowy nie uległ zmianie (CGP 12177) lub był zmniejszony o ok. 70% (cyjanopindolol). Dłużej utrzymujące się działanie chronotropowe dodatnie w porównaniu z krótszym efektem inotropowym i lusitropowym uzyskane po pobudzeniu receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa wskazuje, że nasilona prędkość skurczu i rozkurczu nie wynikają z istotnego podwyższenia częstości akcji serca, a związane są z mechanizmem receptorowym.

Jak wygląda porównanie efektów działania pobudzonych receptorów β_1 -AR o wysokim i niskim powinowactwie? Niewątpliwie zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* pobudzenie receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa powodowało słabsze, ale dłużej trwające pobudzenie pracy serca. Jak wykazano, stymulowany za pomocą CGP 12177 maksymalny wzrost częstości skurczów izolowanych fragmentów przedsionków serca szczura [2, 6] wynosił ok. 60% efektu uzyskiwanego po pobudzeniu receptorów β_1 -AR przez izoprenalinę. Z kolei siła skurczu w porównaniu do działania izoprenaliny wahała się w granicach. 50–60% w przedsionkach szczura [2, 6] i ok. 15% w przedsionkach izolowanych z serca człowieka [18]. Istotne nasilenie siły skurczu w sercu człowieka, do ponad 40% efektu izoprenaliny, następowało w obecności inhibitora fosfodiesterazy [13, 15]. Z kolei u szczurów odrdzienionych

agonista receptorów β_1 -AR prenalterol nasilał częstość akcji serca, jego kurczliwość oraz prędkość rozkurczu o około 20–30% silniej niż porównywalna dawka CGP 12177 [8]. Jednocześnie było to działanie szybsze (efekt maksymalny we wszystkich przypadkach osiągnięto już w 1 min po iniekcji tego agonisty), ale utrzymujące się zdecydowanie krócej. W 15 ciągu min po jego podaniu nasilona częstość akcji serca była bowiem zmniejszona o ok. 50% i nie obserwowano już dodatniego efektu inotropowego i lusitropowego. Oczywiście, biorąc pod uwagę warunki *in vivo*, nie można wykluczyć, że szybsze, ale i krótsze działanie prenalterolu wynika z innych parametrów farmakokinetycznych tego związku. Istnieje jednak wymagająca potwierdzenia możliwość, że związane jest to z różnymi właściwościami receptorów β_1 -AR o wysokim i niskim powinowactwie.

Znaczenie receptorów β_1 -adrenergicznych o niskim stanie powinowactwa w patofizjologii i farmakologii serca

Wyniki uzyskane do chwili obecnej wskazują, że badanie funkcji występujących także w sercu człowieka receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa ma znaczenie nie tylko czysto teoretyczne, ale może mieć także potencjalne znaczenie kliniczne. Jak dotąd największe zainteresowanie tymi receptorami wiąże się z ich rolą w arytmogenezie. Jak wykazano bowiem na izolowanych fragmentach serca, ich pobudzenie prowadzi do arytmii przedsionków lub komór serca człowieka, myszy, szczura i fretki [10, 17, 20–21]. Stymulujące arytmie działanie CGP 12177 było przy tym ok. 40 razy silniejsze niż działającej za pośrednictwem klasycznych receptorów β_1 -AR izoprenaliny [10, 19]. Silne, niewrażliwe na propranolol działanie arytmogenne CGP 12177 ulegało ponadto nasileniu w hodowli komórek ze zwiększoną liczbą receptorów β_1 -AR, gdy tymczasem częstość arytmii zachodzącej pod wpływem izoprenaliny pozostawała niezmienną [17]. Biorąc pod uwagę fakt, że efekt ten był blokowany przez bupranolol, autorzy pracy wskazują na potencjalne znaczenie tego antagonisty w terapii arytmii [17].

Z kolei w niewydolności mięśnia sercowego wykazano, że nie tylko receptory β_1 -AR o wysokim powinowactwie, ale i o niskim powinowactwie w porównywalnym stopniu podlegają zjawisku *down-regulation* (regulacji receptorów w dół) w niewydolnym sercu człowieka [15] i szczura [19]. Ich ilość w obydwu przypadkach spadała bowiem o około 50–60%. Jednak dokładniejsze wyjaśnienie funkcji niewrażliwych na propranolol receptorów β_1 -AR w niewydolności serca wymaga dalszych badań.

W przeciwieństwie do receptorów β_2 -AR (omówienie w części wstępnej pracy), odpowiedź na pobudzenie

receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa prawdopodobnie nie ulega zmianie podczas długotrwałego stosowania selektywnych antagonistów receptorów β_1 -AR u człowieka [18]. W ostatnich latach wykazano natomiast, że niektórzy antagoniści receptorów β_1 -/ β_2 -AR mogą pobudzać lub hamować receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa. Różne powinowactwo i siła działania tych związków w stosunku do receptorów β_1 -AR o wysokim i niskim powinowactwie w komórkach linii CHO dodatkowo potwierdziło istnienie dwóch różnych miejsc wiążących dla ligandów receptorów β -AR. Okazało się bowiem, że w stosunku do receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa uzyskano następujące uszeregowanie zbadanych związków pod względem ich siły działania (wg 11): karwedilol (9,4) > CGP 20712A (9,2) > bupranolol (8,5) \approx timolol (8,6) > betaksolol (8,4) > propranolol (8,1) \approx bisoprolol (8,0) > metoprolol (7,5) \approx nadolol (7,5) > ICI 118551 (6,8) \approx atenolol (6,8) > sotalol (5,8). Natomiast w stosunku do receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa uszeregowanie tych samych związków kształtowało się następująco: karwedilol (7,3) \approx bupranolol (7,3) > CGP 20712A (7,1) >> propranolol (6,4) \approx timolol (6,3) >> nadolol (5,9) \approx ICI 118551 (5,8) \approx betaksolol (5,7) > bisoprolol (5,5) > metoprolol (5,3) >>> atenolol (3,8) \approx sotalol (3,7) (w nawiasie podano odpowiednie wartości pKD, określające siłę działania antagonistycznego).

W Tabeli II zestawiono szereg uznanych już antagonistów receptorów β -AR, które zostały przebadane pod kątem ich wpływu na receptory β_1 -AR o wysokim i ni-

skim stanie powinowactwa w doświadczeniach przeprowadzonych na izolowanych fragmentach ludzkich przedsionków [14] i komór [13], na miocytach komór szczura [17] i fretki [22] oraz hodowli komórek linii CHO z ludzkimi rekombinowanymi receptorami β_1 -AR [11, 12]. Dodatkowo włączono do tej tabeli najczęściej stosowane ligandy receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa – ich agonistów CGP 12177 i cyjanopindolol, blokujących w niskich stężeniach receptory β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa i receptory β_2 -AR oraz antagonistów bupranolol i CGP 20712A, będących w niższych stężeniach antagonistami receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa i β_2 -AR. Wysokie stężenie bupranololu antagonizuje także receptory β_3 -AR. Jak wynika z tej tabeli, związki β -adrenolityczne o wewnętrznej aktywności sympatykomimetycznej (ISA) pindolol, i alprenolol pobudzają nie tylko receptory β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa, ale i o niskim. Z kolei acebutolol i labetalol pobudzają receptory β_1 -AR o wysokim, ale nie o niskim stanie powinowactwa. Działanie karwedilolu nie zostało określone do końca, gdyż wykazano zarówno jego działanie pobudzające [12], jak i hamujące [11, 22] w stosunku do receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa. Zachodzące za pośrednictwem receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa nasilenie kurczliwości izolowanych fragmentów serca człowieka było pobudzane przez bucindolol, który nie stymuluje z kolei receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa [11–13]. Natomiast żaden z przebadanych antagonistów receptorów β -AR bez ISA nie

Tabela II. Wpływ uznanych antagonistów receptorów β_1 - i β_2 -adrenergicznych na receptory β_1 -adrenergiczne o wysokim i niskim stanie powinowactwa. (?) – uzyskano różne wyniki w pracach 12 oraz 11 i 22 (opis w tekście). ISA – wewnętrzna aktywność sympatykomimetyczna. Na podstawie 11, 12–14, 17, 22.

SUBSTANCJA	Uznane działanie antagonistyczne w stosunku do receptorów adrenergicznych	ISA	Receptory β_1 -adrenergiczne o stanie powinowactwa		
			wysokim	niskim	
			antagonista	agonista	antagonista
CGP 12177, cyjanopindolol	β_1 i β_2	–	+	+	–
CGP 20712A	β_1	–	+	–	+
bupranolol	$\beta_1, \beta_2, \beta_3$	–	+	–	+
pindolol, alprenolol	β_1 i β_2	+	+	+	–
karwedilol	$\beta_1, \beta_2, \alpha_1$	–	+	+	+
bucindolol	$\beta_1, \beta_2, \alpha_1$	–	+	+	–
acebutolol	β_1	+	+	–	–
labetolol	$\beta_1, \beta_2, \alpha_1$	+	+	–	–
propranolol, sotalol, timolol	β_1 i β_2	–	+	–	–
atenolol, bisoprolol, metoprolol, nebiwolol	β_1	–	+	–	–

wykazał powinowactwa do receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa (Tabela II). Należy przy tym podkreślić, że wszystkie związki zarówno pobudzające, jak i hamujące receptory β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa, wykazują zdecydowanie wyższe powinowactwo do receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa niż o niskim. Powstaje zatem pytanie, czy leki β -adrenolityczne stosowane w dawkach terapeutycznych są w stanie zmodyfikować funkcję receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że jest to możliwe, jak to wyliczono dla pindololu [14] oraz alprenololu i karwedilolu [12, 20], biorąc pod uwagę osiągalne w osoczu stężenia terapeutyczne tych związków.

Aktywacja receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa prowadzi do długotrwałego pobudzenia pracy serca. Jakie to ma znaczenie dla uznanych już leków β -adrenolitycznych? Z jednej strony wskazuje się na korzystne, pobudzające pracę serca działanie pindololu w przypadku hipotensji ortostatycznej bądź omdlenia wazowagalnego [14]. Z drugiej strony zwraca się natomiast uwagę, że osłabiony efekt terapeutyczny bucindololu, pindololu i alprenololu przy leczeniu niewydolności mięśnia sercowego może być związany właśnie z prowadzącą do arytmii stymulacją receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa [13, 14, 22]. Teoretycznie prawdopodobieństwo występowania arytmii jest zwiększone podczas pobudzenia receptorów β_1 -AR o wysokim stanie powinowactwa, gdyż jak wykazano na komórkach linii CHO, dochodzi wówczas do zwiększonej odpowiedzi na CGP 12177 ze strony receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa [11]. Tymczasem w niewydolności serca zwiększona aktywność układu współczulnego powoduje nasilone wydzielanie pobudzającej klasycznej receptory β_1 -AR noradrenaliny. Jednak wyjaśnienie funkcji receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa w fizjologii i patologii serca wymaga dokładniejszego zbadania.

Receptory β_3 -adrenergiczne w sercu

W 1996 r. grupa Gauthier w doświadczeniach wykonanych na fragmentach biopsyjnych endomiokardium serca człowieka przeznaczonego do transplantacji zaobserwowała, że pobudzenie receptorów β_3 -AR prowadzi do ujemnego efektu inotropowego. Obecność receptorów β_3 -AR została potwierdzona poprzez wykazanie mRNA dla tych receptorów w badanych fragmentach serca. Zmniejszenie kurczliwości serca uzyskano pod wpływem: mikromolarnych stężeń niespecyficznych agonistów receptorów β -AR – endogennego noradrenaliny (badanej w obecności antagonistów receptorów β_1 -/ β_2 -AR nadololu i α_1 -AR prazosyny) oraz egzogennej izoprenaliny (badanej w obecności nadololu), a także

specyficznych agonistów receptorów β_3 -AR (Tabela I). Dla najwyższych stężeń badanych związków zaobserwowano spadek kurczliwości o ok. 20% (noradrenalina, izoprenalina) lub 50–60% (agoniści receptorów β_3 -AR). Jak wykazano, pobudzenie receptorów β_3 -AR prowadziło do aktywacji wrażliwego na toksynę krztuśca białka G_i , wzrostu poziomu cGMP, a także poprzez zachodzące pod wpływem śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) zwiększenie powstawania tlenu azotu. Osłabienie kurczliwości związane było ze zmniejszeniem amplitudy i skróceniem okresu repolaryzacji potencjału czynnościowego mięśni roboczych komór serca [23].

Powstało pytanie o znaczenie osłabiających kurczliwość serca receptorów β_3 -AR. W zdrowym sercu receptory β_3 -AR nie odgrywają prawdopodobnie żadnej roli, biorąc pod uwagę zdecydowaną przewagę pobudzających pracę serca receptorów β_1 - i β_2 -AR. Tymczasem, jak wykazano, we fragmentach serca człowieka [24] i psa [25] w niewydolności mięśnia sercowego, w przeciwieństwie do podlegających zjawiskom zmniejszenia gęstości (*down-regulation*) i desensytyzacji receptorom β_1 -AR i β_2 -AR, receptory β_3 -AR nie ulegają desensytyzacji, a ich ilość się zwiększa (*up-regulation*, regulacja w górę). Zmiany te powodują zmniejszoną i nieadekwatną do wysokiego poziomu katecholamin kurczliwość mięśnia sercowego, a przez to znacznie bardziej ekonomiczne wykorzystanie tlenu i substancji energetycznych przez serce [24, 25].

Ta atrakcyjna hipoteza o zachodzącym za pośrednictwem receptorów β_3 -AR ujemnym efekcie inotropowym i jego nasileniu w niewydolności mięśnia sercowego nie została jednak potwierdzona, a przez to do końca zaakceptowana przez inne grupy badawcze. Nie stwierdzono bowiem mRNA dla tych receptorów w sercu człowieka i szczura [6, 16, 18]. Ponadto stosując dokładnie te same ligandy i ten sam zakres stężeń co grupa Gauthier, nie zaobserwowano osłabienia kurczliwości fragmentów serca człowieka i to zarówno zdrowego, jak i niewydolnego [15–16], a także serca szczura zarówno w warunkach *in vitro* [6], jak i *in vivo* [5, 7]. Z drugiej strony powstaje pytanie, dlaczego CGP 12177 – najsilniejszy agonista receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa w doświadczeniach grupy Gauthier zamiast nasilać, osłabiał kurczliwość serca [23]. Również nie do końca zrozumiałe pozostają wyniki badań *in vivo* przeprowadzonych na modelu myszy transgenicznych wyposażonych w ludzkie receptory β_3 -AR. Zupełnie nieoczekiwane dwie grupy badawcze uzyskały całkowicie odmienny wpływ agonistów receptorów β_3 -AR – zależny od białka Gs wzrost kurczliwości serca [26] i związany ze wzrostem cGMP ujemny efekt inotropowy [27]. Potencjalne występowanie oraz określenie funkcji receptorów β_3 -AR

w sercu zdrowym i niewydolnym wymaga więc dokładnego sprawdzenia i potwierdzenia.

Rozszerzające naczynia krwionośne działanie ligandów receptorów β_1 -adrenergicznych o niskim stanie powinowactwa i receptorów β_3 -adrenergicznych

W Tabeli III zestawiono najważniejsze publikacje z ostatnich lat, w których wykazano niewrażliwe na propranolol lub innych klasycznych antagonistów receptorów β_1/β_2 -AR, rozkurczające izolowane naczynia krwionośne działanie agonistów receptorów β -AR. Sugerowano, że efekt ten wiąże się z pobudzeniem receptorów β_3 -AR bądź atypowych receptorów β -AR. Pojęcie: atypowy receptor β -AR nie było przy tym jednoznaczne z określeniem: receptor β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa, gdyż nie wszystkie cechy farmakologiczne odpowiadają receptorom β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa występującym w sercu [28]. W sposób jednoznaczny istnienie receptorów β_3 -AR udowodniono, wykazując mRNA dla tych receptorów w tętnicy wieńcowej i piersiowej wewnętrznej człowieka, komórkach endotelium aorty szczura oraz miocytach żyły wrotnej szczura (Tabela III).

Zdecydowanie bardziej skomplikowany obraz wyłania się z badań funkcjonalnych, gdyż większość z nich była wykonana na izolowanych naczyniach krwiono-

śnych kurczonych uprzednio agonistami receptorów α_1 -adrenergicznych – fenylefryną lub noradrenaliną. Tymczasem w ubiegłym roku pojawiły się prace, wykonane na izolowanej aorticie i tętnicy krezkowej szczura, a także tętnicy płucnej człowieka, w których udowodniono, że zachodzący pod wpływem agonistów i antagonistów receptorów β_3 -AR oraz receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa rozkurcz wynika z wyraźnych właściwości α -adrenolitycznych tych związków [29–30]. Wyniki badań funkcjonalnych zostały dodatkowo potwierdzone w doświadczeniach *binding study*, w których wykazano, że wspomniane wyżej ligandy receptorów β -AR wypierają znakowaną trytem prazosynę (antagonistę receptorów α_1 -AR) z jej połączeń z receptorami α_1 -AR [29].

Powstaje pytanie, czy w tym układzie możemy w ogóle mówić o niewrażliwych na propranolol receptorach β -AR rozszerzających naczynia krwionośne. Obecności receptorów β_3 -AR nie możemy wykluczyć w naczyniach, w których stwierdzono dla nich mRNA (Tabela III). Do wyjaśnienia pozostaje jednak znaczenie tych receptorów, gdyż badania funkcjonalne zostały wykonane na naczyniach kurczonych uprzednio agonistą receptorów α -AR. W tym układzie na szczególną uwagę zasługują badania wykonane na ludzkiej tętnicy wieńcowej kurczonej uprzednio za pomocą endoteliny 1 lub KCl, w których pod wpływem agonistów receptorów β_3 -AR dochodziło do 50% rozkurczu. Niewrażliwego na propranolol udziału receptorów β -AR nie

Tabela III. Niewrażliwe na propranolol rozszerzające naczynia krwionośne działanie agonistów receptorów β -adrenergicznych. ¹Szczegółowe dane literaturowe w pracach 28, 30. ²Wykazano istnienie mRNA dla receptorów β_3 -adrenergicznych

sugerowany typ receptora	naczynie	gatunek	czynnik kurczący	literatura
β_3 -AR	aorta	szczur	fenylefryna	Rautureau i wsp., 2002 ^{1,2} ; Mallem i wsp., 2004 ^{1,2}
	tętnica szyjna	szczur	tromboksan A ₂	MacDonald i wsp., 1991
	miocyty żyły wrotnej	szczur		Viard i wsp., 2000 ^{1,2}
	tętnica płucna	pies szczur	noradrenalina hipoksja	Tagaya i wsp., 1999 ¹ Dumas i wsp., 1998
	tętnica piersiowa wewnętrzna	człowiek	fenylefryna	Shafiei i wsp., 2000 ¹ ; Rozec i wsp., 2005 ²
	tętnica pępkowa	człowiek	serotonina	Dennedy i wsp., 2002 ¹
	tętnica wieńcowa	człowiek	KCl (60mM), endotelina 1	Dessy i wsp., 2004 ^{1,2}
atypowy receptor	tętnica szyjna	szczur	noradrenalina	Oriowo, 1994, 1995 ¹
	aorta	szczur	fenylefryna	Brawley i wsp., 2000 ¹
β -AR	tętnica krezkowa	szczur	fenylefryna, serotonina	Kozłowska i wsp., 2003 [28]
	tętnica piersiowa wewnętrzna	człowiek	fenylefryna	Shafiei i wsp., 2000 ¹
	tętnica płucna	człowiek	fenylefryna	Kozłowska i wsp., 2005 [30]

można wykluczyć także w doświadczeniach, w których izolowane naczynia krwionośne kurczono za pomocą czynników niemających powinowactwa do receptorów α_1 -AR, takich jak serotonina, hipoksja czy trombosan A_2 (Tabela III).

Czy działanie ligandów receptorów β_3 -AR i β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa związane jest z ich wpływem na śródbłonek czy mięśniówkę gładką naczyń? W szeregu prac badających ten problem uzyskano różnorodne wyniki, skomplikowane teraz dodatkowo właściwościami α_1 -adrenolitycznymi większości użytych związków. Obecnie najbardziej prawdopodobna hipoteza dotyczy działania hiperpolaryzacyjnego badanych związków, które pobudzając receptory β -AR, prowadziłyby do wypływu jonów potasu z komórki przez specyficzne kanały potasowe zależne między innymi od jonów wapnia (K_{Ca}). Takie działanie agonistów receptorów β_3 -AR zostało wykazane między innymi na naczyniach płucnych szczura i wieńcowych człowieka kurczonych odpowiednio pod wpływem hipoksji i za pomocą endoteliny 1 (Tabela III).

Jakie jest znaczenie niewrażliwego na klasycznych antagonistów receptorów β -AR działania rozkurczowego agonistów receptorów β -AR? Biorąc pod uwagę omówione powyżej problemy metodyczne, trudno odpowiedzieć na to pytanie. Uzyskiwano co prawda aż 100% relaksację, ale w zakresie wysokich stężeń mikromolarnych. Ponadto w doświadczeniach wykonanych na szczurach odrdzienionych [8], w których równolegle oceniano wpływ agonistów receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa na parametry sercowe i naczyniowe, stwierdzono, że zarówno CGP 12177, jak i cyjanopindolol stosowane w dawkach, które stymulują maksymalną lub prawie maksymalną odpowiedź inotropową i chronotropową dodatnią, tylko w niewielkim i nieistotnym stopniu zwiększają krótkotrwale ciśnienie krwi (maksymalnie o niecałe 10 mmHg) i jedynie ich najwyższa dawka zwiększa przepływ krwi przez tętnicę krezkową, a wpływ ten nie jest związany z pobudzeniem receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa [8]. Określenie potencjalnego udziału receptorów β -AR niewrażliwych na propranolol w naczyniach krwionośnych w regulacji układu krążenia wymaga dalszego wyjaśnienia. Niewykluczone bowiem, że działanie to jest nasilone w warunkach patologicznych, np. nadciśnieniu czy cukrzycy.

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę wyniki najnowszych badań, w chwili obecnej sugeruje się, że w sercu człowieka oprócz wrażliwych na propranolol (i innych klasycznych antagonistów receptorów β -AR) odpowiedzialnych za pobudzenie pracy serca receptorów β_1 -AR i receptorów

β_2 -AR występują niewrażliwe na propranolol receptory – β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa i β_3 -AR. Pobudzenie receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa prowadzi do dodatniego efektu chronotropowego, inotropowego i lusitropowego, a stymulacja receptorów β_3 -AR indukuje ujemny efekt inotropowy. W niewydolności mięśnia sercowego dochodzi do zmniejszenia liczby receptorów β_1 -AR o wysokim i niskim stanie powinowactwa, zwiększenia gęstości receptorów β_3 -AR, przy niezmienionej liczbie receptorów β_2 -AR. Rozszerzenie naczyń krwionośnych zachodzi za pośrednictwem receptorów β_2 -AR. Natomiast sugerowane działanie rozszerzające naczynia receptorów β_1 -AR o niskim stanie powinowactwa oraz receptorów β_3 -AR wciąż wymaga dokładnego sprawdzenia zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologii.

Piśmiennictwo

1. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA, Adrenoceptors, β . In: Guide to Receptors and Channels. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 10.
2. Kaumann AJ, Molenaar P. Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 355: 667-81.
3. Brodde OE, Leineweber K. Autonomic receptor systems in the failing and aging human heart: similarities and differences. *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 167-76.
4. Xiao RP, Zhu W, Zheng M, et al. Subtype-specific β -adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 358-65.
5. Malinowska B, Schlicker E. Mediation of the positive chronotropic effect of CGP 12177 and cyanopindolol in the pithed rat by atypical β -adrenoceptors, different from β_3 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 943-9.
6. Kaumann AJ, Molenaar P. Differences between the third cardiac β -adrenoceptor and the colonic β_3 -adrenoceptor in the rat. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 2085-98.
7. Malinowska B, Schlicker E. Further evidence for differences between cardiac atypical β -adrenoceptors and brown adipose tissue β_3 -adrenoceptors in the pithed rat. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1307-14.
8. Zakrzaska A, Schlicker E, Kwolek G, et al. Positive inotropic and lusitropic effects mediated via the low-affinity state of β_1 -adrenoceptors in pithed rats. *Br J Pharmacol* 2005 Sep 5; [w druku].
9. Kaumann AJ, Preitner F, Sarsero D, et al. (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative β_4 -adrenoceptors in both wild-type and β_3 -adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 670-5.
10. Kaumann AJ, Engelhardt S, Hein L, et al. Abolition of (-) CGP 12177-evoked cardiostimulation in double β_1/β_2 -adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of β_1 -adrenoceptor for putative β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001; 363: 87-93.
11. Baker JG. Site of action of β -ligands at the human β_1 -adrenoceptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313: 1163-71.
12. Baker JG, Hall IP, Hill SJ. Agonist actions of „ β -blockers” provide evidence for two agonist activation sites or conformations

- of the human beta1-adrenoceptor. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1312-21.
13. Bundkirchen A, Brixius K, Bolck B, et al. Bucindolol exerts agonistic activity on the propranolol-insensitive state of β_1 -adrenoceptors in human myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 794-801.
 14. Joseph SS, Lynham JA, Molenaar P, et al. Intrinsic sympathomimetic activity of (-)-pindolol mediated through a (-)-propranolol-resistant site of the β_1 -adrenoceptor in human atrium and recombinant receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 368: 496-503.
 15. Sarsero D, Russell FD, Lynham JA, et al. (-)-CGP 12177 increases contractile force and hastens relaxation of human myocardial preparations through a propranolol-resistant state of the β_1 -adrenoceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 367: 10-21.
 16. Sarsero D, Molenaar P, Kaumann AJ, et al. Putative β_2 -adrenoceptors in rat ventricle mediate increases in contractile force and cell Ca^{2+} : comparison with atrial receptors and relationship to (-)-[3H]-CGP 12177 binding. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1445-60.
 17. Lewis CJ, Gong H, Brown MJ, et al. Overexpression of β_1 -adrenoceptors in adult rat ventricular myocytes enhances CGP 12177A cardiostimulation: implications for 'putative' β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 813-24.
 18. Kaumann AJ. (-)-CGP 12177-induced increase of human atrial contraction through a putative third β -adrenoceptor. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 93-8.
 19. Kompa AR, Summers RJ. Desensitization and resensitization of β_1 - and putative β_4 -adrenoceptor mediated responses occur in parallel in a rat model of cardiac failure. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1399-406.
 20. Freestone NS, Heubach JF, Wettwer E, et al. β_4 -adrenoceptors are more effective than β_1 -adrenoceptors in mediating arrhythmic Ca^{2+} transients in mouse ventricular myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 360: 445-56.
 21. Lowe MD, Grace AA, Kaumann AJ. Blockade of putative β_4 - and β_1 -adrenoceptors by carvedilol in ferret myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 359: 400-3.
 22. Lowe MD, Lynham JA, Grace AA, et al. Comparison of the affinity of β -blockers for two states of the β_1 -adrenoceptor in ferret ventricular myocardium. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 451-61.
 23. Gauthier C, Langin D, Balligand JL. β_3 -adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 426-31.
 24. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, et al. Upregulation of β_3 -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 2001; 103: 1649-55.
 25. Cheng HJ, Zhang ZS, Onishi K, et al. Upregulation of functional β_3 -adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circulation* 2001; 89: 599-606.
 26. Kohut TA, Takaoka H, McDonald P, et al. Augmentation of cardiac contractility mediated by the human β_3 -adrenergic receptor overexpressed in the heart of transgenic mice. *Circulation* 2001; 104: 2485-91.
 27. Tavernier G, Toumaniantz G, Erfanian M, et al. β_3 -adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human β_3 -adrenergic receptor. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 288-96.
 28. Kozłowska H, Szyska U, Schlicker E, et al. Atypical β -adrenoceptors, different from β_3 -adrenoceptors and probably from the low-affinity state of β_1 -adrenoceptors, relax the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 3-12.
 29. Brahmadevara N, Shaw AM, MacDonald A. α_1 -adrenoceptor antagonist properties of CGP 12177A and other β -adrenoceptor ligands: evidence against β_3 – or atypical β -adrenoceptors in rat aorta. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 781-7.
 30. Kozłowska H, Schlicker E, Kozłowski M, et al. Ligands at β_2 , β_3 , and the low-affinity state of β_1 -adrenoceptors block the α_1 -adrenoceptor-mediated constriction in human pulmonary and rat mesenteric arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 76-82.

Śródbłonkowe działanie aldosteronu – implikacje terapeutyczne płynące z badań podstawowych i klinicznych

Endothelial action of aldosteron – therapeutic implications from basic and clinical research

Ł. Drelicharz¹, J. Mikita², E. Chabielska², S. Chłopicki¹

¹ Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Katedra Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

² Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Akademia Medyczna, Białystok

Streszczenie

Aldosteron jest podstawowym hormonem regulującym gospodarkę wodno-elektrolitową ustroju. Jest produkowany i wydzielany w warstwie kłębkowatej kory nadnerczy, jak również w komórkach mięśnia sercowego i w ścianie naczyń krwionośnych.

Artykuł stanowi przegląd aktualnej wiedzy na temat roli aldosteronu w fizjologii i patologii układu sercowo-naczyniowego.

Autorzy przedstawili jądrowe i błonowe mechanizmy śródbłonkowego działania aldosteronu, w szczególności udział tych mechanizmów w wywoływaniu patologii układu sercowo-naczyniowego. Opisano także nowe wskazania terapeutyczne dla antagonistów receptorowych aldosteronu.

Abstract

Aldosterone is the main hormone regulating the water and electrolyte balance of the organism. It is produced and secreted by zona glomerulosa of the adrenal gland cortex, cardiomyocytes as well as by cells of the blood vessel wall. The article is the review of contemporary knowledge of the role of aldosterone in physiology and pathophysiology of cardiovascular system. The authors describe the nuclear and membrane mechanisms of endothelial action of aldosterone, especially their role in the development of cardiovascular system pathologies. New therapeutic indications for aldosterone receptor antagonists are also discussed.

Kardiologia Polska 2005; 63; 4 (Supl. 2): 409-419

Wprowadzenie

Aldosteron jest podstawowym hormonem regulującym gospodarkę wodno-elektrolitową ustroju. Wytwarzany jest w warstwie kłębkowatej (*zona glomerulosa*) kory nadnerczy. Za pośrednictwem receptorów cytoplazmatycznych zlokalizowanych w nabłonku kanalików nerkowych, jelit, gruczołów potowych i ślinianek aldosteron reguluje (re)absorbpcję Na⁺ i wody oraz sekrecję K⁺. Głównymi czynnikami stymulującymi korę nadnerczy do wydzielania aldosteronu są angiotensyna II i jony K⁺. Mniejsze znaczenie w regulacji wydzielania aldosteronu ma ACTH. Nawet niewielki wzrost aktywności układu renina-angiotensyna lub stężenia K⁺ w osoczu

mogą spowodować kilkukrotny wzrost wydzielania aldosteronu, podczas gdy ACTH odpowiada głównie za dobowe wahania poziomu aldosteronu [1–3].

Przez wiele lat uważano, że aldosteron jest produkowany i wydzielany jedynie przez komórki *zona glomerulosa* kory nadnerczy. Ostatnie lata przyniosły dowody na to, że aldosteron może być również produkowany w komórkach mięśnia sercowego, w ścianie naczyń krwionośnych, jak również w komórkach nerwowych. Receptory dla mineralokortykoidów znajdują się nie tylko w komórkach nabłonkowych nerek, jelit, gruczołów potowych i ślinianek, ale również w komórkach mięśnia sercowego, naczyń krwionośnych, tkanki mózgowej. Tak więc aldosteron, produkowany lokalnie

Adres do korespondencji:

Stefan Chłopicki, Zakład Farmakologii Doświadczalnej Katedry Farmakologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, ul. Grzegorzewska 16, 31-531 Kraków tel.: +48 12 421 11 68, +48 12 294 34 44, faks: +48 12 421 72 17, e-mail: mfschlop@cyf-kr.edu.pl

w ścianie naczyń lub w mięśniu sercowym, może wywierać bezpośrednie działanie na układ sercowo-naczyniowy, niezależnie od klasycznego nerkowego działania aldosteronu z kory nadnerczy na gospodarkę wodno-elektrolitową. Co więcej, w patologii układu krążenia aldosteron zyskuje coraz większe znaczenie jako lokalny przekaźnik, podczas gdy jego działanie hormonalne schodzi na dalszy plan.

Wciąż jednak niewiele wiadomo o fizjologicznej czynności aldosteronu wytwarzanego lokalnie. Być może w fizjologii lokalne działanie aldosteronu ma również związek z homeostazą elektrolitową komórki. Bez względu na te niejasności, intrygujący i ważny wydaje się fakt, że to patologiczne działanie aldosteronu ogniskuje się w śródbłonku.

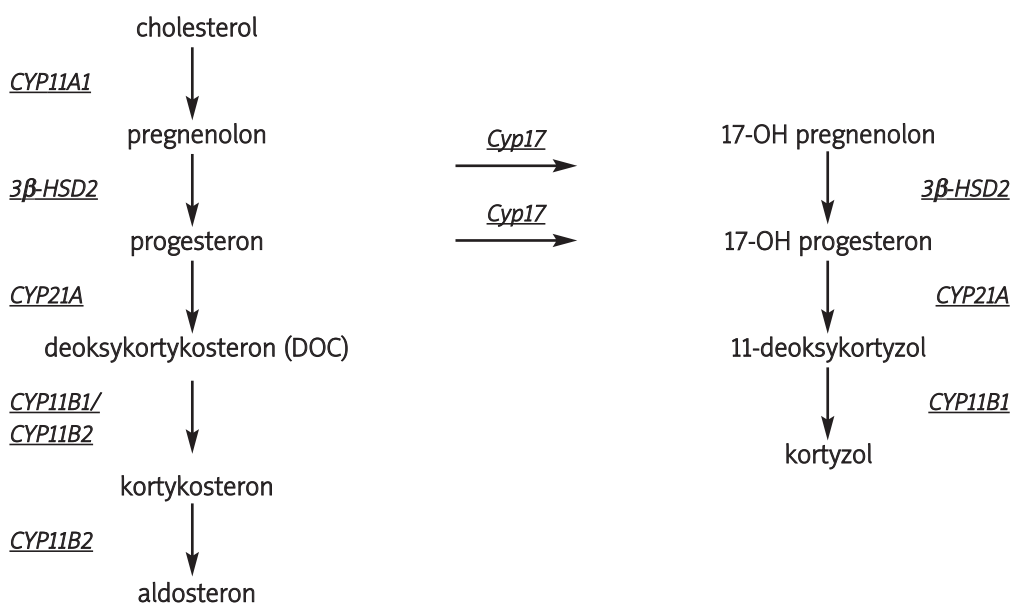
Śródbłonek naczyniowy nie jest *ptachtą celofanu* z *powklejanymi jądrami komórkowymi* oddzielającą przestrzeń wewnątrznaczyniową od otaczających tkanek, ale stanowi narząd wydzielniczy ustroju. Prawidłowy śródbłonek jest wyznacznikiem zdrowego układu sercowo-naczyniowego, a choroby układu krążenia, takie jak choroba niedokrwienna serca, nadciśnienie tętnicze, niewydolność serca, miażdżyca, zawsze przebiegają z pierwotnym lub wtórnym upośledzeniem funkcji śródbłonka. Prawidłowa czynność śródbłonka naczyniowego jest jednym z najważniejszych czynników rokowniczych we współczesnej kardiologii, a jego dysfunkcja często pierwszym objawem (niestety niemyym klinicznie) nadchodzącej choroby [4]. Patologiczne działanie aldosteronu na śródbłonek, wywołujące dysfunkcję śródbłonka, może więc mieć bardzo groźne skutki dla układu krążenia.

Istotnie, pacjenci z zespołem pierwotnego aldosteronizmu (PA) charakteryzują się częstszym występowaniem powikłań narządowych, takich jak przerost serca, tętniaki naczyń mózgowych i krwawienia podpajęczynówkowe, uszkodzenie nerek [5, 6]. Częstość powikłań jest niewspółmierna do nadciśnienia tętniczego towarzyszącego PA i zależy od wysokich wartości krążącego aldosteronu. Wyższy poziom aldosteronu, ale mieszczący się w granicach fizjologicznych, predysponuje do rozwoju nadciśnienia tętniczego u człowieka [7]. Badania CONSENSUS I i SAVE wykazały, że u pacjentów z niewydolnością serca podwyższone wartości krążącego aldosteronu korelują z gorszym rokowaniem.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie mechanizmów śródbłonkowego działania aldosteronu, a w szczególności udział tych mechanizmów w wywołaniu patologii układu sercowo-naczyniowego. Wynikają z tego bowiem nowe wskazania terapeutyczne dla antagonistów receptorowych aldosteronu (antagoniści receptora aldosteronowego – ARA).

Lokalna synteza aldosteronu w ścianie naczyń i w mięśniu sercowym

Synteza aldosteronu w warstwie kłębkowatej (*zona glomerulosa*) kory nadnerczy przebiega w kilku etapach (Rycina 1.). Ludzkie komórki śródbłonka i mięśni gładkich aorty i tętnicy płucnej wyposażone są w identyczny, pełny zestaw enzymów do produkcji aldosteronu *de novo* z cholesterolu. Aldosteron w tych komórkach może również powstawać z prekursorów krążących we krwi, np. z dezoksy-



Rycina 1. Biosynteza aldosteronu w korze nadnerczy

kortykosteronu (DOC). W przeciwieństwie do jednoznacznych dowodów co do zdolności komórek ściany naczyń do produkcji aldosteronu, nie ma takiej pewności co do tego, czy aldosteron wytwarzają komórki dojrzałego mięśnia sercowego w warunkach fizjologicznych [8, 9].

Istotnie, w kardiomiocytach ludzkiego serca wykryto transkrypcję genów niezbędnych do syntezy aldosteronu (tj. CYP11A1, CYP21A, 3 β -HSD typ 2), ale transkrypt genu syntazy aldosteronu (CYP11B2) wykryto jedynie w sercach płodowych [10] i w niewydolności serca [11], co może wskazywać na to, że synteza aldosteronu jest jednym z elementów fenotypu płodowego mięśnia sercowego, obecnego w sercach płodowych i uruchamianego w odpowiedzi przerostowej kardiomiocytów. Również po ostrym zawale serca stwierdzono pojawienie się transkrypcji genu CYP11B2 w mięśniu sercowym [12]. Co więcej, wykryto bezpośrednią korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA dla CYP11B2 a objętością kolumny w przewlekłej niewydolności serca [13–15].

Nie wszyscy autorzy jednak potwierdzają, że wytwarzanie aldosteronu zwiększa się w niewydolnym mięśniu sercowym. Dla przykładu Mizano i wsp. opisuje zwiększoną produkcję aldosteronu w niewydolnym sercu ludzkim, nie potwierdzają tego natomiast badania Tsutsamoto i wsp. [16, 17]. Kontrowersje budzi również intensywność lokalnej produkcji aldosteronu przez kardiomiocyty i udział *sercowej* produkcji aldosteronu w zmianach poziomu aldosteronu w osoczu.

Warto dodać, że aldosteron jest również produkowany w centralnym systemie nerwowym, gdzie odpowiada m.in. za centralną regulację ciśnienia tętniczego krwi [18–20]. Wykazano, że dokomorowe podanie ARA (RU-28318) normalizowało podwyższone ciśnienie tętnicze krwi (wywołane parenteralnym podaniem aldosteronu), ale nie zapobiegało narządowym (sercowym, naczyniowym, nerkowym) powikłaniom hiperaldosteronizmu [21].

Receptory dla aldosteronu

Od czasu izolacji i scharakteryzowania aldosteronu (przeszło 50 lat temu) zwykło się uważać, że jest on produkowany w korze nadnerczy i podobnie do wielu innych hormonów sterydowych działa przez swoisty receptor zlokalizowany w cytoplazmie komórek docelowych, w tym przypadku receptor dla mineralokortykoidów w komórkach nabłonkowych nerek, jelit, gruczołów potowych i ślinianek. Receptor dla mineralokortykoidów należy do nadrodziny receptorów jądrowych, do której należą również receptory dla glikokortykoidów, witaminy D, hormonów tarczycy, kwasu retinowego oraz tzw. receptory sieroce (*orphan receptors*). Receptory jądrowe po przyłączeniu ligandu (hormonu) przemieszczają się z cytoplazmy do jądra komórkowego i tam regulują procesy transkrypcji i translacji prowa-

dzące do syntezy białek odpowiedzialnych za transport jonów przez błonę komórkową komórek nabłonkowych. Jednak odkrycie bezpośredniego wpływu aldosteronu nie tylko na mięsień sercowy, naczynia krwionośne, ale również na limfocyty, erytrocyty i CSN oraz istnienie natychmiastowego *pozagenowego* działania aldosteronu na komórki docelowe każe nam zrewidować dotychczasowe rozumienie mechanizmów działania aldosteronu.

Klasyczny, jądrowy mechanizm działania aldosteronu

Cytoplazmatyczny receptor dla aldosteronu zbudowany jest z trzech domen, pełniących różne funkcje. Domena przy końcu karboksylowym odpowiada za łączenie się z hormonem, środkowa domena odpowiada za połączenie z DNA, a domena przy końcu aminowym za połączenie z innymi czynnikami regulującymi transkrypcję. Przyłączenie ligandu (hormonu) powoduje oddysocjowanie białek szoku cieplnego (HSP), dimeryzację receptora i przemieszczenie go z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do interakcji ze specyficznymi sekwencjami DNA, wywołującymi transkrypcję – tzw. elementami odpowiedzi na hormon (SREs *steroid response elements*) lub z regionami hamującymi transkrypcję (nSREs *negative steroid response elements*). Opisano również możliwość regulacji transkrypcji przez interakcję kompleksu hormon-receptor z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, a więc bez wiązania się z DNA [22, 23]. Ponieważ efekt biologiczny aldosteronu związany z aktywacją receptora jądrowego wymaga zmiany ekspresji genów i syntezy nowych białek, pierwsze zmiany czynności komórek i widoczny klinicznie efekt pojawiają się z kilkugodzinnym opóźnieniem. Selektywność działania aldosteronu zależy od obecności receptorów jądrowych dla mineralokortykoidów w tkankach docelowych. *In vitro* receptor dla mineralokortykoidów wykazuje podobne powinowactwo względem mineralo- jak i glikokortykoidów (GKS), co oznacza, że w komórce hormony te mogą konkurować o wiązanie w receptorem dla mineralokortykoidów i z receptorem zwiąże się ten hormon, którego stężenie w otoczeniu receptora będzie większe. Ponieważ poziom kortyzolu w osoczu jest 100–1 000 razy wyższy niż poziom aldosteronu, receptor dla mineralokortykoidów powinien być *zajęty* wyłącznie przez glikokortykoidy. Ten paradoks udało się rozwiązać dzięki odkryciu dehydrogenazy 11- β -hydroksysteroidowej typ 2 (11 β -HSD2). Ten enzym występuje w komórkach nabłonkowych, wrażliwych na aldosteron i rozkłada glikokortykoidy do pochodnych o niskim powinowactwie do receptorów dla mineralokortykoidów (u człowieka kortyzol do kortyzonu) i w ten sposób zapewnia tkankową selektywność aldosteronu [24]. Te badania ujawniają, że działanie

biologiczne aldosteronu może być ściśle związane z działaniem glikokortykoidów, w tkankach docelowych posiadających receptor dla mineralokortykoidów, a nieposiadających 11 β -HSD2. Równocześnie świadczą o tym, że zmiany aktywności 11 β -HSD2 mogą w istotny sposób modulować wrażliwość tkanek na aldosteron i glikokortykoidy. 11 β -HSD2 wykryto w kardiomiocytach [25], w komórkach mięśni gładkich naczyń [26] i w śródbłonku [27], tzn. w tych komórkach, które odpowiadają za patologiczne działania aldosteronu w układzie krążenia.

Pozagenowy mechanizm działania aldosteronu

Warto zaznaczyć, że pierwsze dowody świadczące o *pozagenowym*, szybkim działaniu aldosteronu pochodzą sprzed ponad 40 lat! W 1964 r. Klein i Henk wykazali, że u zdrowych ludzi dożylnie podanie aldosteronu w ciągu 5 min wywoływało wzrost oporu obwodowego i spadek rzutu serca [28]. Tak szybki efekt działania aldosteronu nie mógł być wytłumaczony klasycznym, jądrowym mechanizmem działania aldosteronu. Rok później Spach i Streen wykazali wpływ aldosteronu na błonowy transport jonów Na⁺ w erytrocytach [29]. Już wtedy nie było wątpliwości, że chodzi o działanie *pozagenowe* aldosteronu erytrocyty nie posiadają przecież jądra komórkowego.

Znaczenie biologiczne *pozagenowego* mechanizmu działania aldosteronu potwierdzono w wielu modelach eksperymentalnych i w różnych typach komórek, m. in. w komórkach mięśni gładkich naczyń, limfocytach, komórkach śródbłonka, kardiomiocytach, komórkach nabłonkowych jelit i nerek [1, 30–33].

Choć nie zidentyfikowano jeszcze receptora błonowego dla aldosteronu odpowiedzialnego za *pozagenowe* skutki działania aldosteronu [32], wiadomo, że jego aktywacja prowadzi do uruchomienia mechanizmów wtórnego przekazywania zależnych od diacyloglicerolu (DAG), trójforanu inozytoli (IP₃), kinazy białkowej C (PKC), cAMP [33–36], co doprowadza (w ciągu 2–3 min) do zmian aktywności wymiennika Na⁺/H⁺ (NHE3), kanałów K⁺ oraz innych białek odpowiedzialnych za równowagę elektrolitową komórki oraz poziom [Ca²⁺]_i. Warto dodać, że istnieje wiele dowodów na to, że receptor błonowy i receptor jądrowy funkcjonują niezależnie. Dla przykładu, w fibroblastach myszy genetycznie pozbawionych receptora MR (MR *knockout*) aldosteron wywoływał *natychmiastowy* wzrost poziomu [Ca²⁺]_i i cAMP [37]. Z drugiej strony zablokowanie receptora jądrowego dla mineralokortykoidów przez spironolakton lub kanrenon nie wpływało na *natychmiastowe* działanie aldosteronu (wzrost [Ca²⁺]_i i IP₃) w komórkach śródbłonka [38, 39]. Ciekawe, że eplerenon, RU-28318 i spi-

ronolakton hamowały natychmiastowy napływ jonów Na⁺ i wzrost poziomu [Ca²⁺]_i w mięśniówce gładkiej naczyń [40, 41]. Pomimo więc odrębności receptora jądrowego i błonowego i uruchamianych przez nie szlaków sygnałowych, istnieje możliwość, że niektóre leki z grupy antagonistów aldosteronu wpływają na jądrowe i błonowe skutki działania aldosteronu.

Warto dodać, że istnieje również taka możliwość, że niektóre skutki działania aldosteronu, które przypisuje się działaniu *pozagenowemu*, mogą jednak wynikać z pobudzenia klasycznego receptora MR w cytoplazmie. *Szybka ścieżka* sygnalizacyjna uruchamiana przez aktywację receptora jądrowego może być związana np. z aktywacją białek jądrowych, np. HSP90 i HSP70, które oddysocjują od receptora po przyłączeniu ligandu (hormonu) i aktywują system wtórnych przekaźników w cytoplazmie [42].

Podsumowując, zarówno jądrowe, jak i błonowe mechanizmy działania aldosteronu odgrywają rolę w działaniu aldosteronu na układ sercowo-naczyniowy, jednak powiązania pomiędzy nimi i szlaki sygnalizacyjne nie są do końca poznane.

Patologiczne działanie aldosteronu na śródbłonek naczyń krwionośnych

Fenotyp zdrowego śródbłonka wyznacza wytwarzanie naczynioprotekcyjnych przekaźników, takich jak tlenku azotu (NO) tworzony z L-argininy przez homodimer oksydoreduktazy NOS-3, prostacyklina (PGI₂) wytwarzana z kwasu arachidonowego (AA) przez cyklooksygenazy COX-1 lub COX-2, EDHF (śródbłonkowy czynnik hyperpolaryzacyjny) i wyciszenie aktywności przeciwwzapalnych i przeciwzakrzepowych mechanizmów śródbłonka (np. IL-6, ICAM, PAI-1). Z drugiej fenotyp dysfunkcji śródbłonka wyznaczają upośledzenie wytwarzania przekaźników naczynioprotekcyjnych, nadmierne wytwarzanie anionu nadtlenkowego (O₂⁻) przez oksydazy (np. NAD (P) H-zależną albo ksantynową lub przez monomer NOS-3) i zwiększona ekspresja prozapalnych cytokin (np. IL-6, IL-8), chemokin (np. MCP-1) cząsteczek adhezyjnych (np. selektyna P, selektyna E, ICAM-1, VCAM-1) oraz aktywacja prozakrzepowych mechanizmów śródbłonka (np. PAI-1) [43]. Wiele jest mechanizmów przyczyniających się do rozwoju dysfunkcji śródbłonka. Ostatnie lata wskazują na to, że w niektórych patologiach układu krążenia winowajcą dysfunkcji śródbłonka może być aldosteron.

Aldosteron i aktywność śródbłonkowego NO

Aldosteron upośledza aktywność biologiczną śródbłonkowego NO. Zarówno podany jednorazowo dożylnie

nie [44], jak i podawany długoterminowo [45] aldosteron upośledza odpowiedź rozkurczową naczyń na acetylocholinę, która zależy od śródbłonkowego NO. U pacjentów z niewydolnością krążenia, jak również w modelach zwierzęcych pozawatowej niewydolności krążenia zastosowanie antagonistów receptora MR spironolaktonu lub eplerenonu związane było z normalizacją zależnej od NO funkcji śródbłonka [44, 46–48]. W jakim mechanizmie aldosteron może wywoływać upośledzenie aktywności śródbłonkowego NO? Sugeruje się, że aldosteron ma wpływ zarówno na ekspresję NOS-3 w śródbłonku, jak i na wytwarzanie anionów ponadtlenkowych (O_2^-). Anion ponadtlenkowy jawi się dzisiaj jako ważny czynnik regulacji aktywności biologicznej NO, bowiem w jednej z najszybszych znanych reakcji, dokonującej się pomiędzy dwoma wolnymi rodnikami NO i O_2^- unieczynnia NO, tworząc nadtlenoazotyn ($ONOO^-$).

Istotnie wykazano, że aldosteron nasila, a antagoniści receptora dla aldosteronu (ARA) zmniejszają wytwarzanie anionu ponadtlenkowego, zależne od oksydazy NADPH w ścianie naczyń krwionośnych i w mięśniu sercowym [47, 49–53]. Wykazano również, że zastosowanie ARA (eplerenon) prowadzi do zwiększenia ekspresji eNOS w śródbłonku u szczurów z nadciśnieniem [54, 55]. Zmniejszenie *stresu oksydacyjnego* przez probucol lub N-acetylocysteinę również zmniejszało powikłania narządowe wywołane przez aldosteron [56–58]. Można więc sądzić, że aldosteron zmniejsza aktywność biologiczną NO, nie tylko nasilając rozpad NO, ale również zmniejszając ekspresję syntazy NO. Warto dodać, że nadtlenoazotyn ($ONOO^-$) powstający w reakcji NO i O_2^- nitruje tyrozynę 430 i unieczynnia również syntazę prostacykliny (PGI-S). Jak dotąd brak jednak przekonujących danych świadczących o istnieniu bezpośredniej zależności między aktywnością aldosteronu a produkcją PGI_2 przez śródbłonek. Paradoksalnie wykazano, że prostacyklina może być mediatorem dysfunkcji śródbłonka wywołanej przez aldosteron [59]. Jednak do tej pracy można mieć dużo zastrzeżeń merytorycznych.

Wykazano również, że aldosteron wpływa na przezłonowy transport jonów w ludzkich komórkach śródbłonka (HUVECSs), powodując obrzęk komórek zależny od aktywacji kanałów Na^+ . Fizjologiczne znaczenie tego zjawiska nie jest jednak poznane [60].

Ciekawe, że aldosteron zmniejsza aktywność biologiczną NO za pośrednictwem podobnych mechanizmów jak angiotensyna II. Rzeczywiście, blokada aldosteronu hamowała *stres oksydacyjny* w ścianie naczyń wywołany przez angiotensynę II [51]. Czyżby więc aldosteron był faktycznym wykonawcą aktywacji mechanizmów wolnorodnikowych w ścianie naczyń uruchamianych przez angiotensynę II?

Aldosteron i aktywacja zapalna śródbłonka

Zwykle upośledzenie biologicznej aktywności NO idzie w parze z rozbujającą aktywnością zapalną śródbłonka. Tak też jest w przypadku działania aldosteronu na ścianę naczyń. Jego toksyczne działania na ścianę naczyń wyznaczają procesy odpowiedzi zapalnej naczyń, które mogą doprowadzić do uszkodzenia nie tylko samej ściany naczyń, ale również otaczających je tkanek [61–65]. Na poziomie morfologicznym egzogeny aldosteron może wywołać zapalenie okołonaczyniowe z pogrubieniem warstwy środkowej, naciekiem leukocytów i proliferacją tkanki łącznej okołonaczyniowej z towarzyszącą martwicą ogniskową, nie tylko w sercu, ale również w nerkach oraz tkance mózgowej [62, 66, 67]. Co najważniejsze, Rocha i wsp. [68] wykazali, że zmiany morfologiczne w naczyniach i tkance okołonaczyniowej są poprzedzone pojawieniem się fenotypu zapalnego śródbłonka w naczyniach wieńcowych obejmującego wzrost ekspresji COX-2, MCP-1, osteopontyny, ICAM-1, VCAM-1. W tych doświadczeniach eplerenon hamował zarówno pojawienie się fenotypu zapalnego śródbłonka, jak i późniejsze, pozapalne zmiany morfologiczne naczyń wieńcowych.

Warto dodać, że hamujące działanie eplerenonu na fenotyp zapalny śródbłonka, w tym na ekspresję molekuł adhezyjnych (ICAM-1 i VCAM-1) [54], jest związane ze wzrostem ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenu azotu.

Poza powyższymi stwierdzeniami mechanizmy, w jakich aldosteron indukuje odpowiedź zapalną śródbłonka, nie są poznane. Wydaje się, że wraz z aldosteronem uczestniczą w niej inne układy przekaźnikowe (układ renina-angiotenzyna, endotelina), a wzajemne zależności pomiędzy nimi są bardzo złożone. Istotnie, udowodniono, że nie tylko ARA [68–70], ale również antagonizm receptorów angiotensynowych (AT_1) [71–73] i endotelinowych (ET_A) [63, 74, 75] chronił serce czy nerki przed uszkodzającym działaniem aldosteronu.

Ponadto zmniejszanie poziomu $[Ca^{2+}]_i$ przez dihydropirydyny [76] lub blokery kanałów Ca^{2+} typu T oraz hamowanie wymiennika Na/H przez celiporid [77] hamowały proces zapalny w ścianie naczyń, a w konsekwencji również toksyczne działanie aldosteronu na narządy (serce, nerki). Intrygujące jest więc przypuszczenie, że mechanizmy pośredniczące w odpowiedzi śródbłonka na aldosteron mają związek z homeostazą jonową komórki.

Aldosteron i mechanizmy prozakrzepowe śródbłonka

Aktywacja zapalna śródbłonka jest ściśle związana z fenotypem prozakrzepowym śródbłonka. Znów profil działania aldosteronu na śródbłonek zdaje się potwierdzać te zależności. Z jednej strony aldosteron aktywuje

mechanizmy prozakrzepowe śródbłonka, z drugiej hamuje śródbłonkowe mechanizmy fibrynolizy.

W hodowlach komórkowych śródbłonka, jak również i innych komórek, aldosteron zwiększa ekspresję inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) i to działanie zależne jest od receptora dla mineralokortykoidów [78, 79]. Istotnie, w promotorze genu kodującego PAI-1 odkryto miejsce wrażliwe na działanie gliko- i mineralokortykoidów (*Glucocorticoid Responsive Element* – GRE), zaś mutacja w tym regionie znosi oddziaływanie aldosteronu na aktywność PAI-1 [78].

W badaniach doświadczalnych w modelach zwierzęcych dożylnie podanie aldosteronu przyspieszało formowanie zakrzepu tętniczego [80] jak też mikrangiopatii zakrzepowej u szczurów z nadciśnieniem samoistnym ze skłonnością do udarów (SHRSP) [81]. Natomiast w modelu mysim miażdżycy (myszy LDLR^{-/-}), 18-tygodniowa infuzja spironolaktonu wydłużała czas powstawania zakrzepu tętniczego. Ten efekt był związany z poprawą aktywności śródbłonkowego NO, co wskazuje że zmiany aktywności PAI-1, tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) i NO są powiązane [80].

Z kolei w badaniach klinicznych stwierdzono, że istnieje korelacja między podwyższonym stężeniem aldosteronu a stężeniem antygeny PAI-1 w osoczu u pacjentów z nadciśnieniem i pierwotnym hyperaldosteronizmem [78, 82, 83]. U pacjentów z nadciśnieniem leki z grupy ARA obniżały stężenie PAI-1 [78, 84], oraz zwiększały stężenie t-PA [82, 84].

Tak więc aldosteron ma działanie prozakrzepowe zależne od śródbłonkowej aktywności PAI-1 i t-PA oraz od NO. Przeciwwzakrzepowe działanie NO jest nie tylko związane z jego działaniem na aktywność PAI-1 [85] i tPA [86], ale również z działaniem przeciwtytkowym tego przekaźnika.

Istotnie w pozawałowej niewydolności serca u szczurów podwyższona aktywność płytek krwi była tłumiona przez eplerenonem. Świadczyły o tym obniżenie ekspresji płytkowej P-selektyny oraz zmniejszenie wiązania fibrynogenu z receptorem GPIIb/IIIa. To przeciwtytkowe działanie eplerenonu zależne było częściowo od tlenu azotu [87].

Działanie śródbłonkowe aldosteronu a włóknienie

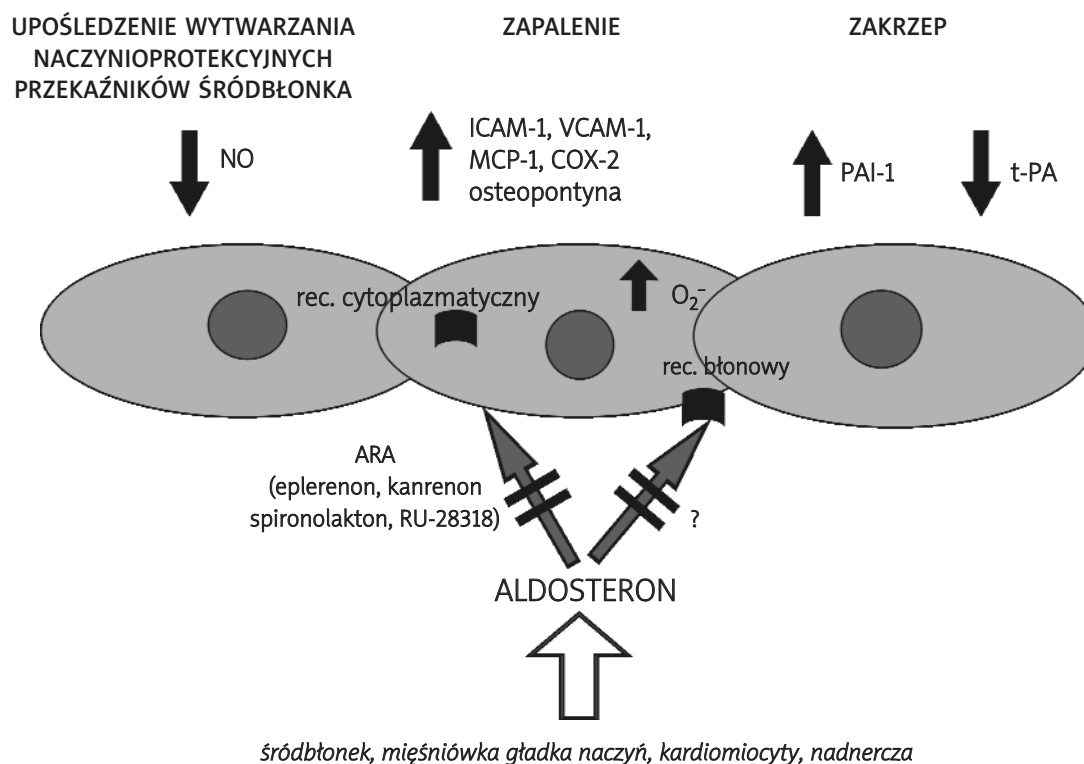
W badaniach klinicznych wielokrotnie podkreślano, że antagoniści aldosteronu zmniejszają włóknienie serca, co może sugerować bezpośredni wpływ aldosteronu na fibroblasty i syntezę kolagenu. Istotnie, w wielu eksperymentalnych modelach podwyższony poziom aldosteronu korelował z włóknieniem podścieliska w mięśni sercowym i nerkach [88-91], a leki z grupy ARA hamowały ten proces. Kontrowersje budzi jednak mecha-

nizm, w jakim aldosteron stymuluje fibroblasty i nasila odkładanie się kolagenu (głównie typu I i III). Badania *in vitro* nad bezpośrednim wpływem aldosteronu na fibroblasty przynoszą sprzeczne dane [92-94]. Większość badaczy przychyliła się do opinii, że włóknienie jest konsekwencją zapalenia i uszkodzenia ścian naczyń, ogniskowej martwicy okołonaczyniowej [95, 96] oraz zwiększenia przez aldosteron m.in. syntezy receptora AT₁ [15], enzymu konwertującego (ACE) [97], endoteliny [98] i receptorów endoteliny [99], a także receptora B₂ (bradykininy) [100]. Powyższe szlaki mają udowodniony bezpośredni lub pośredni wpływ na procesy włóknienia. Również dynamika procesu przemawia za pośrednim mechanizmem działania aldosteronu, ponieważ wzrost sercowego kolagenu zależny od aldosteronu nie jest natychmiastowy i pojawia się po kilku tygodniach [95, 101], natomiast zmiany zapalne i markery zapalenia już po tygodniu podawania aldosteronu [102].

Włóknienie okołonaczyniowe i podścieliska jest więc skutkiem procesu zapalnego toczącego się w ścianie naczyń, u którego podstaw leży, zależne od aldosteronu, upośledzenie ochronnej czynności śródbłonka i aktywacja zapalna śródbłonka. Skuteczność ARA w hamowaniu procesu włóknienia może więc również mieć podłoże śródbłonkowe.

Działanie śródbłonkowe aldosteronu a jego działanie proarytmiczne

Aldosteron wywiera działanie proarytmiczne, choć mechanizm nie jest do końca poznany. Wywołując zaburzenia elektrolitowe (spadek K⁺, Mg²⁺), przerost, włóknienie miocardium, dysfunkcję skurczową i rozkurczową serca, hamowanie wychwytu katecholamin i wzrost gęstości receptorów β-adrenergicznych, aldosteron może pośrednio doprowadzać do wystąpienia arytmii komorowych [103, 104]. Również bezpośredni wpływ aldosteronu na kardiomiocyt wydaje się mieć niebagatelne znaczenie. Wydłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego (*action potential duration*, APD) w wyniku tzw. remodelingu elektrycznego jest odpowiedzialne za arytmie w przerostym mięśniu sercowym. Udowodniono, że aldosteron nasila prąd Ca²⁺ (I_{Ca}) oraz hamuje prąd K⁺ (I_{Ko}), co doprowadza do wydłużenia APD i może odpowiadać za efekt proarytmiczny aldosteronu. Zastosowanie RU-29318 (selektywnego antagonisty receptorów dla mineralokortykoidów) hamowało *remodeling* elektryczny po zawale serca u szczurów [105]. Podobnie spironolakton u pacjentów z niewydolnością serca zmniejsza ilość arytmii komorowych i incydentów nagłej śmierci sercowej (*sudden cardiac death*, SCD) [106]. Kliniczny efekt ARA na ilość incydentów SCD może być również związany z zależnymi od śródbłonka zmianami aktywności autonomicznego układu nerwowego. Aldosteron



Rycina 2. Działanie śródbłonkowe aldosteronu

powoduje wzrost impulsacji adrenergicznej i spadek aktywności nerwu błędnego. Ten efekt działania aldosteronu zależy od zmniejszenia wrażliwości baroreceptorów naczyniowych oraz od bezpośredniego jego wpływu na ośrodki naczynioruchowe w CSN [107]. ARA udowodniły swoją skuteczność w zwiększaniu wrażliwości baroreceptorów naczyniowych i poprawie czynności układu autonomicznego [108]. Co więcej, zmniejszenie wrażliwości baroreceptorów jest prawdopodobnie skutkiem dysfunkcji śródbłonka naczyniowego wywołanej przez aldosteron. Wang i wsp. wykazali, że wpływ aldosteronu na baroreceptory zatoki szyjnej psa znika po usunięciu śródbłonka [103].

Centralna rola dysfunkcji śródbłonka w patologicznym działaniu aldosteronu na układ krążenia

Utrata ochronnej funkcji śródbłonka ma fundamentalne znaczenie w rozwoju patologii układu krążenia. Wydają się, że nadmierna aktywacja aldosteronu może do tego prowadzić. Istotnie, aldosteron upośledza zdolność śródbłonka do wytwarzania NO, jak również indukuje odpowiedź zapalną i mechanizmy prozakrzepowe

śródbłonka. Konsekwencją tego jest zaburzenie homeostazy ściany naczyń, szerzący się proces zapalny i uszkodzenie naczyń, serca i nerek. Przerywając patologiczny wpływ aldosteronu na śródbłonek, można hamować, a nawet odwracać zależne od aldosteronu uszkodzenia układu krążenia, czego najlepszym dowodem jest kliniczna skuteczność antagonistów aldosteronu. Czy potwierdzone w wielu badaniach klinicznych, przeciwwłóknieniowe i przeciwartymiczne działanie ARA ma również związek z działaniem śródbłonkowym aldosteronu, pozostaje do wyjaśnienia.

Wzajemne powiązania pomiędzy angiotensyną II i aldosteronem

ARA oraz inhibitory ACE (lub antagoniści receptora AT₁) wykazują podobną skuteczność kliniczną m.in. w redukcji nadciśnienia tętniczego, przerostu lewej komory serca, mikroalbuminurii. Jednak obie grupy leków wykazują synergizm działania, jeśli zastosowane są łącznie [109]. Świadczy to o istnieniu istotnej klinicznie interakcji między angiotensyną II a aldosteronem. Z jednej strony moglibyśmy się spodziewać, że hamowanie syntezy ATII (inhibitory ACE) lub blokowanie jej

receptorów (antagoniści receptora AT_1) zmniejsza produkcję aldosteronu. Z drugiej strony aldosteron zwrotnie hamuje układ renina-angiotensyna zgodnie z zasadą ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Istnieją silne dowody kliniczne na to, że aldosteron *ucieka* spod hamującego wpływu inhibitorów ACE i/lub antagonistów receptora AT_1 u leczonych przewlekle pacjentów z niewydolnością serca [110]. Nie ma pewności, jak wytłumaczyć to zjawisko. Sugeruje się wiele hipotez. Być może znaczenie ma również to, że ATII nie jest jedynym czynnikiem stymulującym produkcję aldosteronu, choć równie silnym są jony K^+ . Istotnie, u myszy genetycznie pozbawionych angiotensynogenu, u których poziom ATII jest nieoznaczalny, prawidłowa produkcja aldosteronu regulowana jest przez poziom K^+ [111].

Z drugiej strony, aldosteron wpływa również na syntezę ATII, nasilając ją! Udowodniono, że aldosteron zwiększa ekspresję mRNA dla ACE w kardiocytach szczura [112]. Również u ludzi z niewydolnością serca wykazano, że spironolakton hamuje konwersję ATI do ATII [113]. Dodatkowo aldosteron nasila biologiczny efekt ATII przez wzrost syntezy receptorów AT_1 i spadek ekspresji receptorów AT_2 [15, 51, 114, 115].

Podsumowując, istnieje silny synergizm działania pomiędzy aldosteronem i ATII, a dodatnie sprzężenie nasila produkcję obu przekaźników. W wielu modelach eksperymentalnych wykazano, że ARA hamują działanie biologiczne ATII. Wydaje się więc, że przynajmniej część efektów biologicznych przypisywanych ATII w rzeczywistości jest efektem działania samego aldosteronu lub jest skutkiem wzmocnienia toksycznego działania ATII przez aldosteron, m.in. przez wzrost gęstości receptorów AT_1 i spadek receptorów AT_2 . Z drugiej strony, odosobnione zahamowanie aldosteronu może być niewystarczające do powstrzymania rozbijającej aktywności ATII i aldosteronu i konieczne jest łączne podawanie inhibitorów ACE (lub antagonistów receptora AT_1) razem z ARA.

Czy nadchodzi era antagonistów aldosteronu w kardiologii?

W ostatnich latach ukazały się dwa duże, randomizowane badania dotyczące skuteczności ARA w leczeniu niewydolności serca. W badaniu RALES oceniano efekt dodania spironolaktonu do optymalnej (β -adrenolityk, inhibitor ACE, diuretyk) terapii u pacjentów z zaawansowaną zastoinową niewydolnością serca. Natomiast w badaniu EPHESUS stosowano eplerenon u pacjentów z pozawałową dysfunkcją lewej komory, leczonych wg dotychczasowych standardów. Wyniki obu badań wskazują, że dodanie ARA do optymalnej terapii niewydolności serca wiąże się ze znaczną redukcją śmiertelności z powodów sercowo-naczyniowych [116, 117].

Badania RALES i EPHESUS wprowadziły ARA (spironolakton i eplerenon) do *elitarniej* grupy leków zmniejszających śmiertelność u pacjentów z niewydolnością serca. Wyniki tych badań znalazły odzwierciedlenie w najnowszych wytycznych leczenia niewydolności serca Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego z 2005 r. Obecnie stosowanie ARA zaleca się u pacjentów z zaawansowaną niewydolnością skurczową serca (klasa NYHA III i IV) oraz u pacjentów po zawale serca z dysfunkcją skurczową i objawami niewydolności serca lub cukrzycą [118]. Kliniczna skuteczność ARA w grupie pacjentów z łagodną niewydolnością serca (klasa NYHA I i II) musi zostać potwierdzona w dużych, randomizowanych badaniach, podobnie jak skuteczność tych leków w innych schorzeniach obciążonych dużym ryzykiem sercowo-naczyniowym. Szczególnie ARA mogą się okazać bardzo skuteczne w ochronie takich narządów jak serce, nerki i mózg. Istnieją dane potwierdzające skuteczność ARA w zmniejszaniu masy lewej komory i mikroalbuminurii u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym [109]. W modelach eksperymentalnych ARA zmniejszały powikłania nadciśnienia tętniczego i cukrzycy, tj. udary mózgu, przerost/niewydolność serca, uszkodzenie nerek (proteinurię, włóknienie i szklwienie kłębuszków nerkowych) [1, 119]. Również w zwierzęcych modelach miażdżycy ARA udowodniły swoją skuteczność: poprawiają czynność śródbłonna naczyniowego, zmniejszają generację wolnych rodników tlenowych przez ścianę naczyń, ROS, hamują aktywację makrofagów i powstawanie ox-LDL, a w konsekwencji hamują rozwój *atherothrombosis* [53, 65, 120].

Podsumowując, podobnie jak w latach 80. XX w. inhibitory ACE, a w latach 90. statyny, obecnie renesans przeżywają antagoniści receptora aldosteronowego. Już dziś można mówić o plejotropowym śródbłonkowym działaniu antagonistów receptora aldosteronowego, a kolejne badania kliniczne i podstawowe odkrywają coraz to nowe aspekty działania i zastosowania dla tych leków. Być może za kilka lat leki te powtórzą sukces aspiryny, inhibitorów ACE, statyn i pojawią się w apteczce każdego pacjenta kardiologicznego. Będzie to kolejny sukces farmakologii śródbłonna.

Piśmiennictwo

1. Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* 2005; 186: 1-20.
2. Aguilera G, Kiss A, Lu A, et al. Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. *Endocr Res* 1996; 22: 433-43.
3. Cozza EN, Vila MC, Acevedo-Duncan M, et al. Treatment of primary cultures of calf adrenal glomerulosa cells with adrenocorticotropin (ACTH) and phorbol esters: a comparative study of the effects on aldosterone production and ACTH signaling system. *Endocrinology* 1990; 126: 2169-76.

4. Chtopicki S. Czynność śródbłonka – wyznacznik ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych atherothrombosis. *Kardiologia po Dyplomie* 2005; 4: 75-81.
5. Litchfield WR, Anderson BF, Weiss RJ, et al. Intracranial aneurysm and hemorrhagic stroke in glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Hypertension* 1998; 31: 445-50.
6. Beevers DG, Brown JJ, Ferriss JB, et al. Renal abnormalities and vascular complications in primary hyperaldosteronism. Evidence on tertiary hyperaldosteronism. *Q J Med* 1976; 45: 401-10.
7. Vasani RS, Evans JC, Larson MG, et al. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. *N Engl J Med* 2004; 351: 33-41.
8. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 1998; 273: 4883-91.
9. Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG, et al. Origin of aldosterone in the rat heart. *Endocrinology* 2004; 145: 4796-802.
10. Kayes-Wandover KM, White PC. Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2519-25.
11. Young MJ, Clyne CD, Cole TJ, et al. Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5121-6.
12. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, et al. Role of cardiac aldosterone in post-infarction ventricular remodeling in rats. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1999; 92: 991-6.
13. Young M, Funder JW. Aldosterone and the heart. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 224-6.
14. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, et al. Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102: 381-6.
15. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, et al. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension* 1999; 33: 981-986.
16. Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation* 2001; 103: 72-7.
17. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Spironolactone inhibits the transcardiac extraction of aldosterone in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 838-44.
18. Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, et al. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP 11A1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 1998; 71: 2231-8.
19. Stromstedt M, Waterman MR. Messenger RNAs encoding steroidogenic enzymes are expressed in rodent brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 34: 75-88.
20. Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, et al. Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology* 1997; 138: 3369-73.
21. Gomez-Sanchez EP, Fort CM, Gomez-Sanchez CE. Intracerebroventricular infusion of RU28318 blocks aldosterone-salt hypertension. *Am J Physiol* 1990; 258: E482-4.
22. Karin M. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell* 1998; 93: 487-90.
23. Reichardt HM, Schutz G. Glucocorticoid signalling-multiple variations of a common theme. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 146: 1-6.
24. Stewart PM, Krozowski ZS. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm* 1999; 57: 249-324.
25. Bonvalet JP, Alfaidy N, Farman N, et al. Aldosterone: intracellular receptors in human heart. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl. N): 92-7.
26. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, et al. Gene expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the mesenteric arteries of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 1994; 23: 577-80.
27. Brem AS, Bina RB, King TC, et al. Localization of 2 11beta-OH steroid dehydrogenase isoforms in aortic endothelial cells. *Hypertension* 1998; 31: 459-62.
28. Klein K, Henk W. Clinical experimental studies on the influence of aldosterone on hemodynamics and blood coagulation. *Z Kreislaufforsch* 1963; 52: 40-53.
29. Spach C, Streeten DH. Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentrations of aldosterone, in vitro. *J Clin Invest* 1964; 43: 217-27.
30. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, et al. Multiple actions of steroid hormones-a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 513-56.
31. Moura AM, Worcel M. Direct action of aldosterone on transmembrane 22Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension* 1984; 6: 425-30.
32. Eisen C, Meyer C, Christ M, et al. Novel membrane receptors for aldosterone in human lymphocytes: a 50 kDa protein on SDS-PAGE. *Cell Mol Biol* 1994; 40: 351-8.
33. Maguire D, MacNamara B, Cuffe JE, et al. Rapid responses to aldosterone in human distal colon. *Steroids* 1999; 64: 51-63.
34. Falkenstein E, Christ M, Feuring M, et al. Specific nongenomic actions of aldosterone. *Kidney Int* 2000; 57: 1390-4.
35. Harvey BJ, Condliffe S, Doolan CM. Sex and salt hormones: rapid effects in epithelia. *News Physiol Sci* 2001; 16: 174-7.
36. Ebata S, Muto S, Okada K, et al. Aldosterone activates Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney Int* 1999; 56: 1400-12.
37. Haseroth K, Gerdes D, Berger S, et al. Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 257-61.
38. Christ M, Meyer C, Sippel K, et al. Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213: 123-9.
39. Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, et al. Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 475-81.
40. Alzamora R, Michea L, Marusic ET. Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension* 2000; 35: 1099-104.
41. Michea L, Delpiano AM, Hitschfeld C, et al. Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology* 2005; 146: 973-80.
42. Someren JS, Faber LE, Klein JD, et al. Heat shock proteins 70 and 90 increase calcineurin activity in vitro through calmodulin-dependent and independent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 619-25.
43. Chtopicki S. Zapalenie śródbłonka w atherothrombosis. *Kardiologia po Dyplomie* 2005; 4: 77-88.
44. Farquharson CA, Struthers AD. Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103: 425-31.

45. Garnier A, Bendall JK, Fuchs S, et al. Cardiac specific increase in aldosterone production induces coronary dysfunction in aldosterone synthase-transgenic mice. *Circulation* 2004; 110: 1819-25.
46. Bauersachs J, Heck M, Fraccarollo D, et al. Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 351-8.
47. Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann SK, et al. Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 655-62.
48. Wang D, Liu YH, Yang XP, et al. Role of a selective aldosterone blocker in mice with chronic heart failure. *J Card Fail* 2004; 10: 67-73.
49. Kuster GM, Kotlyar E, Rude MK, et al. Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. *Circulation* 2005; 111: 420-7.
50. Rude MK, Duhaney TA, Kuster GM, et al. Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension* 2005; 46: 555-61.
51. Virdis A, Neves MF, Amiri F, et al. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* 2002; 40: 504-10.
52. Ahokas RA, Sun Y, Bhattacharya SK, et al. Role of Mg²⁺, Ca²⁺, and H₂O₂ in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Circulation* 2005; 111: 51-7.
53. Rajagopalan S, Duquaine D, King S, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 2212-6.
54. Kobayashi N, Hara K, Tojo A, et al. Eplerenone shows renoprotective effect by reducing LOX-1-mediated adhesion molecule, PKCepsilon-MAPK-p90RSK, and Rho-kinase pathway. *Hypertension* 2005; 45: 538-44.
55. Hao L, Kanno Y, Fukushima R, et al. Effects of eplerenone on heart and kidney in two-kidney, one-clip rats. *Am J Nephrol* 2004; 24: 54-60.
56. Sun Y, Zhang J, Lu L, et al. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol* 2002; 161: 1773-81.
57. Mervaala E, Finckenberg P, Lapatto R, et al. Lipoic acid supplementation prevents angiotensin II-induced renal injury. *Kidney Int* 2003; 64: 501-8.
58. Theuer J, Dechend R, Muller DN, et al. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002; 2: 3.
59. Blanco-Rivero J, Cachofeiro V, Lahera V, et al. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 2005; 46: 107-12.
60. Oberleithner H, Ludwig T, Riethmuller C, et al. Human endothelium: target for aldosterone. *Hypertension* 2004; 43: 952-6.
61. MacLeod AB, Vasdev S, Smeda JS. The role of blood pressure and aldosterone in the production of hemorrhagic stroke in captopril-treated hypertensive rats. *Stroke* 1997; 28: 1821-8.
62. Rocha R, Stier CT Jr, Kifor I, et al. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 2000; 141: 3871-8.
63. Muller DN, Mervaala EM, Schmidt F, et al. Effect of bosentan on NF-kappaB, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced end-organ damage. *Hypertension* 2000; 36: 282-90.
64. Mervaala E, Muller DN, Schmidt F, et al. Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2000; 35: 587-94.
65. Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, et al. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation* 2004; 109: 2213-20.
66. Rocha R, Chander PN, Khanna K, et al. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31: 451-8.
67. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, et al. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 33: 232-7.
68. Rocha R, Rudolph AE, Frierdich GE, et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1802-10.
69. Brilla CG, Matsubara LS, Weber K T. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 563-75.
70. Fiebeler A, Schmidt F, Muller DN, et al. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* 2001; 37: 787-93.
71. Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, et al. Angiotensin II (AT (1)) receptor blockade reduces vascular tissue factor in angiotensin II-induced cardiac vasculopathy. *Am J Pathol* 2000; 157: 111-22.
72. Vacher E, Fornes P, Domergue V, et al. Quinapril prevents stroke both during and after the treatment period in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1993; 6: 951-9.
73. Fornes P, Richer C, Vacher E, et al. Losartan's protective effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats persist durably after treatment withdrawal. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 305-13.
74. Park JB, Schiffrin EL. Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: role of endothelin-1. *Am J Hypertens* 2002; 15: 164-9.
75. Pu Q, Neves MF, Virdis A, et al. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension* 2003; 42: 49-55.
76. Park JK, Fiebeler A, Muller DN, et al. Lacidipine inhibits adhesion molecule and oxidase expression independent of blood pressure reduction in angiotensin-induced vascular injury. *Hypertension* 2002; 39: 685-9.
77. Fujisawa G, Okada K, Muto S, et al. Na/H exchange isoform 1 is involved in mineralocorticoid/salt-induced cardiac injury. *Hypertension* 2003; 41: 493-8.
78. Brown NJ, Kim KS, Chen Y, et al. Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 336-44.
79. Chun TY, Pratt JH. Aldosterone increases plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 239: 55-61.
80. Rajagopalan S, Bodary P, Duquaine D. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates thrombotic response to injury in atherosclerosis through favorable effects on nitric oxide bioavailability. *JACC* 2003; 129: 1032.
81. Chander PN, Rocha R, Ranaudo J, et al. Aldosterone plays a pivotal role in the pathogenesis of thrombotic microangiopathy in SHRSP. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1990-7.

82. Sawathiparnich P, Kumar S, Vaughan DE, et al. Spironolactone abolishes the relationship between aldosterone and plasminogen activator inhibitor-1 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 448-52.
83. Brown NJ, Agirbasli MA, Williams GH, et al. Effect of activation and inhibition of the renin-angiotensin system on plasma PAI-1. *Hypertension* 1998; 32: 965-71.
84. Yalcin AI, Dincer M, Aslan V, et al. Effect of spironolactone on impaired fibrinolysis of hypertensive patients. *Kidney Blood Press Res* 2002; 25: 260-4.
85. Bieron K, Grodzinska L, Kostka-Trabka E, et al. Prostacyclin and molsidomine synergise in their fibrinolytic and anti-platelet actions in patients with peripheral arterial disease. *Wien Klin Wochenschr* 1993; 105: 7-11.
86. Gryglewski RJ, Uracz W, Chłopicki S, et al. Bradykinin as a major endogenous regulator of endothelial function. *Pediatr Pathol Mol Med* 2002; 21: 279-290.
87. Schafer A, Fraccarollo D, Hildemann S, et al. Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition. *Thromb Haemost* 2003; 89: 1024-30.
88. Schlaich MP, Schobel HP, Hilgers K, et al. Impact of aldosterone on left ventricular structure and function in young normotensive and mildly hypertensive subjects. *Am J Cardiol* 2000; 85: 1199-206.
89. Brilla CG, Pick R, Tan LB, et al. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 1990; 67: 1355-64.
90. Brilla CG, Maisch B. Regulation of the structural remodelling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J* 1994; 15 (Suppl. D): 45-52.
91. Trachtman H, Weiser AC, Valderrama E, et al. Prevention of renal fibrosis by spironolactone in mice with complete unilateral ureteral obstruction. *J Urol* 2004; 172: 1590-4.
92. Fullerton MJ, Funder JW. Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1863-7.
93. Brilla CG, Rupp H. Myocardial collagen matrix remodeling and congestive heart failure. *Cardiologia* 1994; 39 (12 Suppl. 1): 389-93.
94. Kohler E, Bertschin S, Woodtli T, et al. Does aldosterone-induced cardiac fibrosis involve direct effects on cardiac fibroblasts? *J Vasc Res* 1996; 33: 315-26.
95. Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, et al. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension* 1995; 26: 971-8.
96. Stier CT Jr, Chander PN, Rocha R. Aldosterone as a mediator in cardiovascular injury. *Cardiol Rev* 2002; 10: 97-107.
97. Sun Y, Weber KT. Angiotensin-converting enzyme and wound healing in diverse tissues of the rat. *J Lab Clin Med* 1996; 127: 94-101.
98. Lariviere R, Deng LY, Day R, et al. Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2123-31.
99. Fullerton MJ, Funder JW. Aldosterone regulates collagen output of cardiac fibroblasts by upregulation of endothelin receptors. *Endocrin Soc Proc* 1998; 93: 511.
100. Sun Y, Ratajska A, Weber KT. Bradykinin receptor and tissue ACE binding in myocardial fibrosis: response to chronic angiotensin II or aldosterone administration in rats. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 813-22.
101. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL, et al. Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 30-6.
102. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, et al. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 33: 232-7.
103. Wang W, McClain JM, Zucker IH. Aldosterone reduces baroreceptor discharge in the dog. *Hypertension* 1992; 19: 270-7.
104. Jazayeri A, Mayer WJ. III: Mineralocorticoid-induced increase in beta-adrenergic receptors of cultured rat arterial smooth muscle cells. *J Steroid Biochem* 1989; 33: 987-91.
105. Perrier E, Kerfant BG, Lalevee N, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation* 2004; 110: 776-83.
106. Ramires FJ, Mansur A, Coelho O, et al. Effect of spironolactone on ventricular arrhythmias in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated or to ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2000; 85: 1207-11.
107. Yee KM, Struthers AD. Aldosterone blunts the baroreflex response in man. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95: 687-92.
108. Fletcher J. Acute Aldosterone Antagonism Improves Cardiac Vagal Control in Humans. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1270-5.
109. Brown NJ. Eplerenone: cardiovascular protection. *Circulation* 2003; 107: 2512-8.
110. MacFadyen RJ, Lee AF, Morton JJ, et al. How often are angiotensin II and aldosterone concentrations raised during chronic ACE inhibitor treatment in cardiac failure? *Heart* 1999; 82: 57-61.
111. Okubo S, Niimura F, Matsusaka T, et al. Angiotensinogen gene null-mutant mice lack homeostatic regulation of glomerular filtration and tubular reabsorption. *Kidney Int* 1998; 53: 617-25.
112. Harada E, Yoshimura M, Yasue H, et al. Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation* 2001; 104: 137-9.
113. Farquharson CA, Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000; 101: 594-7.
114. Xiao F, Puddefoot JR, Barker S, et al. Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 2004; 44: 340-5.
115. Michel F, Ambrosine ML, Duriez M, et al. Aldosterone enhances ischemia-induced neovascularization through angiotensin II-dependent pathway. *Circulation* 2004; 109: 1933-7.
116. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341: 709-17.
117. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 348: 1309-21.
118. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005; 26: 1115-40.
119. Rocha R, Funder JW. The pathophysiology of aldosterone in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 970: 89-100.
120. Keidar S, Hayek T, Kaplan M., et al. Effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on blood pressure, serum and macrophage oxidative stress, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41: 955-63.

Wpływ tkankowych i osoczowych inhibitorów konwertazy angiotensyny na hemostazę w świetle badań eksperymentalnych i klinicznych

The influence of tissue and plasma angiotensin converting enzyme inhibitors on haemostasis with respect to experimental and clinical investigations

Marzena Wojewódzka-Żeleznikowicz¹, Adrian Stankiewicz²,
Małgorzata Malinowska-Zaprzaska¹, Ewa Chabielska²

¹Klinika Medycyny Ratunkowej, Akademia Medyczna, Białystok

²Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Akademia Medyczna, Białystok

Streszczenie

Wiadomo, że tkankowy układ renina-angiotensyna obecny w śródbłonku i ścianie naczyń odpowiedzialny jest za ok. 90% produkcji angiotensyny II. Hamowanie konwertazy angiotensyny (ACE) na poziomie tkankowym może szczególnie skutecznie zapobiegać niekorzystnym strukturalnym i czynnościowym zmianom w obrębie śródbłonka i modulować procesy hemostazy na drodze wzrostu stężenia bradykininy i zwiększania uwalniania ze śródbłonka tlenku azotu (NO), prostacykliny (PGI₂) oraz tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA). Postulowany w ostatnich latach podział inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE-I) na *tkankowe* i *osoczowe* wynika z różnic w sile hamowania tkankowej frakcji ACE. Silniejsze i przedłużone hamowanie tego enzymu związane jest ze zwiększoną zdolnością przenikania *tkankowych* ACE-I do ściany naczynia. Celem artykułu jest przedstawienie wiedzy na temat różnic we wpływie *tkankowych* i *osoczowych* ACE-I na układ hemostazy w oparciu o dane płynące z badań podstawowych i klinicznych. Analiza badań eksperymentalnych wskazuje, że *tkankowe* ACE-I silniej w porównaniu z osoczowymi modulują procesy hemostazy, w efekcie wywołując silniejsze działanie przeciwzakrzepowe.

Abstract

90% of angiotensin converting enzyme (ACE) is found locally as tissue-bound ACE on vascular endothelial cells. Recently postulated classification of angiotensin converting enzyme inhibitors (ACE-I) on *plasma* and *tissue* ACE-I based on stronger and prolonged inhibition of tissue ACE, connected with their higher penetration to tissues. *Tissue* ACE-I, through their high affinity to endothelium, considerably stronger prevents the local synthesis of angiotensin II (Ang II) and by inhibition of kininase II causes the subsequent increase of bradykinin level and mediated by BK₂ receptor release of nitric oxide (NO), prostacycline (PGI₂) and *tissue* type plasminogen activator (t-PA). Therefore the beneficial consequences of *tissue* ACE inhibition may improve endothelial dysfunction by prevention of the unfavorable structural and functional changes and modulation the coagulation and fibrinolysis system. In this review authors discuss the hypothesis that *tissue* ACE-I more effectively influence haemostasis and prevent thrombosis in comparison to *plasma* ACE-I.

Kardiologia Polska 2005; 63; 4 (Supl. 2): 420-427

Jednym z niekorzystnych następstw aktywacji układu renina-angiotensyna (RAS) jest zaburzenie równowagi w układzie hemostazy prowadzące do wzrostu potencjału prozakrzepowego ustroju. Angiotensyna II (Ang II) wytwarzana w nadmiarze przez systemowy lub lokalne

układu RAS powoduje dysfunkcję śródbłonka naczyniowego i hamuje układ fibrynolizy, a także aktywuje płytki krwi i układ krzepnięcia [1–5]. Wykazaliśmy ostatnio, że infuzja Ang II zwiększa formowanie zakrzepu żylnego i tętniczego u szczurów z nadciśnieniem naczyniowo-

Adres do korespondencji:

Marzena Wojewódzka-Żeleznikowicz, Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Akademia Medyczna, ul. Mickiewicza 2C, 15-089 Białystok, tel.: +48 85 748 56 07, faks: +48 85 745 08 04, e-mail: wojewodzkam@wp.pl

-nerkowym [6, 7]. Założyliśmy, że zahamowanie syntezy Ang II zmniejsza tendencję do tworzenia zakrzepów i udowodniliśmy w cyklu badań na modelu zwierzęcym przeciwwzakrzepowe działanie inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE-I) w mechanizmie zależnym od śródbłonna naczyniowego [8, 9]. Także wyniki dużych badań klinicznych, w których wykazano, że ACE-I istotnie zmniejszają śmiertelność oraz częstość ponownego zawału u chorych po zawałe mięśnia sercowego, wskazują na przeciwwzakrzepowe działanie ACE-I [10–13].

Wydaje się jednak, że nie wszystkie ACE-I dają korzystne efekty i założenie istnienia efektu klasy w kontekście działania naczyniowego nie jest zasadne. W 2004 r. na łamach *Annals of Internal Medicine* ukazały się szeroko dyskutowane wyniki retrospektywnego badania obejmującego ponad 7 tys. pacjentów porównującego po raz pierwszy wpływ siedmiu ACE-I (kaptoprylu, enalaprylu, fozynoprylu, lizynoprylu, chinaprylu, ramiprylu i perindoprylu) na roczną śmiertelność w grupie chorych, którzy przeżyli zawał serca. Okazało się, że najwyższą redukcję śmiertelności powodowały ramipryl i perindopryl. Autorzy jednak nie wyjaśniają mechanizmów odpowiedzialnych za większą skuteczność tych dwóch ACE-I [14].

Kryteria podziału na *tkankowe* i *osoczowe* ACE-I

Należy się zatem zastanowić, czym spowodowane są korzystniejsze efekty niektórych ACE-I w aspekcie prewencji ostrych powikłań zakrzepowo-zatorowych i ich klinicznych konsekwencji w przebiegu chorób układu sercowo-naczyniowego. Odpowiedź sugerują badania pochodzące już z lat 80. XX w., kiedy to po raz pierwszy doniesiono o istnieniu pośród ACE-I takich, które silniej i dłużej hamują tkankową frakcję ACE [15, 16]. Mechanizm działania ACE-I polega na hamowaniu ACE i jest identyczny dla wszystkich leków z tej grupy. Ta *jakościowa* definicja mechanizmu działania ACE-I nie uwzględnia aspektu *ilościowego*, a więc różnic w sile i stopniu hamowania ACE przez poszczególne leki [17]. Te istotne różnice stały się aktualnie podstawą nowego podziału ACE-I na *osoczowe* (kaptopryl, enalapryl, lizynopryl) oraz *tkankowe*, m.in. (zofenopryl, ramipryl, perindopryl, chinapryl, benazepryl, fozynopryl). Podział ten został zainspirowany odkryciem, że blisko 90% ACE zlokalizowane jest w śródbłonku naczyniowym i w obrębie wszystkich warstw ściany naczynia narządów takich jak płuca, nerki, nadnercza, mózg, serce, natomiast tylko 10% znajduje się we krwi krążącej [18–20]. Wiemy dzisiaj, że tkankowa frakcja Ang II zlokalizowana w ścianach naczyń krwionośnych wielu narządów reguluje homeostazę lokalną i powoduje długofalowe niekorzystne działania naczyniowe, natomiast krążąca Ang II odgrywa ważną rolę w doraźnej regulacji home-

ostazy wodno-elektrolitowej oraz ciśnienia krwi [21]. Uważa się zatem, że w leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego związanych z dysfunkcją śródbłonna istotne znaczenie ma hamowanie aktywności ACE na poziomie tkankowym. I tak wykazano, że u pacjentów po zawałe serca imidapryl dłużej utrzymywał obniżoną aktywność ACE w aorcie w porównaniu z kaptoprylem i enalaprylem [22]. Łatwiejsza tkankowa dostępność niektórych ACE-I może być związana z wieloma czynnikami, wśród których wymieniane są lipofilność, wielkość cząsteczki, penetracja tkankowa, stężenie osiągnięte w osoczu, system aktywnego transportu [23]. Wszystkie te cechy mogą warunkować ich lepszą penetrację do zagłębień śródbłonna naczyniowego *in vivo* i *wpasowywanie* się w konformację przestrzenną ACE. Obecnie wiadomo, że ACE-I mają zdolność przenikania również do głębszych warstw ściany naczynia [24]. Z kolei wg Strittmatteredera i wsp. [25] to ACE zawarta w poszczególnych tkankach różni się masą cząsteczkową oraz powinowactwem do substratu, a przenikanie odpowiedniego ACE-I do tkankowej frakcji ACE uzależnione jest od powinowactwa, a nie lipofilności leku lub jego małej masy cząsteczkowej. Tę hipotezę potwierdza badanie *in vitro* dotyczące przechodzenia różnych ACE-I do śródbłonna, które nie wykazało różnic zależnych od lipofilności. Zaobserwowano natomiast istnienie zależności pomiędzy zmianami pH a lipofilnością leku oraz współczynnikiem ekstrakcji. Zdaniem autorów nie lipofilność jednak odgrywa istotną rolę, lecz obecność kanałów międzykomórkowych. Od ich gęstości zależy penetracja ACE-I do tkanek, wykluczają oni jednocześnie możliwość aktywnego transportu ACE-I [26].

Mimo że kryteria podziału ACE-I na *tkankowe* i *osoczowe* nie są dzisiaj jednoznacznie określone, jednak badania eksperymentalne jasno dokumentują różnice między lekami tej grupy w odniesieniu do zdolności penetracji do śródbłonna różnych tkanek i narządów. I tak wykazano, że *tkankowe* ACE-I dłużej utrzymywały obniżoną aktywność ACE w tkankach niż w osoczu, a efekt ten był najsilniejszy w płucach, aorcie, nerkach i sercu [27–29]. Badania Ungera i wsp. [30–31] u szczurów z nadciśnieniem spontanicznym potwierdziły kluczową rolę tkankowej Ang II w długofalowej regulacji ciśnienia tętniczego krwi. Efekt hipotensyjny ACE-I nie był związany z obniżeniem osoczowego stężenia ACE. Co więcej, pięć dni po odstawieniu leków pomimo powrotu osoczowej ACE do wartości wyjściowych efekt hipotensyjny utrzymywał się nadal. Zdaniem autorów było to związane z gromadzeniem się leku w przedziatach tkankowych. Obserwacje porównujące wiązanie poszczególnych ACE-I z ACE zawartą w homogenatach komórek mięśnia sercowego szczura wykazały, że najsilniej wiąże się z enzymem: chinapryl = benazepryl > ramipryl > perindopryl > lizynopryl > enalapryl > fozynopryl > kaptopryl [18, 23].

Według innych autorów kolejność ta jest nieco inna i za inhibitory o najwyższym powinowactwie do tkankowej ACE uważa się: chinapryl > fozinopryl > perindopryl > ramipryl > spirapryl > trandolapryl > zofenopryl [32]. Pomimo niejednoznacznych kryteriów podziału konieczność wyodrębnienia osoczowych i tkankowych ACE-I nie budzi wątpliwości.

Obecnie uważa się, że efekt farmakologiczny *tkankowych* ACE-I związany jest także z wyraźniejszym działaniem śródbłonkowym, polegającym na nasileniu korzystnego działania bradykininy na poziomie tkankowym. Silniejsze i długotrwałe hamowanie ACE (będącej jednocześnie kininazą II rozkładającą bradykininę) zwiększa stężenie bradykininy [15, 33] i nasila uwalnianie ze śródbłonka tlenku azotu (NO), prostacykliny (PGI₂) oraz tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), związków o działaniu naczyniorozszerzającym, przeciwplatekcyjnym oraz profibrinolitycznym [34, 35]. Czy zatem różnice dotyczące hamowania naczyniowej ACE przekładają się na efekty farmakologiczne *tkankowych* ACE-I, w tym także ich wpływ na hemostazę i proces zakrzepowy?

Tkankowe i osoczowe ACE-I a doświadczalne modele zakrzepicy

W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy zależność od NO i PGI₂ redukcję częstości występowania oraz spadek masy zakrzepu w modelu zakrzepicy żyłnej i tętniczej u szczurów normotensyjnych otrzymujących osoczowe ACE-I [8, 9]. Później wykazano również, że *tkankowe* ACE-I ograniczały tętniczy proces zakrzepowy w modelu zwierzęcym. Chinapryl wydłużał czas do okluzji naczyń, zmniejszał masę zakrzepu tętniczego i zależnie od dawki hamował tworzenie anionu nadciśnieniowego oraz osłabiał agregację płytek krwi u szczurów normotensyjnych [36, 37]. Także u szczurów z nadciśnieniem samoistnym imidapryl obniżał masę zakrzepu tętniczego, co korelowało ze spadkiem zarówno osoczowej, jak i aortalnej aktywności ACE [38]. Ponadto poprawiał przepływ w naczyniach mózgowych oraz zmniejszał częstość zakrzepicy naczyń mózgowych u szczurów nadciśnieniowych. Efekt ten był związany ze wzrostem uwalniania NO ze śródbłonka [39].

Okazuje się zatem, że zarówno *tkankowe*, jak i *osoczowe* ACE-I działają przeciwzakrzepowo w modelach zwierzęcych. Jednak różnorodność warsztatów badawczych stwarza trudności w porównaniu wyników w kontekście siły przeciwzakrzepowego działania ACE-I. Przeprowadziliśmy więc badanie porównujące cztery ACE-I: *osoczowe* (kaptopryl i enalapryl) oraz *tkankowe* (perindopryl i chinapryl) w modelu zakrzepicy tętniczej i żyłnej [40]. Doświadczenia wykonano u szczurów normotensyjnych, zaś równoważność dawek stosowanych

ACE-I wyznaczaliśmy w oparciu o jednakowy efekt hipotensyjny. Badanie to jednoznacznie wykazało istotną przewagę *tkankowych* ACE-I w hamowaniu żylnego i tętniczego procesu zakrzepowego, wyrażającą się większą w stosunku do *osoczowych* redukcją incydentów zakrzepicy oraz masy zakrzepu, a także istotnie wyższym przepływem końcowym w zamkniętej materii zakrzepowej tętnicy szyjnej. Aby uzyskać odpowiedź na pytanie o mechanizmy związane z silniejszym przeciwzakrzepowym efektem *tkankowych* ACE-I, należy przeanalizować badania porównujące wpływ *tkankowych* i *osoczowych* ACE-I na poszczególne składowe kaskady prowadzącej do formowania zakrzepu.

Tkankowe i osoczowe ACE-I a przeciwzakrzepowe właściwości śródbłonka naczyniowego

Liczne badania dowiodły, że *osoczowe* i *tkankowe* ACE-I poprawiają funkcję śródbłonka naczyniowego. Z jednej strony związane jest to z zahamowaniem rozkładającej bradykininę (BK) kininazy II [41]. Wzrost stężenia bradykininy prowadzi między innymi do natychmiastowej odpowiedzi wydzielniczej komórek śródbłonka, powodując tworzenie i uwalnianie NO, PGI₂ oraz t-PA. Z drugiej korzystny wpływ ACE-I na śródbłonek wiąże się ze zniesieniem prooksydacyjnego działania Ang II [42, 43].

Dowody, że silniej wyrażony przeciwzakrzepowy potencjał *tkankowych* ACE-I może zależeć od śródbłonka naczyniowego, znajdujemy w eksperymentalnych i klinicznych badaniach porównawczych. Ramipryl silniej niż kaptopryl i enalapryl uwalniał bradykininę ze śródbłonka niedokrwionych naczyń wieńcowych w izolowanych sercach szczura [44]. W badaniu *in vivo* u szczurów stosowane w dawkach niehipotensyjnych *tkankowe* ACE-I (chinapryl, w mniejszym stopniu perindopryl) silniej niż *osoczowe* stymulowały uwalnianie ze śródbłonka PGI₂ oraz NO w mechanizmie zależnym od bradykininy. Skutkiem tego był silniejszy efekt trombolityczny tych dwóch leków [45]. Z kolei u psów z niewydolnością serca enalapryl i perindopryl, stosowane w dawkach wywołujących zbliżony efekt hipotensyjny, powodowały porównywalny wzrost poziomu peptydów bradykininowych [46]. Jednak Zhang i wsp. [47] wykazali silniejsze uwalnianie NO ze śródbłonka przez ramipryl w porównaniu z kaptoprylem i enalaprylem w izolowanych naczyniach wieńcowych psa.

Wyniki badań klinicznych nie są jednoznaczne. W badaniu fragmentów ludzkich przedsińców nie wykazano wpływu *tkankowych* (fozinopryl, ramipryl) i *osoczowych* (enalapryl, lizinopryl, kaptopryl) ACE-I na poziom peptydów bradykininowych [48]. Zdaniem autorów brak wzrostu stężenia bradykininy w ludzkich

przedsionkach mógł być spowodowany niską dawką ACE-I lub też dominującą rolą innych szlaków enzymatycznych uczestniczących w metabolizmie kinin. Podobnie nie zaobserwowano różnic w stężeniu metabolitu $\text{PGI}_2 - 6\text{-keto-PGF}_{1-\alpha}$ w moczu u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym otrzymujących kaptopryl, enalapryl, fozynopryl lub ramipryl [49]. Badanie Hornig i wsp. [50], przeprowadzone wśród pacjentów z chorobą niedokrwienną serca wykazało, iż chinapryl powodował silniejszy wzrost przepływu w tętnicy promieniowej (FDD) w porównaniu z enalaprylem. Autorzy udowodnili istotny udział NO w naczyniorozszerzającym działaniu chinaprylu. Potwierdzenie tych wyników znajduje się w badaniu BANFF [51].

Jak już wspomniano, ACE-I ostabiają stres oksydacyjny. Działanie to wydaje się być silniejsze w przypadku tkankowych ACE-I. W badaniu *in vivo* imidapryl silniej niż enalapryl i kaptopryl hamował uwalnianie rodnika hydroksylowego (OH) w mięśniu sercowym i mózgu szczura [52, 53]. U myszy transgenicznych z hipercholesterolemią (delecją genu apolipoproteiny E), tkankowy ACE-I zofenopryl (zawierający w cząsteczce grupę sulfhydrylową -SH) działał antyoksydacyjnie i przeciwmiażdżycowo silniej niż kaptopryl i enalapryl [54]. Badanie *in vitro* w hodowlach komórek śródbłonka aorty wołowej, porównujące zofenopryl z kaptoprylem i enalaprylem, jednoznacznie wykazało istotną przewagę jego właściwości antyoksydacyjnych [55]. Zdaniem autorów obecność grupy -SH nie jest jedynym czynnikiem warunkującym zwiększoną dostępność NO i może być spotęgowana także większą lipofilnością zofenoprylu. Zaprzecza to wcześniejszym wynikom uzyskanym przez Chopra i wsp. [56], którzy wykazali zbliżoną skuteczność antyoksydacyjną dla wszystkich ACE-I zawierających grupę -SH. Także w ludzkich monocytach wykazano silniejsze hamowanie oksydazy zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) i uwalniania reaktywnych form tlenu przez chinapryl i kaptopryl (zawierający grupę -SH) w porównaniu do lizynoprylu i enalaprylatu [57].

Obok zaangażowania w modyfikowanie procesów oksydacyjnych, ACE-I uczestniczą w modulowaniu reakcji zapalnej poprzez zmniejszanie syntezy wielu cytokin prozapalnych i molekuł adhezyjnych [58, 59]. Badanie porównawcze wykazało, że cilazapryl silniej niż kaptopryl zmniejszał infiltrację monocytów/makrofagów do warstwy podśródbłonkowej ściany naczynia u szczurów z nadciśnieniem spontanicznym [60].

Wydaje się zatem, że badania porównawcze potwierdzają przewagę tkankowych ACE-I w stymulowaniu przeciwwązrowego potencjału śródbłonka. Szczególnie jasno rysuje się przewaga tkankowych ACE-I w badaniach podstawowych.

Tkankowe i osoczowe ACE-I a fibrynoliza

Profibrynolityczne efekty ACE-I są obecnie szeroko udokumentowane [61]. Stymulowanie profibrynolitycznej aktywności śródbłonka przez ACE-I przebiega dwoma głównymi szlakami. Z jednej strony jest to obniżanie poziomu PAI-1 na drodze hamowania syntezy Ang II, z drugiej zaś wzrost uwalniania t-PA za pośrednictwem bradykininy [62].

Badania własne porównujące cztery ACE-I wykazały silniejsze działanie profibrynolityczne tkankowych ACE-I u szczurów normotensyjnych w trakcie toczącego się procesu zakrzepowego (skracają czas lizy euglobulin (ECLT) będący wskaźnikiem aktywacji fibrynolizy śródbłonkowej i uwalniania t-PA). Także kaptopryl skracat ECLT [40]. Udowodniliśmy wcześniej, że obecność grupy -SH w cząsteczce kaptoprylu potęguje działanie profibrynolityczne leku [63]. Nasze obserwacje pozostają w zgodzie z badaniem Cheng i wsp. [64], którzy wykazali, że związki zawierające grupę -SH obniżają uwalnianie PAI-1 ze śródbłonka. Interesujące jest to, że efekt silniejszej aktywacji fibrynolizy po tkankowych ACE-I obserwowano jednak tylko w grupach zwierząt z toczącym się tętniczym procesem zakrzepowym. W osoczu szczurów, u których zakrzepica nie była indukowana, nie stwierdziliśmy różnic w sile profibrynolitycznego działania czterech badanych leków [65]. Sugeruje to, iż skuteczność działania profibrynolitycznego może zależeć od toczącego się procesu zakrzepowego, a tym samym od zwiększonej gotowości prozakrzepowej organizmu spowodowanej zmianą aktywności układów krzepnięcia i fibrynolizy.

W klinicznych badaniach porównawczych znajdujemy dowody na wyraźnie rysującą się przewagę profibrynolitycznego działania tkankowych ACE-I. I tak, u pacjentów po zawale serca wykazano, że chinapryl silniej niż enalapryl obniżał stężenie antygenu PAI-1, przy czym przewaga ta wzrastała wraz z czasem podawania leku [66]. Imidapryl, u pacjentów po zawale serca, dłużej i silniej niż kaptopryl i enalapryl obniżał stężenie PAI-1 w ciągu 4 tygodni leczenia [67].

Podsumowując, badania eksperymentalne i kliniczne wykazują jednoznacznie przewagę tkankowych ACE-I w aktywacji układu fibrynolizy.

Tkankowe i osoczowe ACE-I a układ krzepnięcia

Istnieją dowody wskazujące na wieloetapowe hamowanie aktywności układu krzepnięcia przez ACE-I. Obniżają one ekspresję czynnika tkankowego (TF), który pełni kluczową rolę w aktywacji zewnątrzpochoďnej drogi krzepnięcia [68]. Jak wynika z badań, ACE-I obniżają poziom kompleksów trombina-antytrombina (TAT)

oraz fragmentów F1+2 będących wskaźnikiem generacji trombiny [69].

We wcześniej wspomnianym badaniu porównawczym wykazaliśmy różnice w oddziaływaniu *tkankowych* i *osoczowych* ACE-I na układ hemostazy u szczurów normotensyjnych [40]. Jedynie perindopryl i chinapryl istotnie zmniejszały tworzenie fibryny poprzez zahamowanie wewnątrz- i zewnątrzpochoďnej drogi układu krzepnięcia. Silniejsze hamowanie krzepnięcia przez *tkankowe* ACE-I może wynikać z jednej strony z osłabienia syntezy Ang II na poziomie lokalnym, z drugiej zaś wzrostu uwalniania NO ze śródbłónka. W obu przypadkach dochodzi do zmniejszenia uwalniania czynnika tkankowego ze śródbłónka [70]. Dowodem na zaangażowanie śródbłónka w modulowanie osoczowej kaskady krzepnięcia może być badanie *in vitro*, w którym wykazano zbliżoną skuteczność kaptoprylu, fozynoprylu i idraprylu w obniżaniu ekspresji TF w ludzkich monocytach stymulowanych endotoksyną bakteryjną [58]. U szczurów normotensyjnych, które nie miały indukowanego procesu zakrzepowego, wszystkie cztery ACE-I (perindopryl, chinapryl, kaptopryl, enalapryl) wykazały porównywalną skuteczność antykoagulacyjną [65]. Można więc powiedzieć, że zwiększona gotowość prozakrzepowa organizmu odgrywa istotną rolę w obserwowanych efektach *tkankowych* ACE-I.

Tak więc o przewadze *tkankowych* ACE-I w hamowaniu układu krzepnięcia możemy dzisiaj wnioskować jedynie w oparciu o badania wykonane w modelu zwieręcym.

Tkankowe i osoczowe ACE-I a płytki krwi

Badania eksperymentalne i kliniczne dowodzą antypłytkowego działania ACE-I. Mechanizm przeciwplateletowego działania ACE-I może polegać na znoszeniu proagregacyjnych działań Ang II [5], a także na potęgowaniu antypłytkowego działania NO i PGI₂ [35]. U szczurów nadciśnieniowych wykazano, że zależny od NO efekt antyagregacyjny ACE-I związany ze zmniejszeniem stężenia jonów Ca²⁺ wewnątrz płytek krwi oraz obniżaniem stosunku TXA₂/PGI₂ [71]. ACE-I mogą obniżyć także ekspresję płytkowej selektyny P [72] oraz zmniejszać ekspresję glikoproteiny IIb/IIIa [73]. Inny mechanizm, który powinien być brany pod uwagę, to osłabienie interakcji płytek krwi ze ścianą naczynia poprzez zmniejszanie shear stress oraz lepkości krwi [74].

W naszym badaniu udowodniliśmy, że perindopryl i chinapryl silniej niż kaptopryl i enalapryl hamowały agregację płytek we krwi pełnej szczurów z toczącym się tętnicznym procesem zakrzepowym. Wykazaliśmy także dodatnią korelację pomiędzy redukcją masy zakrzepu a zahamowaniem agregacji płytek krwi [40]. Natomiast oceniając odpowiedź agregacyjną płytek krwi szczurów normotensyjnych bez indukowanej zakrzepicy, stwierdzo-

no brak istotnych różnic między *tkankowymi* i *osoczowymi* ACE-I po 10 dniach ich stosowania [75].

Z kolei w badaniu klinicznym u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym fozinopryl silniej niż kaptopryl i enalapryl obniżał stężenie TXB₂. Wszystkie trzy ACE-I nie hamowały istotnie agregacji płytek krwi w odpowiedzi na ADP, epinefrynę lub trombinę [76].

Mała liczba badań porównujących przeciwplateletowe efekty *tkankowych* i *osoczowych* ACE-I oraz brak jednoznacznych wyników nie pozwalają na wnioskowanie o przewadze inhibitorów *tkankowych*. Opisany wyżej wpływ substancji uwalnianych ze śródbłónka na funkcję płytek krwi sugeruje kierunek badań, które uwzględniłyby znaczącą rolę śródbłónka w przeciwplateletowym działaniu *tkankowych* ACE-I.

Tkankowe i osoczowe ACE-I, ich efekt przeciwzakrzepowy a duże badania kliniczne

Nie ma obecnie prospektywnych, dużych badań, porównujących wpływ *tkankowych* i *osoczowych* ACE-I na procesy hemostazy w jednorodnej grupie pacjentów. Tak więc wiedzę dotyczącą ich oddziaływania na hemostazę możemy czerpać pośrednio z analizy wpływu poszczególnych ACE-I na śmiertelność całkowitą oraz złożone punkty końcowe.

Potwierdzeniem doskonałego wpływu ramiprylu na proces zakrzepowy może być badanie HOPE [77]. Wykazano w nim, że podawanie ramiprylu pacjentom bez cech niewydolności serca, ale z chorobą wieńcową, chorobą naczyń obwodowych, cukrzycą lub incydem naczyniowo-mózgowym istotnie zmniejsza częstość nagłego zgonu sercowego, zawału serca czy udaru mózgu. Opublikowane przed dwoma laty wyniki badania EUROPA wykazały, że perindopryl u chorych ze stabilną chorobą wieńcową, bez cech niewydolności serca, zmniejszał śmiertelność całkowitą, częstość zawału serca, niestabilnej choroby wieńcowej, zatrzymania krążenia oraz opóźniał rozwój niewydolności serca [78]. Nie wszystkie wyniki badań klinicznych z ACE-I uznanymi za *tkankowe* są zadowalające. W badaniu PEACE trandolapryl stosowany w podobnej populacji pacjentów jak w badaniu HOPE i EUROPA nie wpływał jednak na śmiertelność całkowitą, śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych, a także nie zmniejszał częstości zawałów i ponownej rewaskularyzacji [79]. Być może zastosowana w tym badaniu dawka trandolaprylu była zbyt niska. Z drugiej strony trandolapryl wykazuje mniej nasiloną lipofilność, a także w mniejszym stopniu hamuje *tkankową* ACE [80] w porównaniu z silniejszymi poprzednikami z badań HOPE i EUROPA, co w efekcie mogło być przyczyną jego mniejszej skutecz-

ności. Badanie PEACE nie jest jedynym, w którym przewaga ACE-I *tkankowych* może być dyskutowana. W badaniu QUIET chinapryl u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i prawidłową czynnością lewej komory okazał się nieskuteczny w redukcji ryzyka incydentów niedokrwiennych [81].

Tak więc analiza dużych badań nie daje jednoznacznej odpowiedzi. Należy się zastanowić, dlaczego stosując *tkankowy* ACE-I, nie zawsze otrzymujemy oczekiwane korzyści oraz w jakim stopniu zależy to od właściwości leku, a w jakim od stanu pacjenta. Wiadomym jest, że większe korzyści uzyskuje się w trakcie stosowania ACE-I u pacjentów wysokiego ryzyka [82, 83]. Dalej, należy pamiętać o nieporównywalności dawek stosowanych w różnych badaniach klinicznych oraz wpływie na uzyskane wyniki stosowanych jednocześnie statyn, aspiryny, β -adrenolityków i leków moczopędnych. Dlatego też jest oczywiste, że w praktyce klinicznej najszersze zastosowanie powinny znajdować ACE-I posiadające udowodnione korzystne działanie w badanych populacjach pacjentów.

Podsumowując, w chwili obecnej analiza badań eksperymentalnych wskazuje, że *tkankowe* ACE-I silniej w porównaniu z *osoczowymi* modulują procesy hemostazy, w efekcie wywołując silniejsze działanie przeciwzakrzepowe. Efekt ten wymaga jednak potwierdzenia w badaniach klinicznych.

Piśmiennictwo

- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-8.
- Wolf G, Ziyadeh FN, Schroeder R, et al. Angiotensin II inhibits inducible nitric oxide synthase in tubular MCT cells by a post-transcriptional mechanism. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 551-7.
- Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, et al. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 1999; 100: 1646-52.
- Nishimura H, Tsuji H, Masuda H, et al. Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expression without changing that of tissue type plasminogen activator or tissue factor pathway inhibitor in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1189-95.
- Larsson PT, Schwieler JH, Wallen NH. Platelet activation during angiotensin II infusion in healthy volunteers. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11: 61-9.
- Mogielnicki A, Chabielska E, Pawlak R, et al. Angiotensin II enhances thrombosis development in renovascular hypertensive rats. *Thromb Haemost* 2005; 93: 1069-76.
- Kamińska M, Mogielnicki A, Stankiewicz A, et al. Angiotensin II via AT1 receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* (w druku).
- Chabielska E, Pawlak R, Golatowski J, et al. The antithrombotic effect of captopril and losartan on experimental arterial thrombosis in rats. *J Physiol Pharmacol* 1998; 49: 251-60.
- Pawlak R, Chabielska E, Golatowski J, et al. Nitric oxide and prostacyclin are involved in antithrombotic action of captopril in venous thrombosis in rats. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1208-12.
- Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. *Lancet* 1993; 342: 821-8.
- Ambrosioni E, Borghi C, Magnani B. The effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor zofenopril on mortality and morbidity after anterior myocardial infarction. The Survival of Myocardial Infarction Long-Term Evaluation (SMILE) Study Investigators. *N Engl J Med* 1995; 332: 80-5.
- Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992; 327: 669-77.
- Kober L, Torp-Pedersen C, Carlsen JE, et al. A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitortrandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1670-6.
- Pilote L, Abrahamowicz M, Rodrigues E, et al. Mortality rates in elderly patients who take different angiotensin-converting enzyme inhibitors after acute myocardial infarction: a class effect? *Ann Intern Med* 2004; 141: 102-12.
- Johnston CI, Clappison BH, Anderson WP, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on circulating and local kinin levels. *Am J Cardiol* 1982; 49: 1401-4.
- Johnston CI, Cubela R, Sakaguchi K, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition in plasma and tissues. *Clin Exp Hypertens A* 1987; 9: 307-21.
- Furberg CD, Pitt B. Are all angiotensin-converting enzyme inhibitors interchangeable? *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1456-60.
- Fabris B, Chen BZ, Pucic V, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) in plasma and tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 15 (Suppl. 2): S6-13.
- Fabris B, Yamada H, Cubela R, et al. Characterization of cardiac angiotensin converting enzyme (ACE) and in vivo inhibition following oral quinapril to rats. *Br J Pharmacol* 1990; 100: 651-5.
- Cushman DW, Cheung HS. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1971; 250: 261-5.
- Dzau VJ. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol* 1987; 59: 59A-65A.
- Soejima H, Ogawa H, Yasue H, et al. Effects of imidapril therapy on endogenous fibrinolysis in patients with recent myocardial infarction. *Clin Cardiol* 1997; 20: 441-5.
- Johnston CI, Fabris B, Yamada H, et al. Comparative studies of tissue inhibition by angiotensin converting enzyme inhibitors. *J Hypertens Suppl.* 1989; 7: S11-6.
- Zhuo JL, Froomes P, Casley D, et al. Perindopril chronically inhibits angiotensin-converting enzyme in both the endothelium and adventitia of the internal mammary artery in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 1997; 96: 174-82.
- Strittmatter SM, Thiele EA, Kapiloff MS, et al. A rat brain isozyyme of angiotensin-converting enzyme. Unique specificity for amidated peptide substrates. *J Biol Chem* 1985; 260: 9825-32.

26. Raasch W, Dendorfer A, Ball B, et al. The lipophilic properties of angiotensin I-converting enzyme inhibitors do not influence their diffusion through cultured endothelium. *Jpn J Pharmacol* 1999; 81: 346-52.
27. Cohen ML, Kurz KD. Angiotensin converting enzyme inhibition in tissues from spontaneously hypertensive rats after treatment with captopril or MK-421. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 220: 63-9.
28. Kaplan HR, Taylor DG, Olson SC, et al. Quinapril—a preclinical review of the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology. *Angiology* 1989; 40: 335-50.
29. Sakaguchi K, Chai SY, Jackson B, et al. Inhibition of tissue angiotensin converting enzyme. Quantitation by autoradiography. *Hypertension* 1988; 11: 230-8.
30. Unger T, Ganten D, Lang RE, et al. Is tissue converting enzyme inhibition a determinant of the antihypertensive efficacy of converting enzyme inhibitors? Studies with the two different compounds, Hoe498 and MK421, in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6: 872-80.
31. Unger T, Ganten D, Lang RE, et al. Persistent tissue converting enzyme inhibition following chronic treatment with Hoe498 and MK421 in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7: 36-41.
32. Leonetti G, Cuspidi C. Choosing the right ACE inhibitor. A guide to selection. *Drugs* 1995; 49: 516-35.
33. Linz W, Scholkens BA. Influence of local converting enzyme inhibition on angiotensin and bradykinin effects in ischemic rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 10 (Suppl. 7): S75-82.
34. Minai K, Matsumoto T, Horie H, et al. Bradykinin stimulates the release of tissue plasminogen activator in human coronary circulation: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1565-70.
35. Gryglewski RJ. Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol Toxicol* 1995; 77: 1-9.
36. Mehta JL. Modulation of arterial thrombosis by angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1-receptor blockade. *Am J Cardiol* 1998; 82: 53S-6S.
37. Bavry AA, Li D, Zander DS, et al. Inhibition of arterial thrombogenesis by quinapril but not losartan. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2000; 5: 121-7.
38. Mitsui T, Chishima S, Odawara A, et al. Imidapril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, inhibits thrombosis via reduction in aortic plasminogen activator inhibitor type-1 levels in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 863-5.
39. Sasaki Y, Noguchi T, Seki J, et al. Protective effects of imidapril on He-Ne laser-induced thrombosis in cerebral blood vessels of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Thromb Haemost* 2000; 83: 722-7.
40. Wojewódzka M, Chabielska E, Mogielnicki A, et al. Antithrombotic effect of tissue and plasma type angiotensin converting enzyme inhibitors in experimental thrombosis in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* (wystana do druku).
41. Mombouli JV, Illiano S, Nagao T, et al. Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1992; 71: 137-44.
42. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-4.
43. Linz W, Itter G, Dobrucki LW, et al. Ramipril improves nitric oxide availability in hypertensive rats with failing hearts after myocardial infarction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003; 4: 180-5.
44. van Gilst WH, de Graeff PA, Wesseling H, et al. Reduction of reperfusion arrhythmias in the ischemic isolated rat heart by angiotensin converting enzyme inhibitors: a comparison of captopril, enalapril, and HOE 498. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986; 8: 722-8.
45. Gryglewski RJ, Świąż J, Uracz W, et al. Mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitor induced thrombolysis in Wistar rats. *Thromb Res* 2003; 110: 323-9.
46. Su JB, Barbe F, Crozatier B, et al. Increased bradykinin levels accompany the hemodynamic response to acute inhibition of angiotensin-converting enzyme in dogs with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 700-10.
47. Zhang X, Xie YW, Nasjletti A, et al. ACE inhibitors promote nitric oxide accumulation to modulate myocardial oxygen consumption. *Circulation* 1997; 95: 176-82.
48. Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A. Angiotensin-converting enzyme inhibition modifies angiotensin but not kinin peptide levels in human atrial tissue. *Hypertension* 1999; 34: 171-5.
49. Rodriguez-Garcia JL, Villa E, Serrano M, et al. Prostacyclin: its pathogenic role in essential hypertension and the class effect of ACE inhibitors on prostaglandin metabolism. *Blood Press* 1999; 8: 279-84.
50. Hornig B, Arakawa N, Haussmann D, et al. Differential effects of quinaprilat and enalaprilat on endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998; 98: 2842-8.
51. Anderson TJ, Elstein E, Haber H, et al. Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (BANFF study). *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 60-6.
52. Obata T, Yamanaka Y. Protective effect of imidaprilat, an angiotensin-converting enzyme inhibitor on *OH generation in rat myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472: 62-70.
53. Obata T. Protective effect of imidaprilat, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced *OH generation in rat striatum. *Eur J Pharmacol* 1999; 378: 39-45.
54. de Nigris F, D'Armiento FP, Somma P, et al. Chronic treatment with sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce susceptibility of plasma LDL to in vitro oxidation, formation of oxidation-specific epitopes in the arterial wall, and atherogenesis in apolipoprotein E knockout mice. *Int J Cardiol* 2001; 81: 107-15; discussion 115-6.
55. Scribner AW, Loscalzo J, Napoli C. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function and oxidant stress. *Eur J Pharmacol* 2003; 482: 95-9.
56. Chopra M, Beswick H, Clapperton M, et al. Antioxidant effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors: free radical and oxidant scavenging are sulfhydryl dependent, but lipid peroxidation is inhibited by both sulfhydryl- and nonsulfhydryl-containing ACE inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19: 330-40.
57. van der Giet M, Erinola M, Zidek W, et al. Captopril and quinapril reduce reactive oxygen species. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 732-7.

58. Napoleone E, Di Santo A, Camera M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors downregulate tissue factor synthesis in monocytes. *Circ Res* 2000; 86: 139-43.
59. Lindmark E, Siegbahn A. Tissue factor regulation and cytokine expression in monocyte-endothelial cell co-cultures. Effects of statin an ACE-inhibitor and a low-molecular-weight heparin. *Thromb Res* 2003; 108: 77-84.
60. Clozel M, Kuhn H, Hefti F, et al. Endothelial dysfunction and subendothelial monocyte macrophages in hypertension. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *Hypertension* 1991; 18: 132-41.
61. Kothari SA, Le MK, Gandhi PJ. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on thrombotic mediators: potential clinical implications. *J Thromb Thrombolysis* 2003; 15: 217-25.
62. Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE. Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin. *Thromb Haemost* 1997; 77: 522-5.
63. Pawlak R, Chabielska E, Matys T, et al. Thiol repletion prevents venous thrombosis in rats by nitric oxide/prostacyclin-dependent mechanism: relation to the antithrombotic action of captopril. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 503-9.
64. Cheng JJ, Chao YJ, Wung BS, et al. Cyclic strain-induced plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) release from endothelial cells involves reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 100-5.
65. Kramkowski K, Mogielnicki A, Chabielska E, et al. The effect of tissue and plasma angiotensin converting enzyme inhibitors on overall haemostatic potentials in rats. *Thromb Res* 2005; 25: (w druku).
66. Tsikouris JP, Suarez JA, Meyerrose GE, et al. Questioning a class effect: does ACE inhibitor tissue penetration influence the degree of fibrinolytic balance alteration following an acute myocardial infarction? *J Clin Pharmacol* 2004; 44: 150-7.
67. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, et al. Effects of imidapril therapy on endogenous fibrinolysis in patients with recent myocardial infarction. *Clin Cardiol* 1997; 20: 441-5.
68. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 983-8.
69. Ekholm M, Wallen NH, Johnsson H, et al. Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition with ramipril reduces thrombin generation in human hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2002; 103: 151-5.
70. Perez-Ruiz A, Montes R, Velasco F, et al. Regulation by nitric oxide of endotoxin-induced tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in endothelial cells. *Thromb Haemost* 2002; 88: 1060-5.
71. Wei XR, Hu L, Du J. Effect of captopril on platelet cytosolic [Ca²⁺]_i and plasma TXA₂/PGI₂ in renovascular hypertensive rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1998; 19: 89-91.
72. Riondino S, Pignatelli P, Pulcinelli FM, et al. Platelet hyperactivity in hypertensive older patients is controlled by lowering blood pressure. *J Am Geriatr Soc* 1999; 47: 943-7.
73. Zurbano MJ, Anguera I, Heras M, et al. Captopril administration reduces thrombus formation and surface expression of platelet glycoprotein IIb/IIIa in early postmyocardial infarction stage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1791-5.
74. Zannad F, Bray-Desboscs L, el Ghawi R, et al. Effects of lisinopril and hydrochlorothiazide on platelet function and blood rheology in essential hypertension: a randomly allocated double-blind study. *J Hypertens* 1993; 11: 559-64.
75. Domaniewski T, Mogielnicki A, Kramkowski K, et al. Wpływ osoczowych i tkankowych inhibitorów konwertazy angiotensyny II (ACE-1s) na agregację płytek krwi szczura. *Wiadomości Lekarskie* 2004; LVII: 9-10.
76. Moser L, Callahan KS, Cheung AK, et al. ACE inhibitor effects on platelet function in stages I-II hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 30: 461-7.
77. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, et al. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 145-53.
78. Fox KM; EUROpean trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease Investigators. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 2003; 362: 782-8.
79. Braunwald E, Domanski MJ, Fowler SE, et al. Angiotensin-converting-enzyme inhibition in stable coronary artery disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 2058-68.
80. Richer C, Doussau MP, Giudicelli JF. Systemic and regional hemodynamic profile of five angiotensin I converting enzyme inhibitors in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Cardiol* 1987; 59: 12D-7D.
81. Pitt B, O'Neill B, Feldman R, et al. The QUinapril Ischemic Event Trial (QUIET): evaluation of chronic ACE inhibitor therapy in patients with ischemic heart disease and preserved left ventricular function. *Am J Cardiol* 2001; 87: 1058-63.
82. Tatti P, Pahor M, Byington RP, et al. Outcome results of the Fosinopril Versus Amlodipine Cardiovascular Events Randomized Trial (FACET) in patients with hypertension and NIDDM. *Diabetes Care* 1998; 21: 597-603.
83. Estacio RO, Jeffers BW, Hiatt WR, et al. The effect of nisoldipine as compared with enalapril on cardiovascular outcomes in patients with non-insulin-dependent diabetes and hypertension. *N Engl J Med* 1998; 338: 645-52.

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 postępowi 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.

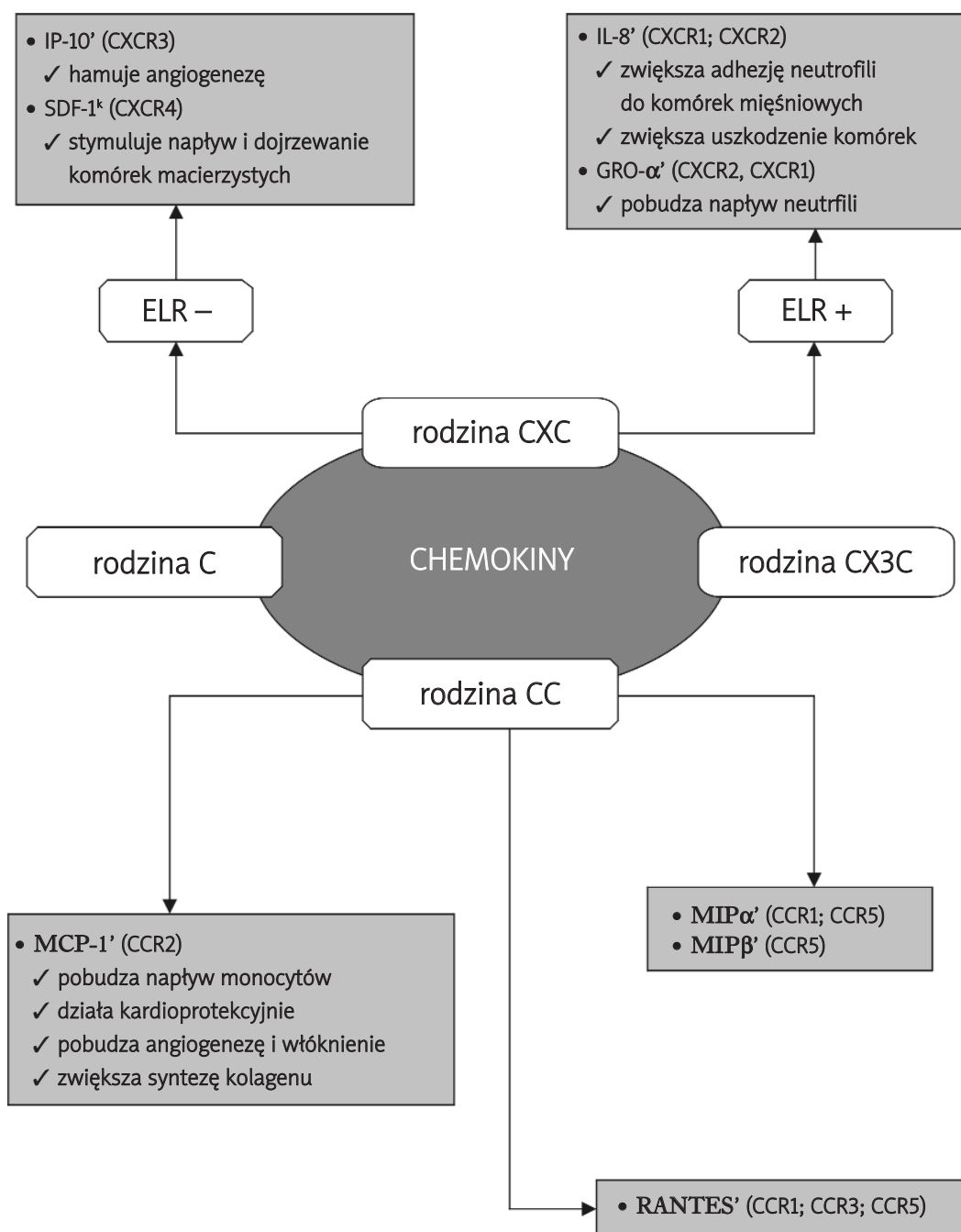
Odpowiedź zapalna komórki jest regulowana na poziomie genomu przez czynniki transkrypcyjne, takie jak $\text{NF-}\kappa\text{B}$. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ jest grupą białek wpływających na ekspresję genów odpowiedzialnych za procesy zapalne, wzrostowe oraz adhezji. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ połączony 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 zawale 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 zawale 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.

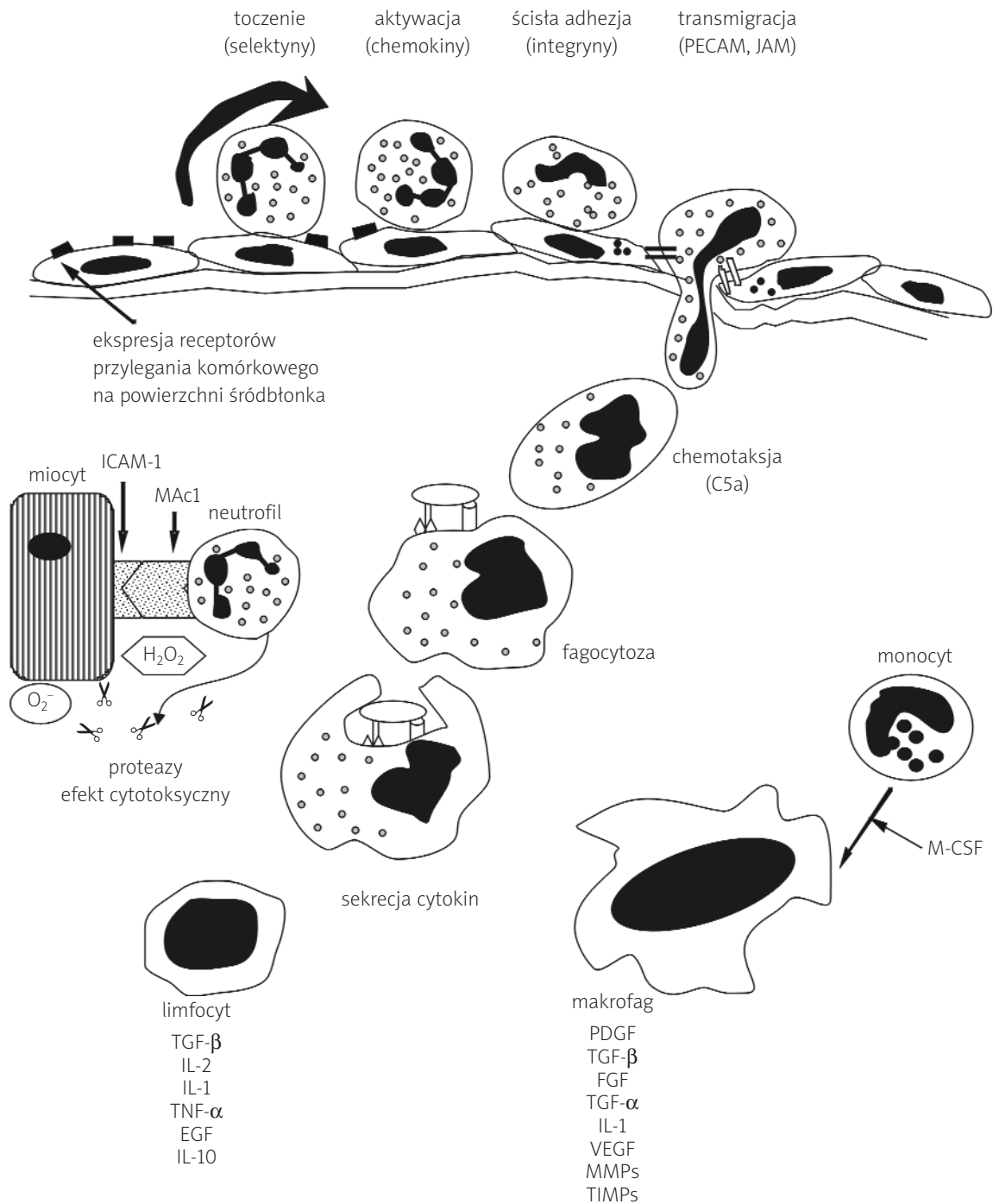
Prolifercja komórek i synteza macierzy międzykomórkowej

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 angiogenezy. 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.

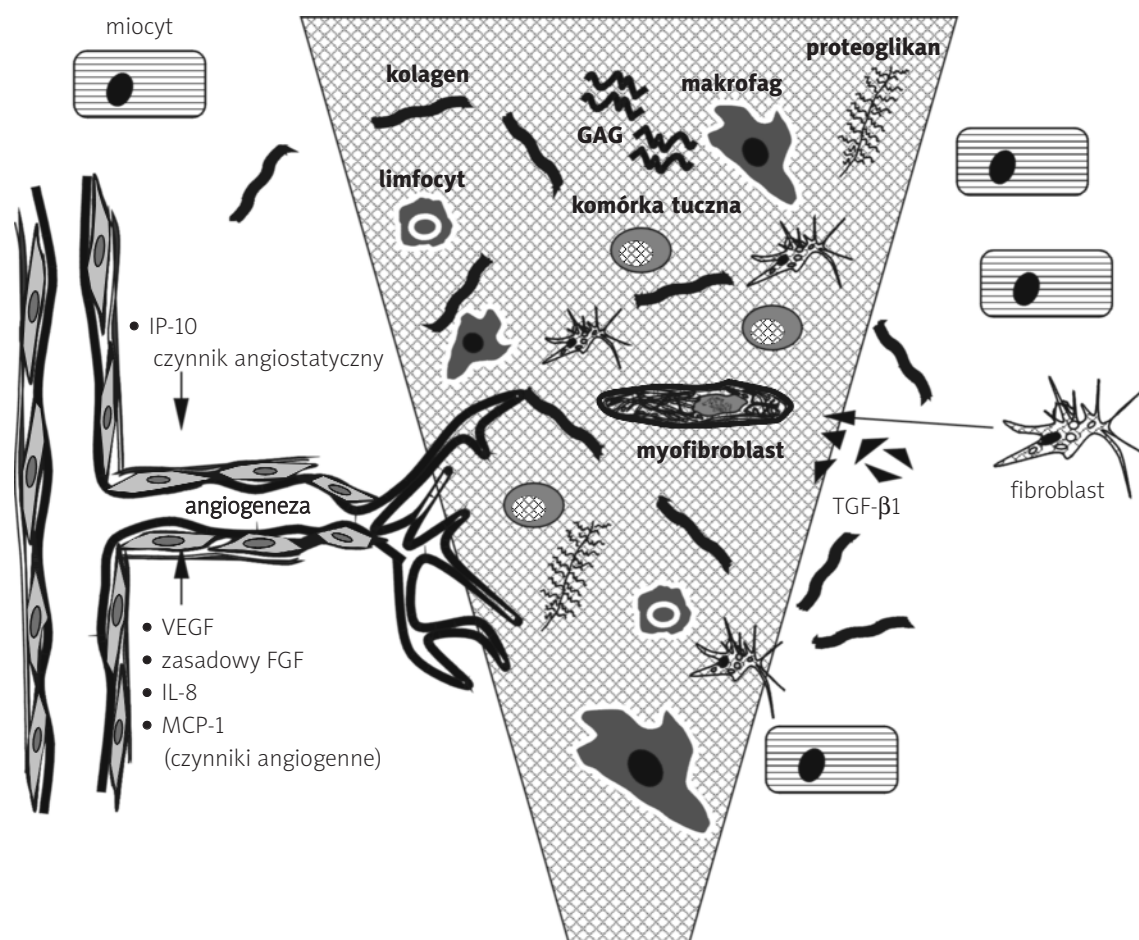
Orientacja przestrzenna komórek napływających do obszaru gojenia jest kontrolowana przez aparat genetyczny komórki, a jej zaburzenie może powodować wystąpienie powikłań zawału, np. niewydolność serca, rozstrzeń komory, pęknięcie serca. Blankenteijn i wsp. zidentyfikowali gen *rfz2* odpowiedzialny za 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



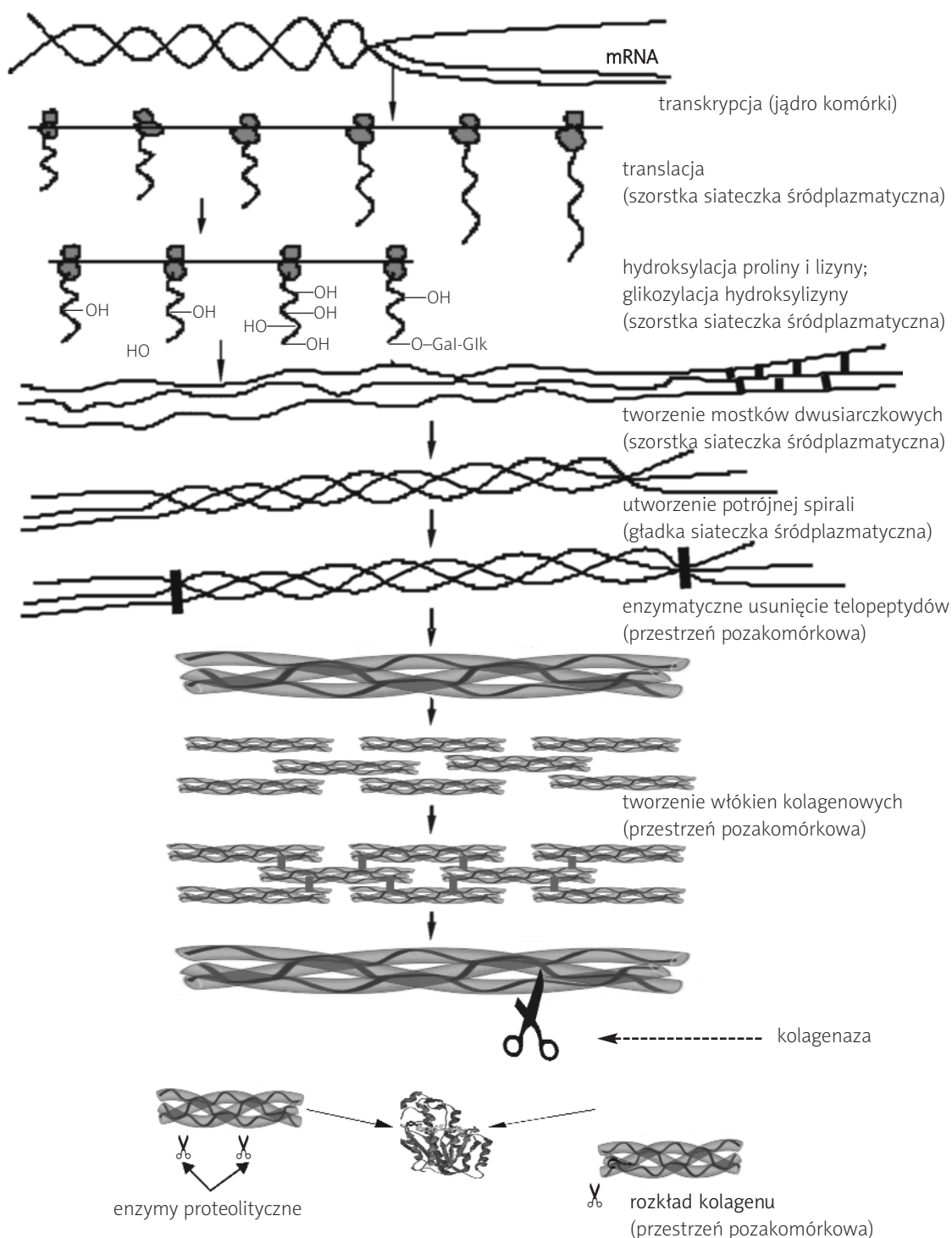
Rycina 3. Tworzenie tkanki łącznej ziarnistej w polu martwicy mięśnia sercowego. Okres ten charakteryzuje się napływem do rany: monocytów/makrofagów, limfocytów i komórek tucznych, będących źródłem cytokin i mediatorów regulujących proliferację, migrację komórek, syntezę istoty międzykomórkowej i angiogenezę. 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.

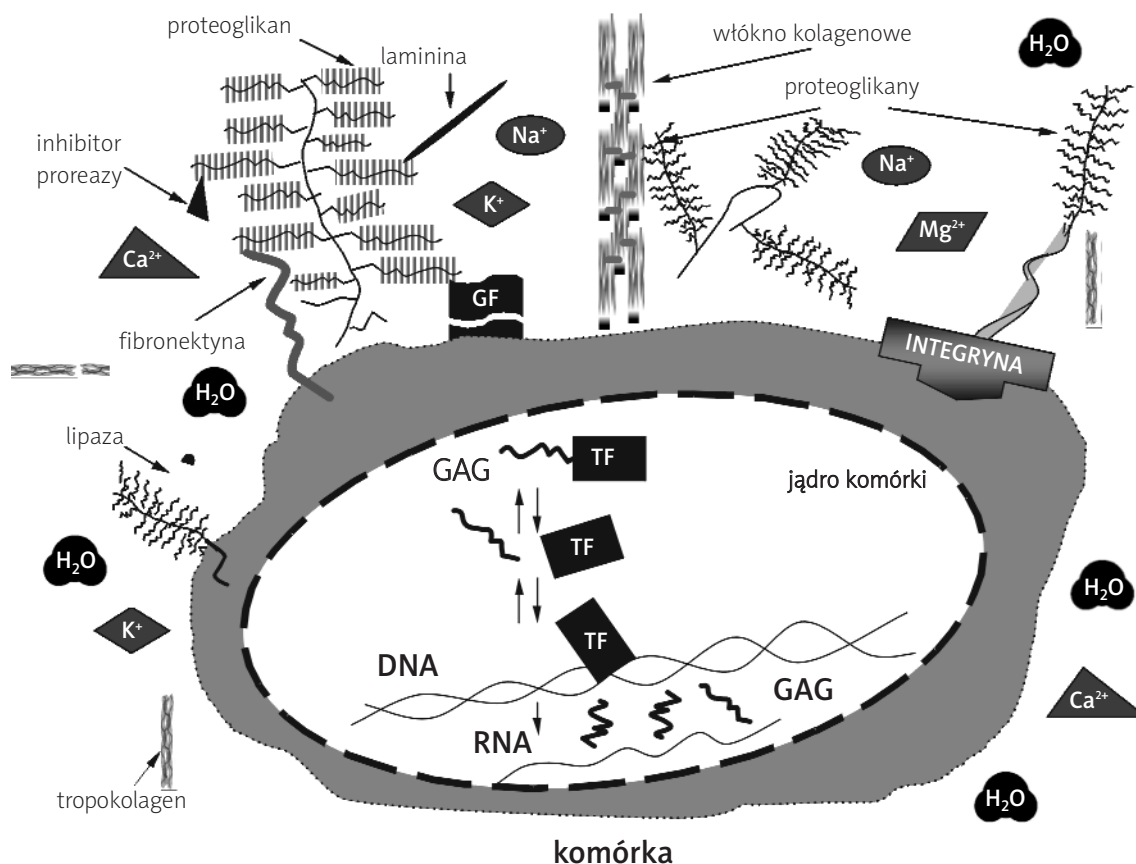
Synteza kolagenu kontrolowana jest przez miejscowe i ogólnoustrojowe układy regulacji. TGF-β1 nie tylko powoduje transformację fibroblastów, ale nasila też ekspresję czynnika CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*). CTGF, którego zawartość zwiększa się w zawałe u szczurów, pobudza syntezę kolagenu typu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

Rozwój niewydolności serca w przebiegu choroby wieńcowej – rola czynników genetycznych

Development of heart failure in the course of coronary artery disease – the role of genetic factors

Anna Kozieradzka, Karol Kamiński*, Włodzimierz J. Musiał

Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna, Białystok

Streszczenie

Niewydolność serca jest chorobą o wzrastającej częstości występowania oraz o dużej śmiertelności, w zaawansowanych stadiach porównywalnej z chorobami nowotworowymi. Jedną z jej głównych przyczyn jest choroba wieńcowa, a w szczególności zawał serca. Możliwość wyłonienia grupy obciążonej wysokim ryzykiem rozwoju niewydolności serca w przebiegu choroby wieńcowej mogą stworzyć badania genetyczne. Na szczególną uwagę zasługuje zmienność genów związanych z układem renina-angiotensyna-aldosteron: polimorfizm insercja/delecja (I/D) genu enzymu konwertującego angiotensynę, różne warianty genu angiotensynogenu, receptorów angiotensyny (AT1 i AT2) i syntazy aldosteronu. Innymi genami, których formy mogą wpływać na upośledzenie funkcji serca, są geny receptorów adrenergicznych (β 1, β 2, α 2C), deaminazy-1 AMP, endoteliny-1, śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS), pre-ANP, pre-BNP oraz geny czynników zapalnych (TNF- α , IL-6, MCP-1, TGF, MMP-2). Reakcja organizmu na lek jest także w dużej mierze uwarunkowana genetycznie. Zajmująca się tą tematyką farmakogenetyka stwarza nowe możliwości optymalnego dostosowania terapii do konkretnego pacjenta z niewydolnością serca. Badanie genetycznego podłoża niewydolności serca ma w tym świetle wymiar nie tylko naukowy, ale i praktyczny.

Abstract

The number of patients suffering from heart failure is constantly increasing. One of its main causes is coronary artery disease, especially myocardial infarction. Progression of heart failure depends both on the extent of ischaemic injury and the course of subsequent adaptive processes. Genetic methods may help to find individuals at high risk of developing heart failure. There are multiple genes influencing circulatory system, some of their alleles may potentially affect progression of the disease. Among the most promising targets are genes of the renin-angiotensin-aldosterone system: insertion/deletion (I/D) polymorphism of angiotensin converting enzyme gene, polymorphisms of angiotensinogen, angiotensin receptors (AT1 and AT2) and aldosterone syntase genes. Other genetic factors, which may affect are different gene variants of adrenergic receptors (β 1, β 2, α 2C), AMP deaminase-1, endothelin-1, endothelial nitric oxide syntase, precursors of natriuretic peptides and inflammatory factors (TNF- α , IL-6, MCP-1, TGF, MMP-2). Furthermore, the response to drugs may depend on genetic background, that is why pharmacogenetics creates new possibilities to tailor the best therapy for each patients with heart failure. Therefore research in the field of genetic factors affecting the development of heart failure has not only scientific, but also practical value.

Kardiol Pol 2005; 63; 4 (Supl. 2): 440-449

Epidemiologia i etiologia niewydolności serca

Niewydolność serca (HF) jest poważnym problemem klinicznym i społecznym. Szacuje się, że dotyczy 0,4–2% populacji europejskiej [1]. W Polsce częstość występowania HF wśród pacjentów 65-letnich i starszych zgłaszających się do lekarza pierwszego kontaktu wynosiła

53,2% [2]. Brakuje precyzyjnych danych, gdyż badania populacyjne dotyczące rozwoju HF w przebiegu choroby wieńcowej (CAD) są nieliczne i trudne do porównania ze względu na różnice w stosowanej metodyce.

Za główne przyczyny HF uważa się chorobę niedokrwinną serca (IHD) i nadciśnienie tętnicze. W bada-

*Uwagi o finansowaniu:

dr n. med. Karol Kamiński jest stypendystą Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej

Adres do korespondencji:

dr n. med. Karol Kamiński, Klinika Kardiologii Akademii Medycznej, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24 a, 15-276 Białystok, e-mail: fizklin@poczta.onet.pl

niu Framingham choroba wieńcowa lub nadciśnienie poprzedzały 90% przypadków choroby [3]. W krajowej populacji chorych z HF choroba wieńcowa występowała u 80% kobiet i 87% mężczyzn, a nadciśnienie odpowiednio u 77% i 64% [2]. Idiopatyczną kardiomiopatię rozstrzeniową (IDC) uznano za przyczynę niewydolności jedynie u 6% kobiet i 8% mężczyzn. Postacią choroby wieńcowej szczególnie często prowadzącą do niewydolności jest zawał serca. Według Scotta niewydolność serca po zawale rozwija się u 30% pacjentów z cukrzycą i 18% bez cukrzycy [4]. Szacując liczbę zawałów w Polsce na kilkadziesiąt tysięcy rocznie, można oczekiwać, że co roku niewydolność serca z tego powodu rozwinię się u niemal 20 000 osób. Śmiertelność z powodu HF jest bardzo wysoka, w badaniu Framingham 5-letnie przeżycie wynosiło jedynie 25% u mężczyzn i 38% wśród kobiet [5].

Rozwój niewydolności serca w chorobie niedokrwiennej

Długotrwałe niedokrwienie oraz zawał predysponują do rozwoju niewydolności serca. Następstwem przewlekłego niedokrwienia mogą być zarówno odwracalne zaburzenia czynności mięśnia sercowego, określane mianem zamrożenia, jak też nieodwracalne procesy, takie jak utrata kardiomiocytów i zastępcze włóknienie tkanki prowadzące do upośledzenia funkcji lewej komory. Zawał serca powoduje ostrą martwicę komórek mięśniowych w obszarze zaopatrywanym przez tętnicę dozawalową. Śmierć lub dysfunkcja części komórek powoduje wzrost obciążenia pozostałych, które dążą do optymalizacji wydatków energetycznych. Prowadzić do tego ma reekspresja płodowego zestawu genów (m.in. czynników transkrypcyjnych c-fos, c-myc, c-jun i Egr-1), w tym izoform białek kurczliwych – bardziej wydajnych energetycznie, lecz mniej sprawnych. W rezultacie dochodzi do pogorszenia kurczliwości. Mechanizmem kompensującym spadek kurczliwości ma być przerost mięśnia. Po zawale dochodzi również do aktywacji neurohormonalnych mechanizmów kompensacyjnych: współczulnego układu nerwowego (SNS), układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) i produkcji hormonu antydiuretycznego (ADH). Ich zadaniem jest utrzymanie prawidłowego rzutu serca, lecz stałe pobudzenie w warunkach nieodwracalnego uszkodzenia powoduje dalszy wzrost obciążenia, uruchamiając błędne koło. Zmiany w szlakach przekazywania sygnału w komórce wzmagają apoptozę, odkładanie kolagenu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej i zaburzają homeostazę wapnia w miocycie. Efektem tego jest patologiczny przerost, przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej, postępująca rozstrzeń i zmiana geometrii lewej komory, co w efekcie prowadzi do jej dysfunkcji.

Rozwój niewydolności serca można uznać za wypadkową uszkodzenia wywołanego niedokrwieniem i następczych procesów niewłaściwej adaptacji. Poszukiwane są stany sprzyjające procesom prowadzącym do niewydolności serca. W tej chwili za czynniki ryzyka HF po zawale uznaje się wiek, płeć żeńską, cukrzycę i przyspieszoną częstość pracy serca w ostrej fazie zawału. Dodatkowe możliwości wytonienia grupy obciążonej wysokim ryzykiem mogą stworzyć badania genetyczne. Obiecującym przedmiotem badań mogą być geny wpływające na stężenie lub aktywność substancji związanych z rozwojem niewydolności serca (Rycina 1.).

Genetyczne uwarunkowanie niedokrwiennego uszkodzenia mięśnia sercowego

Kompleks zmian w mięśniu sercowym powstających w wyniku niedokrwienia nazywany jest przez niektórych kardiomiopatią niedokrwinną. Jej rozwojowi sprzyjać będą allele powodujące przyspieszenie miażdżycy naczyń wieńcowych. Z drugiej strony duże znaczenie może mieć również odporność mięśnia sercowego na niedokrwienie oraz zdolność aktywacji mechanizmów kompensacyjnych. Odnosi się to zarówno do reakcji na niedokrwienie pojedynczych komórek, jak też całego narządu, w tym do angiogenezy, stymulacji odpowiedzi zapalnej, rozrostu tkanki łąkowej oraz zmiany geometrii lewej komory.

Doniesienia na temat wpływu czynników genetycznych na rozwój niewydolności serca po zawale są nieliczne. Przeprowadzono szereg badań genetycznych typu case-control na grupach pacjentów z niewydolnością krążenia bez uwzględniania etiologii. Mechanizmy progresji niewydolności serca w pewnym momencie stają się podobne. Jednak kardiomiopatia idiopatyczna, niedokrwienna oraz uszkodzenie toksyczne mają tak zróżnicowaną etiologię, że trudno jest zbiorczo właściwie analizować czynniki genetyczne sprzyjające tym procesom. Dostępna literatura opisująca czynniki predysponujące do rozwoju HF w przebiegu IHD jest dość ograniczona.

Rola stymulacji adrenergicznej

Aminy katecholowe pobudzają receptory α - i β -adrenergiczne. Na komórkach mięśniowych występują głównie receptory β_1 oraz α_1 , w mniejszej ilości β_2 i β_3 .

Efektem wiązania z receptorami β jest stymulacja białka Gs, aktywacja cykazy adenylanowej, wzrost kurczliwości i wydłużenie fazy relaksacji włókien mięśniowych. Pobudzenie receptorów α_1 prowadzi do aktywacji podjednostki Gq i szlaku fosfolipazy C (PLC). Obie kaskady mają zdolność aktywacji czynników transkryp-

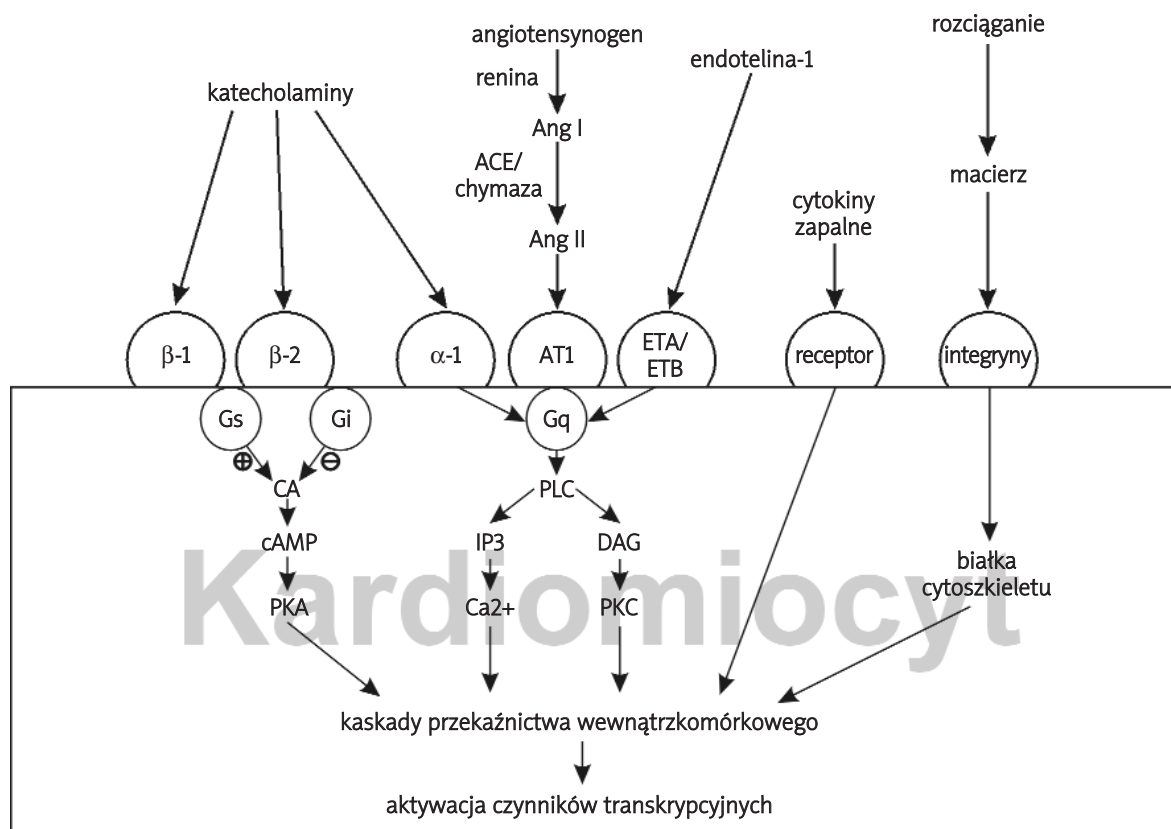
cyjnych (MEF2, GATA4, Nkx2.5) i translacyjnych (eIF3, eIF2) związanych z przerostem mięśnia sercowego.

Po zawale, w wyniku zwiększonej stymulacji układu współczulnego dochodzi do *regulacji w dół* receptorów β 1 oraz do zmniejszenia ich wrażliwości na działanie katecholamin, tłumaczone zwiększeniem aktywności hamującej podjednostki białka G- Gi. Proces *regulacji w dół* jest wypadkową zmniejszenia transkrypcji i zwiększenia degradacji receptora. Według jednej z teorii, desensytyzacja receptorów adrenergicznych jest mechanizmem adaptacyjnym, przeciwdziałającym rozwojowi niewydolności serca [6]. Według innej, jest to czynnik sprawczy rozwoju niewydolności serca zwią-

zanej z przerostem mięśnia [7]. Mechanizm ten miałby obejmować aktywację kinazy 1 receptora β -adrenergicznego (β ARK1) odpowiedzialnej za fosforylację receptora w miejscu połączenia z białkiem G, co blokuje przekazywanie sygnału [7].

Polimorfizmy genu receptora β 1-adrenergicznego

W literaturze opisywana jest zmienność genu receptora β 1 w pozycji 1165 regionu kodującego, co jest przyczyną polimorfizmu Arg/Gly w pozycji 389 łańcucha aminokwasowego. W badaniach eksperymentalnych na młodych myszach transgenicznym wariant



Rycina 1. Najważniejsze mechanizmy neurohormonalne związane z rozwojem niewydolności serca po zawale. Po zawale dochodzi do wzrostu poziomu amin katecholowych, angiotensyny II, cytokin zapalnych i endoteliny 1. Wszystkie te substancje działają za pośrednictwem receptorów błonowych kardiomiocytów. Receptory β 1 i β 2 są związane z białkiem Gs (β 2 również z Gi) i działają przez szlak cyklazy adenylanowej (CA). Z białkiem Gq i fosfolipazą C (PLC) są związane receptory α 1, AT1, ETA i ETB. Powyższe szlaki sygnalizacyjne prowadzą do aktywacji kaskad przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego i zmian ekspresji genów charakterystycznych dla niewydolności serca.

CA – cyklaza adenylanowa; cAMP – cykliczny adenozymonofosforan; PKA – kinaza białkowa A; ANG – angiotensyna; ACE – enzym konwertujący angiotensynę; AT1 – receptor angiotensyny typu 1; ETA – receptor angiotensyny typu A; ETB – receptor angiotensyny typu B; PLC – fosfolipaza C; IP3 – trójfosforan inozytolu; DAG – diacyloglicerol; PKC – kinaza białkowa C.

Arg389 warunkuje większą aktywność cyklazy adenylanowej, a przez to również większą kurczliwość mięśnia sercowego niż Gly389 [8]. Między 3. a 6. mies. ich życia wrażliwość receptorów Arg389 zmniejszała się jednak o 30% i osiągała poziom niższy niż u Gly389. Korelowało to ze spadkiem aktywacji Gs i osłabioną odpowiedzią na dobutaminę. Podobnej tendencji nie obserwowano u osobników z allelem Gly389. W miocytach Arg389 obserwowano zmiany typowe dla rozwijającej się niewydolności: zwiększała się ekspresja genów łańcucha ciężkiego miozyny β , przedsiolkowego peptydu natriuretycznego (ANP), a malała ekspresja SERCA (ATP-azy wapniowej retikulum endoplazmatycznego) i łańcuchów ciężkich miozyny α . Zdegenerowane miocyty były zastępowane tkanką łączną. Z kolei osobniki Arg389 okazały się bardziej podatne na leczenie β -blokerem [8]. Następnym etapem badania była próba kliniczna u pacjentów z niewydolnością serca poddawanych terapii karwedilem. Homozygoty Arg389 wykazywały wzrost frakcji wyrzutowej średnio o 8,7%, heterozygoty o 7,2%, a homozygoty Gly389 jedynie 0,93% [8]. Wydaje się, iż allel Arg389 może predysponować do rozwoju niewydolności serca, z drugiej strony ten wariant receptora oznacza większe korzyści terapeutyczne związane ze stosowaniem β -blokerów. Jednak ostatnio opublikowana praca Covolo i wsp. nie potwierdziła związku pomiędzy polimorfizmem Arg389Gly a występowaniem niewydolności krążenia [9]. Do tego badania typu *case-control* włączano chorych niezależnie od etiologii, natomiast nie przeprowadzono dotychczas badań określających częstości polimorfizmu Arg/Gly389 w populacji wyłącznie z niedokrwinnym uszkodzeniem serca.

Inny polimorfizm genu receptora β 1 dotyczy kodonu 49 (Ser/Gly). W badaniach *in vitro* w komórkach z ekspresją allelu Gly49 obserwowano wyższą aktywność cyklazy adenylanowej. Ten typ receptora miał większe powinowactwo do agonistów i antagonistów. Ponadto w większym stopniu ulegał *regulacji w dół* i desensytyzacji pod wpływem katecholamin [6]. Chociaż nie obserwowano różnicy w częstości występowania allelu Gly49 między pacjentami z niewydolnością serca a grupą kontrolną, to jednak allel Gly49 uważa się za *ochronny*, gdyż zauważono jego korzystny wpływ na przeżycie i częstość hospitalizacji pacjentów z niewydolnością serca. W ciągu 5-letniej obserwacji powikłania sercowo-naczyniowe wystąpiły u 62% pacjentów homozygot SerSer, podczas gdy tylko u 39% w grupie nosicieli allelu Gly [10]. Pozytywny wpływ allelu Gly49 na rokowanie w niewydolności serca miałyby potwierdzać tezę o korzystnym działaniu desensytyzacji receptorów na stan mięśnia sercowego przy wzmożonej stymulacji adrenergicznej [6].

Zmienność pozostałych receptorów układu adrenergicznego

W błonie presynaptycznej neuronów pozazwojowych znajduje się receptor α 2C-adrenergiczny. Na drodze sprzężenia zwrotnego hamuje on wydzielanie noradrenaliny. W wyniku delecji (Del322-325) powstaje receptor o osłabionej funkcji, predysponujący do wzrostu stymulacji adrenergicznej [11]. Dowiedziono, że mutacja genu receptora α 2C-adrenergicznego ma synergistyczne działanie z allelem Arg389 receptora β 1-adrenergicznego i razem zwiększają ryzyko wystąpienia niewydolności serca niezależnie od jej etiologii [11]. Dotyczy to głównie przedstawicieli rasy czarnej, ze względu na znacznie częstsze występowanie mutacji genu receptora α 2C w tej populacji.

Receptory β 2-adrenergiczne występują w sercu w znacznie mniejszej ilości. Oddziałują nie tylko z Gs, ale również mogą pobudzać Gi (podjednostkę hamującą) i brać udział w aktywacji kinazy tyrozynowej Src. Poprzez stymulację białka Gs dochodzi do zwiększonego działania inotropowego dodatniego, ale również nasilenia apoptozy. Z kolei aktywacja podjednostki Gi hamuje procesy apoptozy. Istnienie alternatywnych ścieżek przekazywania sygnału przez receptory β 2 może tłumaczyć, dlaczego zachowanie funkcji tych receptorów jest korzystne w przebiegu niewydolności serca. Wydaje się, że zdolność aktywacji każdego z dwóch przeciwstawnych szlaków może zależeć od stanu konformacyjnego receptora i obecności związków modyfikujących go. Przykładem substancji zwiększającej aktywację białka Gi przez receptory β 2 jest karwedilol, lek o udokumentowanej skuteczności w niewydolności krążenia [12].

Głównym przedmiotem badań w przypadku receptora β 2 jest polimorfizm kodonu 164. W populacji dominuje allel kodujący w tej pozycji treoninę – Thr. U około 4% badanych występuje mutacja powodująca zamianę na izoleucynę (Ile). Wiąże się to ze zmniejszeniem powinowactwa do agonistów i zmniejszeniem aktywacji cyklazy adenylanowej o 50% z powodu upośledzonego wiązania się z Gs [13]. Nosiciele allelu Ile164 z niewydolnością serca mieli niższe roczne przeżycie niż homozygoty Thr (42% vs 76%) [14]. Do badania włączano zarówno chorych z idiopatyczną kardiomiopatią rozstrzeniową, jak i z kardiomiopatią niedokrwinną (44% badanej grupy).

Inne polimorfizmy genu receptora β 2 wykryto w kodonach 16 (Arg/Gly) i 27 (Gln/Glu). Allel 16Gly nasila *regulację w dół* i przypuszcza się, że może mieć niekorzystny wpływ na przebieg niewydolności serca. Natomiast mutacja Glu27 zapobiega zmniejszeniu liczby receptorów w warunkach wzmożonej stymulacji, co teoretycznie wydaje się być zjawiskiem korzystnym. Jednak badania kliniczne nie potwierdziły takiego związku

[9]. Nie zaobserwowano też zależności między wymienionymi genotypami a rokowaniem u pacjentów z niewydolnością serca [14].

Jednym z istotnych czynników prognostycznych w niewydolności serca jest tolerancja wysiłku, którą utożsamia się ze szczytowym wykorzystaniem tlenu (pVO₂) podczas testu wysiłkowego. Spadek pVO₂ koreluje z pogarszaniem się stanu klinicznego, ze skróceniem życia pacjentów oraz ze zmniejszeniem gęstości receptorów β_2 w sercu. Wykazano, iż allele związane z osłabieniem funkcji receptorowej: Ile164, Gly16 oraz kombinacja Gly16-Gln27, predysponują do gorszej tolerancji wysiłku u pacjentów z niewydolnością serca [15].

Układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAA)

Kolejnym mechanizmem sprzyjającym rozwojowi niewydolności serca po zawale jest aktywacja układu RAA. Na mięsień sercowy ma wpływ ogólnoustrojowy i lokalny układ RAA. Angiotensyna II działa poprzez receptor AT1 związany z białkiem Gq i fosfolipazą C. Powoduje to nasilenie prądu wapniowego do wnętrza miocytów i wzrost kurczliwości serca, aktywuje czynniki transkrypcyjne i wzmacnia biosyntezę białka, prowadząc do przerostu mięśnia. Zwiększając sekrecję TGF- β , stymuluje proliferację fibroblastów oraz syntezę kolagenu. Pobudzenie receptorów AT1 może doprowadzić do apoptozy komórki [7]. Uważa się, że receptor AT2 ma działanie często przeciwstawne do AT1. W niewydolnym sercu receptory AT1 podlegają *regulacji w dół*, podczas gdy ekspresja AT2 rośnie. Pozasercowe funkcje angiotensyny II, istotne dla rozwoju HF, to wzrost uwalniania katecholamin, nasilenie aktywności układu sympatycznego, retencja sodu i wody oraz sekrecja aldosteronu.

W literaturze opisywane są polimorfizmy pojedynczego nukleotydu genu (SNP) angiotensynogenu: T174M i M235T (w zakresie regionu kodującego) oraz A (-20) C i G (-6) A (w obrębie promotora). Badanie przeprowadzono na grupie 10 000 pacjentów. Osobnicy 6AA, 174TT lub 235TT mieli istotnie wyższe stężenie angiotensynogenu w osoczu. W populacji kobiet różnica ta była większa i predysponowała do wyższych wartości ciśnienia tętniczego. Nie obserwowano jednak, aby allele te wywierały wpływ na ryzyko wystąpienia choroby niedokrwiennej serca [16]. Z drugiej strony, w badaniu oceniającym ryzyko rozwoju niewydolności serca stwierdzono większe zagrożenie kobiet o genotypie (-6) GG 235MT [17].

Duży wpływ na rozwój niewydolności serca może mieć zmienność genu enzymu konwertującego angiotensynę (ACE). Opisywany jest polimorfizm delecja/insercja (D/I) w obrębie intronu genu ACE. Genotyp DD wiąże się z wyższym stężeniem ACE w surowicy i wyższą jego aktywnością w sercu [18]. Opublikowano prace

świadczące o tym, że predysponuje on do zawału serca i przerostu lewej komory [19]. Częstość występowania genotypu DD wśród pacjentów z kardiomiopatią niedokrwinną była o 68% wyższa niż w grupie kontrolnej [20]. Wykazano, że allele D wpływa niekorzystnie na frakcję wyrzutową i wskaźnik objętości późnoskurczowej w badaniu wentrykulograficznym przeprowadzonym 4–7 miesięcy po zawale [19]. W echo wykonanym 4 miesiące po zawale osobnicy DD lub ID mieli istotnie wyższe wskaźniki objętości późnoskurczowej i późnorozkurczowej niż osoby z genotypem II [21]. Z drugiej strony, pojawiło się doniesienie wiążące genotyp DD z niższą śmiertelnością chorych po zawale [18], co można tłumaczyć większymi korzyściami tych pacjentów z leczenia inhibitorami ACE i β -blokerami [22, 23].

Kolejnym ogniwem układu RAA są receptory angiotensyny II. Opisano polimorfizm A1166C receptora AT1. Wysunięto hipotezę o synergistycznym działaniu interakcji polimorfizmu I/D w genie ACE i A1166C w AT1. W grupie pacjentów z zawałem ściany przedniej serca genotyp DD CC/AC był związany z istotnie wyższymi: objętością późnorozkurczową i wskaźnikiem masy lewej komory [24]. Ta patologia może predestynować do rozwoju HF, jednak rola polimorfizmu receptora AT1 w rozwoju niewydolności serca wymaga jeszcze bezpośredniego potwierdzenia.

Istnieją nieliczne doniesienia na temat zmienności genu receptora AT2 czy też polimorfizmu genu syntazy aldosteronu. Nie badano ich związku z kardiomiopatią niedokrwinną.

ACE nie jest jedynym enzymem przekształcającym angiotensynę I w II. Szacuje się, że w sercu niemal w 85% proces ten jest uwarunkowany aktywnością innego enzymu – chymazy [25]. Chymaza (CMA) jest produkowana przez komórki tuczne serca. Jej gen charakteryzuje się polimorfizmem A/B. Jego rola w rozwoju niewydolności serca nie została jednak dotychczas zbadana. Natomiast osoby o genotypie AA mają większą masę lewej komory, co mogłoby sprzyjać rozwojowi HF [26].

Z układem RAA ściśle związany jest układ kinina-kalikreina-bradykinina. Bradykinina to 9-aminokwasowy peptyd działający za pośrednictwem receptorów BK-1 i BK-2. Silnie rozkurcza mięśnie gładkie, aktywuje syntazę tlenu azotu i szlak prostaglandyn. Enzymem odpowiedzialnym za jej degradację jest ACE. Równowaga między układem RAA i kinina-kalikreina-bradykinina to ważny czynnik zapewniający prawidłowe funkcjonowanie układu krwionośnego. Opisywana jest zmienność BK-1 (-699C/G) i BK-2 (± 9 delecja w eksonie 1). Badano związek tych polimorfizmów z występowaniem ostrych zespołów wieńcowych. Osoby obciążone nadciśnieniem, będące homozygotami GG lub +/+, miały wyższe ryzyko wystąpienia ostrych zespołów wieńcowych niż osoby o innych genotypach [27].

Zmienność genów peptydów natriuretycznych

Istotną rolę w przebiegu niewydolności serca odgrywają czynniki natriuretyczne. W odpowiedzi na wzrost ciśnienia w prawym przedsionku uwalniany jest prekursor przedsionkowego peptydu natriuretycznego (pre-ANP). Pod wpływem błonowej proteazy serynowej (koriny) jest przekształcany w formę aktywną (ANP), która działa poprzez receptor NPR-A. Efekty pobudzenia NPR-A to natriureza, diureza, rozszerzenie naczyń krwionośnych, antagonizacja układów RAA i współczulnego. Badano polimorfizm Scal genu ANP: tranzycja T2238→C prowadzi do utraty miejsca restrykcyjnego enzymu Scal. Wśród pacjentów z chorobą wieńcową genotyp TT był związany z częstszym występowaniem zawału serca i większą liczbą zmienionych miażdżycowo naczyń [28]. Badano również mutację w kodonie 341 NPR-A, powodującą podstawienie izoleucyny w miejsce metioniny w łańcuchu aminokwasowym (Met341Ile). Mutacja istotnie częściej występowała w grupie pacjentów z zawałem niż w grupie kontrolnej [29].

Czynnik natriuretyczny typu B (BNP) jest produkowany przez kardiomiocyty komór w postaci prekursora pre-BNP, z którego po odcięciu fragmentu N-końca powstaje forma aktywna. Poziom BNP jest istotnym parametrem diagnostycznym i rokowniczym w niewydolności serca. Nie stwierdzono związku między polimorfizmem C1563T genu BNP a rozwojem idiopatycznej kardiomiopatii rozstrzeniowej [30]. W obrębie genu receptora BNP (NPR-B) opisana jest zmienność w intronach 18 (insercja/delekcja 9 par zasad) i 11 (C2077T).

Kolejny z czynników natriuretycznych – typ C (CNP) jest uwalniany jako pre-CNP przez komórki śródbłonka i cięty przez furynę. Polimorfizm w obrębie regionu 3' nieulegającego translacji (G2628A) ma wpływ na występowanie nadciśnienia [31].

Nie ma badań klinicznych dotyczących wpływu polimorfizmu genów prekursorów peptydów natriuretycznych, receptorów czy peptydaz odpowiedzialnych za posttranslacyjną aktywację na rozwój kardiomiopatii niedokrwiennej.

Polimorfizmy genów związanych z odpowiedzią zapalną

U chorych z niewydolnym sercem rośnie stężenie cytokin prozapalnych (TNF- α , IL1 β , IL-6) w surowicy i ich ekspresja w sercu. Kluczową rolę w kaskadzie zapalnej odgrywa TNF- α , cytokina bezpośrednio uszkadzająca kardiomiocyty, nasilająca proces apoptozy oraz włóknienia. W obrębie promotora TNF- α występuje polimorfizm A1/A2 w pozycji 308. Allel A2 istotnie częściej

występował w grupie pacjentów z idiopatyczną kardiomiopatią rozstrzeniową niż w grupie kontrolnej [32]. Nie potwierdziły tego wyniki innego badania przeprowadzonego na populacji osób z zastoinową niewydolnością serca [33].

IL-6 to cytokina prozapalna, która pobudza wytwarzanie białek ostrej fazy, zwiększa przepuszczalność naczyń, stymuluje ekspresję cząstek adhezyjnych i jest często łączona z patologiami układu krążenia. Chorzy z HF i podwyższonym stężeniem IL-6 są obciążeni większym ryzykiem zgonu. Wykazano związek polimorfizmu -174G/C promotora IL-6 z ciśnieniem skurczowym i ryzykiem wystąpienia choroby niedokrwiennej serca [34].

Do stymulacji odpowiedzi zapalnej, remodelingu lewej komory i rozwoju niewydolności po zawale przyczynia się ekspresja czynnika chemotaktycznego dla monocytów (MCP-1). W zakresie genu MCP-1 występuje polimorfizm -2518G/A. Allel G był badany jako potencjalny czynnik ryzyka choroby niedokrwiennej serca. Zmiennością charakteryzuje się również receptor dla MCP-1 (CCR2). Pośrednicząc w chemotaksji leukocytów odgrywa istotną rolę w patogenezie choroby wieńcowej. Mutacja w kodonie 64 jego genu (V64I) predysponuje do zawału i rozwoju HF [35].

Kolejnym elementem w patogenezie niewydolności serca są procesy włóknienia, w których istotną rolę odgrywa TGF- β 1. Badano związek między obecnością wariantów Leu lub Pro w pozycji 10 łańcucha aminokwasowego TGF- β 1. Polimorfizm kodonu 10 ma wpływ na ekspresję cytokiny i jest związany z występowaniem końcowego stadium niewydolności serca u pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową [36].

Na łącznotkankowy szkielet lewej komory istotny wpływ ma równowaga między enzymami degradującymi białka macierzy (metaloproteinazy MMP-2, MMP-3 i MMP-9) a ich tkankowymi inhibitorami (TIMPs). Obserwowano wyraźnie wyższe stężenie MMP-2 w osoczu i wyższy wskaźnik MMP2/TIMP-2 u pacjentów z HF niż w grupie kontrolnej, co dobrze korelowało z poziomem BNP [37]. Myszy pozbawione genu MMP-2 wykazywały lepsze przeżycie i mniej nasilone zjawisko przebudowy (*remodelingu*) po eksperymentalnym zawale serca [38]. W grupie chorych z HF badano polimorfizmy promotora genu MMP-2 -790T/G i -735C/T. Allel T w pozycji 790 oraz allel 735 C istotnie częściej występowały w populacji chorych niż w populacji kontrolnej, co świadczy o możliwym udziale tych alleli w rozwoju HF [39]. W innej pracy badano polimorfizm promotora MMP-3 (-1171 5A>6A) i promotora MMP-9 (-1562C/T). Allele -1562T oraz -1171 5A warunkują wyższą aktywność promotorów i wyższy poziom metaloproteinazy w surowicy. Allel -1562T był niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu u pacjentów z niewydolnością serca. Natomiast homozygoty 5A/5A

w obrębie genu MMP-3 były bardziej zagrożone zgonem tylko wówczas, gdy niewydolność serca miała inną etiologię niż niedokrwienna [40].

Polimorfizmy innych genów, potencjalnie związane z rozwojem niewydolności serca

Istnieje szereg doniesień dotyczących związku między niewydolnością serca a polimorfizmem genu deaminazy-1 AMP (AMPD1). W wyniku nonsensownej mutacji C34T (Glu12Stop) produkt ekspresji genu jest pozbawiony aktywności enzymatycznej. W tych warunkach w mięśniu sercowym rośnie przemiana AMP w adenozyne, która uznawana jest za czynnik kardioprotekcyjny. Wykazano, że nosicielstwo mutacji genu trzykrotnie zmniejszało ryzyko zgonu u pacjentów z angiograficznie udokumentowaną CAD (n=367) w 3,5-letniej obserwacji [41]. W przypadku niewydolności serca o różnej etiologii, pacjenci niebędący nosicielami mutacji charakteryzowali się gorszym rokowaniem (OR=9,34) [42].

Wśród substancji łączonych z patogenezą niewydolności serca wymienia się również endotelinę-1. Ulega gwałtownej sekrecji w odpowiedzi na rozciąganie komórek mięśniowych. Wydzielana jest w postaci prekursora, przekształcanego do formy aktywnej najprawdopodobniej przez furynę. Endotelina-1 zwęża naczynia, zwiększając kurczliwość serca, działa mitogenicznie na fibroblasty oraz powoduje przerost kardiomiocytów. Działa poprzez receptory typu A i B związane z białkiem Gq i szlakiem PLC. Ich aktywacja prowadzi do uruchomienia płodowego programu genowego w kardiomiocytach. W obrębie eksonu 8 genu receptora typu A (ETA) występuje polimorfizm C/T. Homozygoty TT miały dwukrotnie wyższe ryzyko rozwoju idiopatycznej kardiomiopatii rozstrzeniowej (IDC) w porównaniu z osobami o innym genotypie [43]. Natomiast polimorfizm C/T w eksonie 6 wpływał istotnie na rokowanie IDC. Ryzyko powikłań nosicieli allelu T było ponad pięciokrotnie wyższe w stosunku do pozostałych badanych [44].

W regulacji całego układu krążenia znamioną rolę odgrywa tlenek azotu (NO), rozszerzający naczynia krwionośne, zmniejszający ekspresję cząstek adhezyjnych na komórkach śródbłonna, hamujący adhezję i agregację płytek. Jest on produkowany przez szereg syntaz, z których w warunkach podstawowych w sercu główną rolę odgrywa śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (eNOS). Gen eNOS cechuje się polimorfizmem w kodonie 298 (Glu298Asp), opisywane jest również powtórzenie tandemowe w eksonie 4 (eNOS 4a/4b). Obserwowano, że allel Glu zmniejszał ryzyko zgonu lub potrzeby transplantacji serca u pacjentów z ciężką kardiomiopatią rozstrzeniową. Tendencja ta nie dotyczyła niewydolności serca w przebiegu choroby niedokrwiennej [45].

Kolejnym ogniwem przyczyniającym się do rozwoju niewydolności serca jest dysfunkcja białek kurczliwych i białek cytoszkieletu miocytu. Opisano szereg mutacji genów aktyny, miozyny, tityny, troponiny, desminy i dystrofiny. Większość publikacji dotyczy rodzinnych form kardiomiopatii wywołanych mutacjami o wysokim stopniu penetracji. Mutacje o niskim stopniu penetracji mogą się ujawniać w warunkach zwiększonego obciążenia. Mają na to wpływ czynniki środowiskowe i interakcje z innymi genami. Można podejrzewać, iż choroba niedokrwienna serca, a zwłaszcza zawał, jest czynnikiem predysponującym do rozwoju kardiomiopatii u osobników obciążonych mutacjami o niskim stopniu penetracji. Odpowiedź twierdzącą podsuwa interesujące badanie doświadczalne, w którym u myszy pozbawionych genu czynnika transkrypcyjnego STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) dochodziło do kardiomiopatii rozstrzeniowej w podeszłym wieku, ale podobny fenotyp obserwowano u tych zwierząt po zawale mięśnia sercowego [46]. Jednak w populacji ludzkiej takie badania dopiero rozpoczęto.

Farmakogenetyka niewydolności serca

Farmakogenetyka jest nauką zajmującą się wpływem czynników genetycznych na reakcję organizmu na lek. Dziedzina ta znajduje się w początkowym okresie rozwoju, jednak już teraz stwarza obiecujące perspektywy. Być może pozwoli ona na lepszy indywidualny dobór terapii dla poszczególnych pacjentów.

Polimorfizmy genów odgrywają istotną rolę w farmakoterapii układu RAA. Badano wpływ leczenia ACE-I na poziom aldosteronu w surowicy. Okazało się, że w grupie pacjentów, którzy mimo stosowania ACE-I wykazują podwyższony poziom aldosteronu, częstość występowania genotypu DD genu ACE była istotnie wyższa niż wśród osób, których poziom aldosteronu mieścił się w granicach normy [47]. Natomiast w badaniu CATS analizowano rozwój rozstrzeni lewej komory po zawale ściany przedniej mięśnia sercowego. Do wystąpienia patologii predysponował genotyp DD, choć jednocześnie ci sami pacjenci odnosili największe korzyści z terapii kaptoprilem [23].

Istnieje potencjalna farmakogenetyczna interakcja między polimorfizmem I/D genu ACE a stosowaniem β -blokerów. W jednym z badań genotyp DD wiązał się z wyższym ryzykiem zgonu czy transplantacji serca w rocznej obserwacji pacjentów z HF, ale tylko w grupie nieotrzymującej β -blokerów [22].

Ostatnie prace wskazują na wysoką skuteczność kombinacji izosorbidu i hydralazyny u pacjentów rasy czarnej [48], przy opisanej wcześniej słabszej odpowiedzi tej grupy etnicznej na inhibitory konwertazy [49]. Potwierdza to odmienną odpowiedź pacjentów na zastosowane leczenie, prawdopodobnie z uwagi na różni-

ce w garniturze genowym i uwydatnia konieczność prowadzenia badań oceniających skuteczność różnych form leczenia w zależności od genotypu pacjenta.

Można podejrzewać, że genetyczne podłoże może mieć również występowanie działań niepożądanych leków. Przy badaniach polimorfizmu (-58T/C) promotora genu receptora B2 bradykininy wykazano, iż allel T jest związany z występowaniem kaszlu po ACE-I [50].

Podsumowanie

Szacuje się, że na układ krążenia mają wpływ tysiące genów. Schorzenia serca rozwijają się pod wpływem

uwarunkowań środowiskowych i genetycznych podlegających złożonym wzajemnym interakcjom. Ponadto dziedziczenie chorób serca ma w większości przypadków charakter wielogenowy, więc pojedyncze allele genów jedynie predysponują do ujawnienia się choroby, czemu sprzyjają niekorzystne czynniki związane ze stanem ustroju. Jednym z nich jest choroba niedokrwienna serca. W jej przebiegu dochodzi do degeneracji części kardiomiocytów i patologicznego przeciążenia pozostałych.

Badania genetyczne pozwalają na dokładniejsze poznanie patofizjologii chorób. W przypadku pacjentów z zawałem mogą pomóc wyodrębnić grupę osób obciąż-

Tabela I. Polimorfizmy genów potencjalnie związane z niewydolnością serca (HF) w przebiegu choroby wieńcowej (CAD)

gen	polimorfizm	efekt fizjologiczny	związek z niewydolnością serca w chorobie wieńcowej	piśmiennictwo
ACE	insercja/ delecja (I/D)	Genotyp DD - wyższe stężenie ACE w surowicy i jego aktywność w sercu	genotyp DD - o 68% częstsze występowanie wśród pacjentów z kardiomiopatią niedokrwienną niż w grupie kontrolnej allel D – predysponuje do upośledzenia funkcji lewej komory po zawale	18, 20, 21
angiotensynogen	M235T G(-6)A T174M	genotypy -6AA, 174TT, 235TT – wyższe stężenie angiotensynogenu w osoczu	genotypy (-6GG) i 235MT predysponują kobiety do HF	16, 17
receptor β 1	Arg389Gly	allel Arg389 – nasilony proces regulacji w dół receptora	allel Arg389 – związek z występowaniem HF i z lepszym efektem stosowania β -blokerów	8, 9
	Ser49Gly	allel Gly49 – wyższe powinowactwo do agonistów i antagonistów, nasilony proces regulacji w dół	allel Gly49 – korzystny wpływ na przeżycie i częstość hospitalizacji pacjentów z HF	6, 10
receptor β 2	Thr164Ile	allel Ile 164 – spadek powinowactwa do agonistów	allel Ile164 – niższe roczne przeżycie chorych z HF	13, 14, 15
	Arg16Gly	allel Gly16 – nasilenie regulacji w dół	allel 16Gly – przypuszczalnie wywiera niekorzystny wpływ na przebieg HF	9, 14, 15
	Gln27Glu	allel Glu27 – zmniejsza regulację w dół w warunkach wzmożonej stymulacji	allel Glu27 – przypuszczalnie ma korzystny wpływ na przebieg HF	9, 14
Receptor α 2C	Del322-325	osłabienie funkcji receptora, wzrost stymulacji adrenergicznej	wzrost ryzyka HF	11
Receptor CCR2 (dla MCP-1)	V64I	efekt fizjologiczny – nieznan	allel I – predysponuje do zawału i HF	35
AMPD-1	C34T	allel T – wzrost przemiany AMP w adenozyne – czynnik kardioprotekcyjny	allel T – lepsze rokowanie u chorych z CAD i HF	41, 42
MMP-2	-790T/G -735C/T	efekt fizjologiczny – nie jest opisywany	allele -790T i -735C częściej występowały u chorych z HF w porównaniu z grupą kontrolną	39
MMP-3	-1171 5A>6A	allel 5A – wyższa aktywność promotora, wyższy poziom MMP-3 w surowicy	genotyp 5A/5A – istotnie statystycznie gorsze rokowanie u chorych z HF o etiologii innej niż niedokrwienna	40
MMP-9	-1562C>T	allel aktywność – wyższa aktywność promotora, wyższy poziom MMP-9 w surowicy	allel T – niezależny czynnik ryzyka zgonu chorych z HF	40

żonych największym ryzykiem rozwoju niewydolności serca. Takich pacjentów można poddać odpowiednio zmodyfikowanej i zintensyfikowanej terapii. Interesujące możliwości daje farmakogenetyka. Istnieją pierwsze doniesienia o genetycznie uwarunkowanej odpowiedzi na leki. Różnicowanie osobnicze dotyczy zarówno efektu terapeutycznego, jak i działań niepożądanych.

Poznanie genetycznych uwarunkowań niewydolności serca ma wymiar naukowy i praktyczny, stwarza nowe możliwości rozwoju i jest wielkim wyzwaniem medycyny XXI w.

Spis skrótów użytych w tekście

HF – niewydolność serca
 CAD – choroba wieńcowa
 IHD – choroba niedokrwienna serca
 IDC – idiopatyczna kardiomiopatia rozstrzeniowa
 SNS – współczulny układ nerwowy
 RAA – układ renina-angiotensyna-aldosteron
 ADH – hormon antydiuretyczny
 CHF – niewydolność krążenia
 PLC – fosfolipaza C
 β ARK1 – kinaza-1 receptora β -adrenergicznego
 SERCA – ATP-aza wapniowa retikulum endoplazmatycznego
 pVO₂ – szczytowe wykorzystanie tlenu
 SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu
 ACE – enzym konwertujący angiotensynę
 Pre-ANP – prekursor przedsionkowego czynnika natriuretycznego
 ANP – przedsionkowy czynnik natriuretyczny
 BNP – czynnik natriuretyczny typu B
 MCP-1 – czynnik chemotaktyczny monocytów 1
 MMP – metaloproteinaza macierzy
 TIMP – tkankowy inhibitor metaloproteinazy
 AMID-1 – deaminaza-1 AMP
 eNOS – śródbłonkowa synteza tlenu azotu

Piśmiennictwo

- Remme WJ, Swedberg K. Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J* 2001; 22: 1527-60.
- Rywik SL, Wagrowska H, Broda G, et al. Heart failure in patients seeking medical help at outpatients clinics. Part I. General characteristics. *Eur J Heart Fail* 2000; 2: 413-21.
- Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, et al. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 6A-13A.
- Scott DS, Sutton MJ, Lamas GA, et al. Ventricular remodeling does not accompany the development of heart failure in diabetic patients after myocardial infarction. *Circulation* 2002; 106: 1251-5.
- Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, et al. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 6A-13A.
- Levin MC, Marullo S, Muntaner O, et al. The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem* 2002; 277: 30429-35.
- Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, et al. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* 2003; 24: 883-96.
- Mialet Perez J, Rathz DA, Petrashevskaya NN, et al. Beta1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med* 2003; 9: 1300-5.
- Covolo L, Gelatti U, Metra M, et al. Role of beta1- and beta2-adrenoceptor polymorphisms in heart failure: a case-control study. *Eur Heart J* 2004; 25: 1534-41.
- Borjesson M, Magnusson Y, Hjalmarson A, et al. A novel polymorphism in the gene coding for the beta (1) -adrenergic receptor associated with survival in patients with heart failure. *Eur Heart J* 2000; 21: 1853-8.
- Small KM, Wagoner LE, Levin AM, et al. Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 1135-42.
- Harding SE, Gong H. Beta-adrenoceptor blockers as agonists: coupling of beta2-adrenoceptors to multiple G-proteins in the failing human heart. *Congest Heart Fail* 2004; 10: 181-5.
- Brodde OE, Buscher R, Tellkamp R, et al. Blunted cardiac responses to receptor activation in subjects with Thr164Ile beta2-adrenoceptors. *Circulation* 2001; 103: 1048-50.
- Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, et al. The Ile164 beta2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest* 1998; 102: 1534-9.
- Wagoner LE, Craft LL, Singh B, et al. Polymorphisms of the beta (2) -adrenergic receptor determine exercise capacity in patients with heart failure. *Circ Res* 2000; 86: 834-40.
- Sethi AA, Nordestgaard BG, Gronholdt ML, et al. Angiotensinogen single nucleotide polymorphisms, elevated blood pressure, and risk of cardiovascular disease. *Hypertension* 2003; 41: 1202-11.
- Goldbergova M, Spinarova L, Spinar J, et al. Association of two angiotensinogen gene polymorphisms, M235T and G (-6) A, with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2003; 89: 267-72.
- Tokunaga S, Tsuji H, Nishiue T, et al. Lower mortality in patients with the DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene after acute myocardial infarction. *Acta Cardiol* 2001; 56: 351-5.
- Ohmichi N, Iwai N, Nakamura Y, et al. The genotype of the angiotensin-converting enzyme gene and global left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1995; 76: 326-9.
- Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, et al. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1993; 342: 1073-5.
- Ohmichi N, Iwai N, Maeda K, et al. Genetic basis of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1996; 53: 265-72.
- McNamara DM, Holubkov R, Janosko K, et al. Pharmacogenetic interactions between beta-blocker therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *Circulation* 2001; 103: 1644-8.
- Pinto YM, van Gilst WH, Kingma JH, et al. Deletion-type allele of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with progressive ventricular dilation after anterior myocardial infarction. Captopril and Thrombolysis Study Investigators. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1622-6.
- Gruchala M, Cieciewicz D, Ochman K, et al. Left ventricular size, mass and function in relation to angiotensin-converting enzyme gene and angiotensin-II type 1 receptor gene

- polymorphisms in patients with coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 522-8.
25. Urata H, Ganten D. Cardiac angiotensin II formation: the angiotensin-I converting enzyme and human chymase. *Eur Heart J* 1993; 14 (Suppl. I): 177-82.
 26. Gumprecht J, Zychma M, Grzeszczak W, et al. Angiotensin I-converting enzyme and chymase gene polymorphisms – relationship to left ventricular mass in type 2 diabetes patients. *Med Sci Monit* 2002; 8: CR603-6.
 27. Dhamrait SS, Payne JR, Li P, et al. Variation in bradykinin receptor genes increases the cardiovascular risk associated with hypertension. *Eur Heart J* 2003; 24: 1672-80.
 28. Gruchala M, Cieciewicz D, Wasag B, et al. Association of the Scal atrial natriuretic peptide gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Am Heart J* 2003; 145: 125-31.
 29. Nakayama T, Soma M, Saito S, et al. Missense mutation of exon 3 in the type A human natriuretic peptide receptor gene is associated with myocardial infarction. *Med Sci Monit* 2003; 9: CR505-10.
 30. Tiret L, Mallet C, Poirier O, et al. Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy: the CARDIGENE study. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 29-35.
 31. Ono K, Mannami T, Baba S, et al. A single-nucleotide polymorphism in C-type natriuretic peptide gene may be associated with hypertension. *Hypertens Res* 2002; 25: 727-30.
 32. Ito M, Takahashi H, Fuse K, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Jpn Heart J* 2000; 41: 183-91.
 33. Kubota T, McNamara DM, Wang JJ, et al. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with congestive heart failure. VEST Investigators for TNF Genotype Analysis. Vesnarinone Survival Trial. *Circulation* 1998; 97: 2499-501.
 34. Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, et al. The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 2001; 22: 2243-52.
 35. Ortlepp JR, Vesper K, Mevissen V, et al. Chemokine receptor (CCR2) genotype is associated with myocardial infarction and heart failure in patients under 65 years of age. *J Mol Med* 2003; 81: 363-7.
 36. Holweg CT, Baan CC, Niesters HG, et al. TGF-beta1 gene polymorphisms in patients with end-stage heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 979-84.
 37. Yamazaki T, Lee JD, Shimizu H, et al. Circulating matrix metalloproteinase-2 is elevated in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 41-5.
 38. Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, et al. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H1229-35.
 39. Vasku A, Goldbergova M, Holla LI, et al. Two MMP-2 promoter polymorphisms (-790T/G and -735C/T) in chronic heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 1299-303.
 40. Mizon-Gerard F, de Groote P, Lamblin N, et al. Prognostic impact of matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with heart failure according to the aetiology of left ventricular systolic dysfunction. *Eur Heart J* 2004; 25: 688-93.
 41. Anderson JL, Habashi J, Carlquist JF, et al. A common variant of the AMPD1 gene predicts improved cardiovascular survival in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1248-52.
 42. Gastmann A, Sigusch HH, Henke A, et al. Role of adenosine monophosphate deaminase-1 gene polymorphism in patients with congestive heart failure (influence on tumor necrosis factor-alpha level and outcome). *Am J Cardiol* 2004; 93: 1260-4.
 43. Charron P, Tesson F, Poirier O, et al. Identification of a genetic risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy. Involvement of a polymorphism in the endothelin receptor type A gene. CARDIGENE group. *Eur Heart J* 1999; 20: 1587-91.
 44. Herrmann S, Schmidt-Petersen K, Pfeifer J, et al. A polymorphism in the endothelin-A receptor gene predicts survival in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2001; 22: 1948-53.
 45. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, et al. Effect of the Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase on survival for patients with congestive heart failure. *Circulation* 2003; 107: 1598-602.
 46. Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ Res* 2004; 95: 187-95.
 47. Cicoira M, Zanolla L, Rossi A, et al. Failure of aldosterone suppression despite angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor administration in chronic heart failure is associated with ACE DD genotype. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1808-12.
 48. Taylor AL, Ziesche S, Yancy C, et al. Combination of isosorbide dinitrate and hydralazine in blacks with heart failure. *N Engl J Med* 2004; 351: 2049-57.
 49. Bloche MG. Race-based therapeutics. *N Engl J Med* 2004; 351: 2035-7.
 50. Mukae S, Aoki S, Itoh S, et al. Bradykinin B (2) receptor gene polymorphism is associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-related cough. *Hypertension* 2000; 36: 127-31.

Nowe oblicze modyfikowanej reperfuzji: *postconditioning*

New face of modified reperfusion: *postconditioning*

Grzegorz Smolka¹, Krzysztof S. Gołba¹, Marcin Malinowski², Marek Deja²,
Jolanta Biernat¹, Beata Reszka¹, Anna-Maria Dalecka¹, Stanisław Woś²

¹III Klinika Kardiologii, Śląska Akademia Medyczna, Katowice

²II Klinika Kardiochirurgii, Śląska Akademia Medyczna, Katowice

Streszczenie

W pracy omówiono mechanizmy uszkodzenia reperfuzyjnego mięśnia sercowego oraz sposoby jego zmniejszania. Zdefiniowano pojęcie kontrolowanej reperfuzji (*postconditioning*) i przedstawiono badania eksperymentalne i kliniczne z jej zastosowaniem. Zestawiono proponowane sposoby oddziaływania kontrolowanej reperfuzji na rozmiar uszkodzenia reperfuzyjnego oraz porównano je z mechanizmami hartowania przez niedokrwienie.

Abstract

In this review authors describe the mechanisms and possibilities of attenuation of ischaemia reperfusion injury in the myocardium. They describe modified reperfusion (*postconditioning*) and discuss its use in basic and clinical research. The proposed effects of modified reperfusion on the reperfusion injury were also depicted and compared to the mechanisms and action of ischemic preconditioning.

Keywords: *postconditioning*, ischaemia reperfusion injury, reperfusion

Kardiol Pol 2005; 63; 4 (Supl. 2): 450-456

Choroba naczyń wieńcowych stała się współcześnie głównym problemem zdrowotnym świata zachodniego. Wprowadzenie w ostatnich latach technik szybkiego udrażniania tętnicy dozwawłowej zmniejszyło śmiertelność w przebiegu ostrego zespołu wieńcowego (ACS – *acute coronary syndrome*). Jednak otwarcie tętnicy dozwawłowej, szybkie przywrócenie w niej przepływu i doprowadzenie do reperfuzji wcześniej ostro niedokrwionego obszaru mięśnia sercowego okazało się bronią obosieczną. Gwałtowny napływ krwi do obszaru zawału niesie bowiem z sobą koszt uszkodzenia reperfuzyjnego. W efekcie w przebiegu zawału i w czasie jego interwencyjnego leczenia dochodzi do polietiologicznego uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego (IRI – *ischemia-reperfusion injury*).

Mechanizmy uszkodzenia reperfuzyjnego

Zarówno mechaniczne (angioplastyka wieńcowa), jak i farmakologiczne udrożnienie tętnicy przebiega

z mniej lub bardziej wyrażoną mikroembolizacją dystalnie położonych drobnych naczyń [1]. W przypadku pierwotnej angioplastyki wieńcowej zatopy te składają się z fragmentów pękniętej blaszki miażdżycowej i tworzącej się na jej powierzchni skrzepliny [2]. Dodatkowo w obszarze niedokrwienia dochodzi do aktywacji i agregacji płytek krwi [3]. Uczestniczą one w procesie zapalnym toczącym się w ścianie naczynia, uwalniając liczne czynniki chemotaktyczne [4], nasilając infiltrację leukocytów, a przepływ krwi dodatkowo upośledzają płytkowe substancje wazospastyczne. Ważność roli płytek w okresie reperfuzji dokumentuje codzienna praktyka stosowania abciximabu. Farmakologiczne zablokowanie receptorów GPIIb/IIIa w okresie reperfuzji zmniejsza mikroembolizację, poprawia perfuzję mięśnia sercowego i zmniejsza pozawałowe uszkodzenie lewej komory serca [5]. Mechaniczne usunięcie fragmentów pękniętej blaszki miażdżycowej i skrzepliny z tętnicy dozwawłowo-

Adres do korespondencji:

dr hab n. med Krzysztof S. Gołba, II Klinika Kardiologii, Śląska Akademia Medyczna, ul. Ziołowa 45/47, 40-635 Katowice,
e-mail: kgołba@slam.katowice.pl

wej w trakcie angioplastyki nie daje jak dotąd spodziewanych efektów, co być może zależy od doboru pacjentów i sposobu mechanicznej protekcji [6, 7].

Uważa się, że krytyczne są pierwsze minuty przywrócenia napływu krwi do wcześniej niedokrwionego obszaru. Z czynnościowego punktu widzenia charakterystyczny dla okresu reperfuzji jest silniejszy od niedokrwionego przykurcz reperfuzyjny (*reperfusion-induced hypercontracture*). Opiswane są dwa niezależne mechanizmy przykurczu: jeden związany z przeladowaniem kardiomiocytów jonami wapnia i drugi, określany jako stężeniowy (*rigor-type*). Ten ostatni pojawia się po dłuższym okresie niedokrwienia (co jest częste w warunkach klinicznych) w wyniku skrajnie niskiego stężenia ATP w kardiomiocytach [8]. W ekstremalnych warunkach prowadzi to do, znanego szczególnie kardiologom, obrazu kamiennego serca (*stone heart*) [9]. Okres reperfuzji ma również charakterystyczne tło biochemiczne. Podczas niedokrwienia wzrasta ilość wolnych rodników tlenowych (ROS – *reactive oxygen species*). Jednak prawdziwy wyrzut tych cząsteczek, produkowanych przez neutrocyty, kardiomiocyty, komórki śródbłonka czy tkanki okołonaczyniowe, następuje już w pierwszych sekundach reperfuzji [10]. Pojęcie *wolne rodniki* obejmuje nie tylko ROS, ale także *reactive nitrogen species* (RNS) – wysoce aktywne pochodne tlenku azotu (NO – *nitric oxide*) ONOO⁻ czy N₂O₃. We wczesnej fazie reperfuzji wzrasta zarówno aktywność syntazy NO, jak i niespecyficzna, niezależna od syntazy jego produkcja, dostarczając substratu do powstawania RNS. Rola NO w propagacji uszkodzenia reperfuzyjnego jest złożona, m. in. w zależności od aktualnego stężenia toksyczna lub ochronna. Jakkolwiek NO może uszkadzać komórki bezpośrednio lub po reakcji z O² (jako ONOO⁻), wiele wskazuje na jego ochronne działanie w przebiegu IRI, najpewniej poprzez wzrost komórkowego stężenia cGMP i częściowe hamowanie łańcucha oddechowego [11].

W niedokrwionym obszarze nadmiar metabolitów przemian beztlenowych prowadzi do wzrostu przezbłonowego gradientu osmotycznego. Przy jednoczesnym zastojem w mikrokrążeniu i wzroście przepuszczalności sarkolemy (m.in. w wyniku działania ROS) dochodzi do obrzęku kardiomiocytów. Zwiększone przenikanie jonów przez sarkolemmę w okresie IRI oraz zaburzona regulacja gradientu stężeń prowadzą do wzrostu stężenia Ca²⁺ w kardiomiocytach. Towarzystwając niedokrwieniu kwasica wewnątrzkomórkowa aktywuje sarkolemalny wymiennik Na⁺/H⁺, usuwający protony z wnętrza komórki w zamian za jony sodu. Wychwyt jonów wapnia do wnętrza komórek mięśnia sercowego jest wtórny do obecnego w nich nadmiaru jonów sodu i odbywa się przez pracujący w *odwróconym* trybie wymiennik Na⁺/Ca²⁺. Wapń gromadzony jest w nadmiarze w retiku-

lum endoplazmatycznym, po czym uwalniany do cytozolu. Jeśli niedokrwienie nie upośledziło skrajnie zdolności mitochondriów do syntezy ATP, to przywrócenie przepływu krwi prowadzi do wzrostu jego stężenia i niekontrolowanej aktywacji miofibrilli [12].

Będąc jednym z pierwszych etapów procesu gojenia gromadzenie się neutrocytów w obszarze zawału może prawdopodobnie nasilać IRI. Gdy nie dojdzie do reperfuzji, to powolna (ze szczytem w 2.–4. dobie) infiltracja neutrocytów ogranicza się do granicznych części obszaru uszkodzonego niedokrwieniem. Przywrócenie przepływu krwi prowadzi do przyspieszenia i wzrostu akumulacji tych krwinek. Udział neutrocytów w propagacji uszkodzenia reperfuzyjnego może być związany z uwalnianiem przez nie wolnych rodników, proteaz (elastaza, kolagenaza), czynników prozapalnych, interakcjami z endotelium, embolizacją mikrokrążenia. Nie można wykluczyć ich roli w indukcji apoptozy [13]. Zahamowanie adhezji neutrocytów przeciwciałami przeciwko P-selektynie w różnym stopniu zmniejszyło uszkodzenie miokardium w eksperymencie zwierzęcym, efektu tego nie potwierdzono jednak klinicznie. Podobnie użycie przeciwciał przeciwko antygenowi CD18 (fragment molekuly adhezyjnej) pomimo zachęcających wyników eksperymentalnych nie zmniejszyło uszkodzenia mięśnia sercowego u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego [14]. Kliniczna ocena reperfuzji niedokrwionego obszaru osoczem ubogoleukocytarnym, czy to podczas pierwotnej angioplastyki wieńcowej [15], czy CABG [16] jak dotąd nie uzasadnia rutynowego stosowania takiej procedury.

Reperfuzja niedokrwionego miokardium prowadzi również do otwarcia niespecyficznych kanałów białkowych w błonie mitochondrialnej – tak zwanych megakanałów (mPTP – *mitochondrial permeability transition pores*) [17]. Czynnikiem wyzwalającym otwarcie mPTP jest przeladowanie wapniem, szczególnie w obecności stresu oksydacyjnego, niedoboru energetycznego i depolaryzacji błony mitochondrialnej. Przez otwarte megakanały swobodnie przechodzą cząsteczki o rozmiarach do 1,5 kDa, co poprzez wzrost ciśnienia osmotycznego prowadzi do obrzęku mitochondriów i przerwania ciągłości błony zewnętrznej. Uwalnianie do cytozolu cytochromu c i innych białek proapoptotycznych aktywuje kaspazy, z typowymi dla apoptozy konsekwencjami w przebudowie komórki [18]. Błona wewnętrzna przestaje być barierą dla protonów, które przechodząc do wnętrza mitochondrium, rozprzegają fosforylację oksydacyjną. Efektem tego jest hydroliza ATP, aktywacja fosfolipaz, nukleaz i proteaz i ostatecznie nekroza. Zamknięcie megakanałów może powstrzymać ten proces, jednakże uruchomiona już apoptoza z czasem doprowadzi do unicestwienia komórki.

Niedokrwienie modyfikuje również mitochondrialne ATP-zależne kanały potasowe (K_{ATP}), co prawdopodobnie poprzez zmianę depolaryzacji błony mitochondrialnej zmniejsza napływ wapnia do wnętrza tych organelli i nasila syntezę ATP. Zarówno mitochondrialne, jak i sarkolemmalne K_{ATP} są ważnym ogniwem hartowania przez niedokrwienie. Jego efekt można uzyskać również farmakologicznie, zmniejszając uszkodzenie niedokrwionego miokardium lekami otwierającymi K_{ATP} (diazoksyd lub nikorandil), co wykorzystuje się w badaniach klinicznych [19]. Otwartym pozostaje pytanie o skuteczność takiego postępowania w momencie rozpoczęcia reperфузии.

Rozmiar uszkodzenia reperфуzyjnego zależy jest również od aktywności licznych kinaz białkowych. Wiadomo, że szczególną rolę odgrywają kaskada 3-kinazy fosfatydoinozytolu – kinaza Akt (*PI-3K – kinase Akt*) oraz kinaza regulowana czynnikami zewnątrzkomórkowymi (*ERK 1/2 – extra-cellular signal regulated kinase*) zaliczane do grupy kinaz antyapoptotycznych RISK – *reperfusion injury salvage kinases* [20]. Efektorami układu RISK są proapoptotyczne proteiny, których inaktywacja hamuje nadmierne otwieranie mitochondrialnych megakanałów. Działanie to może być wzmacnianie przez NO produkowany w wyniku stymulacji śródłonkowej syntazy NO przez Akt.

Kolejnym układem obronnym, chroniącym serce przed skutkami IRI jest adenozyne i jej metabolity. Stężenie endogennej adenozyne wzrasta gwałtownie podczas niedokrwienia [21], a jej źródłem są głównie kardiomiocyty. Aktywacja adenozynergiczna zmniejsza zaburzenia kurczliwości, ale także rozległość nekrozy i apoptozy, wpływając na większość z opisanych powyżej zjawisk towarzyszących IRI.

Ograniczanie uszkodzenia niedokrwienno-reperфуzyjnego

Poszukiwanie możliwych do zastosowania w praktyce klinicznej sposobów zmniejszania IRI stało się w dobie gwałtownego rozwoju kardiologii interwencyjnej w ACS szczególnie ważne. Badania podstawowe i praktyka kliniczna wskazują na trzy kierunki poszukiwań.

Hartowanie przez niedokrwienie

Pierwszy z nich, z prawie dwudziestoletnią historią, to próby wykorzystywania mechanizmów *ischemic preconditioning*, czyli hartowania przez niedokrwienie (HPN). W 1986 r., opisując zjawisko HPN w eksperymencie zwierzęcym, Murry i wsp. już wtedy powiązali je z naturalnym mechanizmem ochronnym, jakim jest wydaje się być *preinfarction angina*, czyli dusznica przedzawałowa [22]. Niestety HPN w klasycznej posta-

ci wymaga przygotowania serca, zanim jeszcze dojdzie do niedokrwienia. Tym samym zastosowanie go w praktyce klinicznej teoretycznie możliwe było tylko w kardiologii. Okazało się jednak, że HPN nie przewyższa siły działania ochronnego roztworów kardioplegicznych [23]. Co gorsza, nie udało się również wykazać skuteczności HPN w ochronie mięśnia sercowego w przebiegu zabiegów bez używania krążenia pozaustrojowego [24].

Hartowanie farmakologiczne

W miarę rozwoju wiedzy na temat mechanizmów HPN zaczęto próby stosowania interwencji farmakologicznych mających je naśladować. Ukuto nawet termin farmakologicznego hartowania (*pharmacological preconditioning* przez analogię do *ischemic preconditioning*) i mimetyków hartowania. Skuteczność nikorandilu (tzw. *otwieracza*) mitochondrialnych kanałów K_{ATP} w zmniejszaniu IRI udokumentowana została w badaniu klinicznym [19], podobnie jak kardioprotekcyjne działanie adenozyne podczas terapii reperфуzyjnej (pierwotnej angioplastyki wieńcowej lub fibrylizacji) [25]. Postuluje się również nadrzędną rolę aktywacji receptorów adenozynowych w uruchamianiu układu RISK podczas reperфузии [26].

Należy pamiętać, że farmakoterapia rozpoczynana w okresie niedokrwienia praktycznie zawsze obejmuje w dalszym swoim przebiegu okres reperфузии. Badania podstawowe wskazują na działanie ochronne w takim schemacie także bradykininy czy insuliny. W tym ostatnim przypadku jednak nadzieje wiązane z bardzo klasycznym leczeniem, jakim jest podawanie okołozawałowo insuliny i potasu, nie wytrzymały próby dużego randomizowanego badania CREATE-ECLA [27].

Kontrolowana reperфузия

Poszukiwanie możliwości modyfikowania okresu reperфузии stało się potrzebą chwili, gdy okazało się, że mimo sukcesów technicznych rewaskularyzacji w przebiegu ACS śmiertelność z powodu ostrego zawału utrzymuje się na wysokim poziomie. Wiadomo także, że wielkość zawału oraz obszar i stopień przebudowy lewej komory są czynnikami determinującymi rokowanie pacjenta.

Wczesna wiedza o możliwości zmniejszania uszkodzenia uprzednio niedokrwionego obszaru poprzez modyfikowanie tempa i składu napływającej krwi pochodzi z przełomu lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych. Powstała w wyniku niepokoju kardiologów o losy serca po jego zatrzymaniu na czas trwania krążenia pozaustrojowego. Podstawą tej wiedzy jest cykl prac grupy Geralda D. Buckberga. W serii eksperymentów bada-

cze udowodnili, że można uniknąć bądź przynajmniej zminimalizować szkodę reperfuzyjną po okresie całkowitego niedokrwienia, stosując krótki, kilkuminutowy, wlew ciepłej krwi wzbogaconej potasem (krwistej kardioplegii) zamiast prostego odklepowania aorty we wczesnym okresie reoksygenacji [28]. Zasady kontrolowanej reperfuzji opracowane przez Buckberga obejmują: 1) reoksygenację za pomocą krwi celem przywrócenia metabolizmu tlenowego niezbędnego dla procesów reperacyjnych w komórce, 2) dostarczanie tlenu przez określony okres czasu, a nie wg określonej dawki celem maksymalizacji jego użyczenia, 3) utrzymanie zatrzymania serca we wczesnym okresie reperfuzji celem zmniejszenia zapotrzebowania energetycznego, co pozwala na przesunięcie ograniczonych w tym okresie ilości ATP na procesy naprawcze oraz do pomp jonowych (np. pompy sodowej), 4) uzupełnienie substratów (np. glutaminy) dla aerobowej produkcji energii, 5) podniesienie pH reperfuzatu dla przeciwdziałania kwasicy tkankowej, co optymalizuje czynność enzymów w okresie reperfuzji, 6) okresowe obniżenie ilości dostępnych jonów wapnia z zastosowaniem środków chelatujących, 7) podniesienie osmolalności reperfuzatu i obniżenie ciśnienia reperfuzji do poniżej 50 mmHg dla przeciwdziałania obrzękowi, 8) ogrzanie reperfuzatu do 37°C, co optymalizuje tempo przemian metabolicznych.

Kliniczna wartość kardiologicznej kontrolowanej reperfuzji została dobrze udokumentowana. Kirklin i wsp. wykazali w analizie wieloczynnikowej obejmującej 3872 przypadki CABG bez użycia kontrolowanej reperfuzji i 2351 z jej użyciem, że ta pierwsza zwiększa znacznie prawdopodobieństwo przeżycia, zwłaszcza w grupie pacjentów z długim okresem zaklepowania aorty [29].

Idąc śladami Buckberga, prowadzono przez ostatnie 20 lat poszukiwania różnych sposobów ochrony przed IRI. Najnowsza strategia badawcza nakazuje skoncentrowanie się na okresie reperfuzji. Asumptu ku temu dały pionierskie prace grupy Jakoba Vincent-Johansena. Pierwotna obserwacja polegała na porównaniu efektów klasycznego HPN z procedurą trzykrotnego powtórzenia 30-sekundowych cykli napływu i reokluzyj przedniej tętnicy zstępującej (po wcześniejszym okresie 60 min niedokrwienia) w modelu zwierzęcym. Okazało się, że stopień zmniejszenia martwicy w wyniku obu procedur był identyczny [30]. Badacze przez analogię do terminu *preconditioning* nadali procedurze nazwę *postconditioning*. Pojawił się także skrótowiec POSTCON. W zasadzie jednak mamy do czynienia z modyfikowaną czy kontrolowaną reperfuzją. Stąd zabawny tytuł komentarza redakcyjnego Gerda Heuscha w JACC traktującego o POSTCON (Tabela II).

Tabela I. Hipotetyczne mechanizmy ochronnego działania modyfikowanej reperfuzji (POSTCON)

mechanizm	źródło
ograniczenie reakcji zapalnej śródbłonna	Zhao ZQ, et al. <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> 285 , H579-88
ograniczenie produkcji ROS	Zhao ZQ, et al. <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> 285 , H579-88
otwieranie mitochondrialnych kanałów K_{ATP}	Yang XM, et al. <i>J Am Coll Cardiol</i> 44 , 1103-10.
aktywacja śródbłonkowej syntazy NO	Tsang A, et al. <i>Circ Res</i> 95 , 230-2.
aktywacja ERK 1/2	Yang XM, et al. <i>J Am Coll Cardiol</i> 44 , 1103-10.
aktywacja PI3-Akt	Hausenloy DJ, et al. <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> 288 , H971-6
aktywacja receptorów adenozynowych	Kin H et al. <i>Cardiovasc Res</i> 67 , 124-33.
hamowanie otwierania megakanałów – mPTP	Argaud L, et al. <i>Circulation</i> 111 , 194-7.

Tabela II. Warto przeczytać

Piper HM; Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. <i>Cardiovasc Res</i> 2004; 61: 365-71.
Heusch G. Postconditioning: old wine in a new bottle? <i>J Am Coll Cardiol</i> 2004; 44:1111-2.
Vinten-Johansen J; Zhao ZQ; Zatta AJ, et al. Postconditioning. A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. <i>Basic Res Cardiol</i> 2005; 100: 295-310.
Hausenloy DJ; Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. <i>Trends Cardiovasc Med</i> 2005; 15: 69-75.
Tsang A; Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> 2005; 289: H2-7.

“Postconditioning: old wine in a new bottle?”

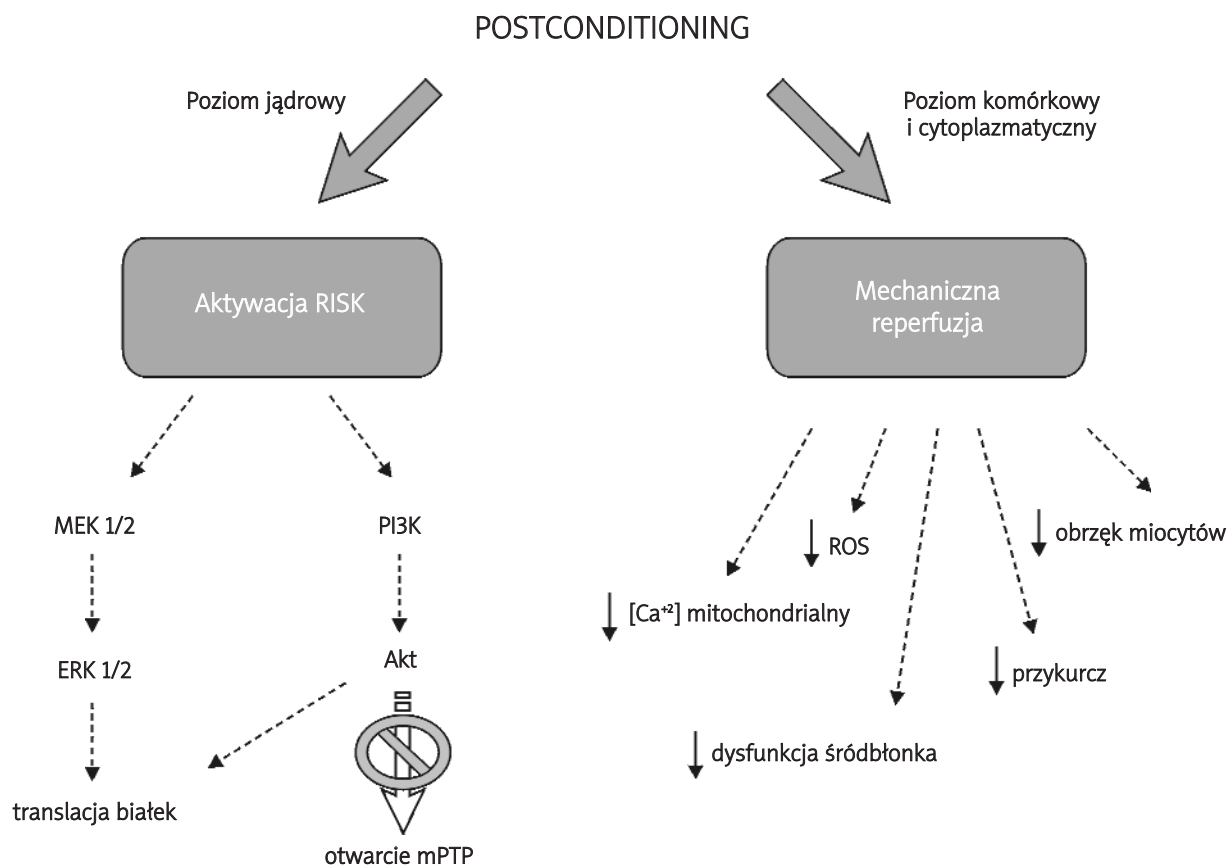
Wiadomo, że modyfikowana reperfuzja (POSTCON) zmniejsza ilość arytmii okołoreperfuzyjnych [31, 32]. Potwierdzenie, że w mechanizmie POSTCON dochodzi do ograniczenia obszaru uszkodzenia uzyskano również w badaniach z innymi gatunkami zwierząt [33, 34]. Sprzeczne są natomiast dane na temat ewentualnej addycji POSTCON i HPN [34, 35].

Postuluje się wiele mechanizmów, mogących tłumaczyć ochronne działanie mechanicznie modyfikowanej reperfuzji. Zostały one zestawione w Tabeli I i na Rycinie 1.

Podobnie jak w przypadku HPN można się spodziewać istnienia możliwych interwencji farmakologicznych naśladujących POSTCON. Stymulacja układu RISK ator-

wastatyną podawaną w okresie reperfuzji u myszy w preparacie Langendorfa redukowała uszkodzenie mięśnia sercowego [36]. Wiadomo z kolei, że atorwastatyna zmniejsza uwalnianie mioglobiny, troponiny I oraz frakcji sercowej kinazy kreatynowej w czasie planowej plastyki naczyń wieńcowych [37]. Wykazano, że erytropoetyna u szczurów, stymulując RISK, ogranicza wielkość zawatu [38].

Porównanie POSTCON z HPN sugeruje istnienie wielu podobieństw. Powstaje więc pytanie, czy rzeczywiście modyfikowana reperfuzja to nowa kategoria protekcji, czy też jest to raczej jeden mechanizm wyzwalany różnymi drogami aktywacji. Szczególnie interesujące dane wskazują na wspólną dla obu zjawisk aktywację RISK [39]. Potwierdzono, że podobnie jak POSTCON także HPN hamuje otwieranie megakanatów i to z udziałem



Rycina 1. Schemat możliwego działania ochronnego *postconditioningu*: (1) Mechaniczna reperfuzja moduluje uszkodzenie reperfuzyjne poprzez zmniejszenie produkcji ROS, zmniejszenie przeładowania wapniem mitochondriów, zmniejszenie dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, zmniejszenie obrzęku komórek i zmniejszenie nasilenia przykurczu reperfuzyjnego. (2) Aktywacja szlaku kinaz grupy RISK prowadząca do translacji białek ochronnych, mechanizmów antyapoptotycznych i zapobiegania otwarciu megakanatów.

mPTP – megakanaty; ROS – wolne rodniki; RISK – kinazy chroniące przed uszkodzeniem reperfuzyjnym: MEK 1/2-ERK 1/2, PI3K-Akt

RISK [40]. Przeczyć hipotezie sugerującej, że POSTCON jest jedynie opisem HPN przeniesionym w okres reperfuzji, może wspomniana możliwość addytywności efektów czy różnice w aktywacji poszczególnych typów receptorów adenyzykowych [26]. Podobnie udział kinazy proteinowej C został udokumentowany w HPN, jednak wydaje się mało prawdopodobny w przebiegu modyfikowanej reperfuzji [41]. Wydaje się również, że cykliczny napływ krwi w przebiegu POSTCON różni się prawdopodobnie od Buckbergowskiego *gradual* czy *gentle reperfusion*. Zwolniony, stały napływ krwi do obszaru uprzedniego niedokrwienia u psów zmniejszył rozmiar wczesnego uszkodzenia i dysfunkcję endotelium, jednakże w odróżnieniu od modyfikowanej reperfuzji powodował zwiększone gromadzenie neutrocytów w zagrożonym obszarze [42]. W innym badaniu ograniczony napływ krwi w okresie reperfuzji u świń nie zmienił obszaru uszkodzenia [43]. Nie można oczywiście wykluczyć zmienności efektów wynikających z różnic międzygatunkowych.

Możliwość dodatkowego ograniczania rozmiaru IRI u chorego leczonego fibrynolitycznie lub pierwotną angioplastyką wieńcową jest niezwykle frapującym kierunkiem rozwoju leczenia ACS. Wyniki badań eksperymentalnych wskazują na wiele możliwych kierunków badań, jednak udokumentowanie ich skuteczności klinicznej wydaje się niezwykle trudne. Polietiologiczny charakter IRI, wielość niekontrolowanych zmiennych w badaniu klinicznym, konieczność stosowania zastępczych punktów końcowych, a wreszcie różnice międzygatunkowe w odniesieniu do prac eksperymentalnych – to niektóre z możliwych przyczyn niepowodzeń. Kontrolowana mechanicznie reperfuzja może być łatwym i tanim sposobem zwiększenia efektywności pierwotnej angioplastyki wieńcowej. Zabieg ten mógłby być uzupełniony o podanie leku do obszaru niedokrwienia bezpośrednio przed przywróceniem pełnego przepływu krwi w tętnicy pozawałowej, dając w efekcie mechanicznie i farmakologicznie modyfikowaną reperfuzję. Skuteczność takiego postępowania jest przedmiotem trwających badań klinicznych.

Piśmiennictwo

- Henriques JP, Zijlstra F, Ottervanger JP, et al. Incidence and clinical significance of distal embolization during primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2002; 23: 1112-7.
- Kotani J, Nanto S, Mintz GS, et al. Plaque gruel of atheromatous coronary lesion may contribute to the no-reflow phenomenon in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 2002; 106: 1672-7.
- Sakuma T, Leong-Poi H, Fisher NG, et al. Further insights into the no-reflow phenomenon after primary angioplasty in acute myocardial infarction: the role of microthromboemboli. *J Am Soc Echocardiogr* 2003; 16: 15-21.
- Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12: 261-73.
- De Luca G, Suryapranata H, Stone GW, et al. Abciximab as adjunctive therapy to reperfusion in acute ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 2005; 293: 1759-65.
- Stone GW, Webb J, Cox DA, et al. Distal microcirculatory protection during percutaneous coronary intervention in acute ST-segment elevation myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 293: 1063-72.
- Mizote I, Ueda Y, Ohtani T, et al. Distal Protection Improved Reperfusion and Reduced Left Ventricular Dysfunction in Patients With Acute Myocardial Infarction Who Had Angiographically Defined Ruptured Plaque. *Circulation* 2005; 112: 1001-7.
- Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 365-71.
- Cooley DA, Reul GJ, Wukasch DC. Ischemic contracture of the heart: „stone heart”. *Am J Cardiol* 1972; 29: 575-7.
- Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1404-7.
- Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C227-41.
- Schafer C, Ladilov Y, Inserte J, et al. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 241-50.
- Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis* 2001; 6: 279-90.
- Baran KW, Nguyen M, McKendall GR, et al. Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI) study. *Circulation* 2001; 104: 2778-83.
- Patel MB, Kilgore KS, Ortolano GA, et al. Conditioned blood reperfusion during angioplasty (CoBRA) treatment of acute myocardial infarction. *Perfusion* 2001; 16 Suppl: 39-49.
- Sawa Y, Matsuda H. Myocardial protection with leukocyte depletion in cardiac surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 13: 73-81.
- Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995; 307 (Pt 1): 93-8.
- Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 63-7.
- Ishii H, Ichimiya S, Kanashiro M, et al. Impact of a single intravenous administration of nicorandil before reperfusion in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2005; 112: 1284-8.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) -pathway. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 448-60.

21. Headrick JP. Ischemic preconditioning: bioenergetic and metabolic changes and the role of endogenous adenosine. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1227-40.
22. Murry C, Jennings R, Reimer K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-36.
23. Uchiyama Y, Otani H, Okada T, et al. Integrated pharmacological preconditioning in combination with adenosine, a mitochondrial KATP channel opener and a nitric oxide donor. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 148-59.
24. Penttila HJ, Lepojarvi MV, Kaukoranta PK, et al. Ischemic preconditioning does not improve myocardial preservation during off-pump multivessel coronary operation. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 1246-52.
25. Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, et al. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1775-80.
26. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, et al. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 124-33.
27. The CREATE-ECLA Trial Group Investigators*. Effect of Glucose-Insulin-Potassium Infusion on Mortality in Patients With Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: The CREATE-ECLA Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2005; 293: 437-46.
28. Follette DM, Fey K, Buckberg GD, et al. Reducing postischemic damage by temporary modification of reperfusate calcium, potassium, pH, and osmolarity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981; 82: 221-38.
29. Kirklin JW. The science of cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1990; 4: 63-71.
30. 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: H579-88.
31. Smolka G, Ochala A, Wojakowski W, et al. Controlled reperfusion during primary coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 2003; 92: 192L.
32. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, et al. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 1006-10.
33. Yang XM, 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: 1103-10.
34. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, et al. Postconditioning: a form of „modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 2004; 95: 230-2.
35. Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, et al. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 961-9.
36. Efthymiou CA, Mocanu MM, Yellon DM. Atorvastatin and myocardial reperfusion injury: new pleiotropic effect implicating multiple pro-survival signaling. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 247-52.
37. Pasceri V, Patti G, Nusca A, et al. Randomized trial of atorvastatin for reduction of myocardial damage during coronary intervention: results from the ARMYDA (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty) study. *Circulation* 2004; 110: 674-8.
38. Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 2005; 100: 397-403.
39. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, et al. Ischemic preconditioning protects by activating pro-survival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H971-6.
40. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, et al. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 2004; 113: 1535-49.
41. Armstrong SC. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 427-36.
42. Sato H, Jordan JE, Zhao ZQ, et al. Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 1099-107.
43. Sjaastad I, Grund F, Ilebekk A. Effects on infarct size and on arrhythmias by controlling reflow after myocardial ischaemia in pigs. *Acta Physiol Scand* 2000; 169: 195-201.

Zaburzenia równowagi śródbłonkowej w nadciśnieniu tętniczym. Rola peptydów natriuretycznych i endoteliny

Endothelial dysfunction in hypertension. The role of natriuretic peptides and endothelin

Robert Irzmański¹, Ewa Serwa-Stępień¹, Marcin Barylski¹, Maciej Banach², Jan Kowalski¹, Lucjan Pawlicki¹

¹ Klinika Chorób Wewnętrznych i Rehabilitacji Kardiologicznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

² Klinika Kardiologii, I Katedra Kardiologii i Kardiologii, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Streszczenie

Nadciśnienie tętnicze jest istotnym czynnikiem, 3- do 5-krotnie zwiększającym ryzyko zgonu z powodu chorób układu krążenia zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn. Opierając się na wynikach wielu przeprowadzonych badań, obecnie utrwalił się pogląd, iż kluczową rolę w rozwoju nadciśnienia tętniczego odgrywają złożone i wieloczynnikowe mechanizmy zachodzące na poziomie molekularnym. Prowadzą one do szeregu zmian w układzie sercowo-naczyniowym, w tym do nieodwracalnych procesów zaburzających m. in. funkcję śródbłonka, jak również powodujących nadmierne wydzielanie hormonów natriuretycznych.

Poniższy artykuł stanowi przegląd aktualnej wiedzy na temat budowy i funkcji, jaką pełni śródbłonek i wydzielane przez niego hormony w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Wyjaśnia również mechanizm działania hormonów natriuretycznych, które poprzez modulowanie stężenia m. in. angiotensyny, noradrenaliny i endoteliny w istotny sposób regulują naczyniowy opór obwodowy, a tym samym i ciśnienie tętnicze.

Abstract

Hypertension is a significant factor, increasing the risk of death by 3–5 times, both in women and men. Nowadays, an opinion became consolidated, being based on many trial results, that the key role in development of hypertension play complex and multiple mechanisms at the molecular level. They lead to many changes in cardiovascular system, including irreversible processes disturbing endothelial function and also causing excessive secretion of natriuretic hormones.

The article below is a review of actual knowledge about endothelium, its structure, secreted hormones and function in pathogenesis of hypertension. It also explains mechanisms of natriuretic peptide activity, which through the modulation of angiotensin, noradrenalin and endothelin concentration, regulates peripheral vascular resistance and thus hypertension.

Kardiologia Polska 2005; 63; 4 (Supl. 2): 457-461

W ciągu ostatnich dziesięcioleci dokonał się istotny postęp w badaniach nad patogenezą nadciśnienia tętniczego. Wynika on z głębszego poznania mechanizmów regulujących ciśnienie krwi, jak również procesów leżących u podłoża zmian strukturalnych i funkcjonalnych w przebiegu nadciśnienia. Obecnie coraz bardziej powszechny jest pogląd, że w patogenezie nadciśnienia uczestniczą złożone i wieloczynnikowe mechanizmy zachodzące na poziomie molekularnym [1, 2]. Prowadzą one do szeregu zmian w układzie sercowo-naczyniowym, w tym do nieodwracalnych procesów zaburzających m.in. funkcję śródbłonka. Uważa się, że jego dys-

funkcja stanowi pierwszy etap rozwoju miażdżycy, poprzedzający występowanie objawów klinicznych [3].

Śródbłonek naczyniowy stanowi pojedynczą warstwę komórek, osłaniającą od wewnątrz ścianę naczynia. Uwalniając do krwiobiegu szereg substancji o działaniu naczyniorozszerzającym, takich jak tlenek azotu (NO), prostacyklina, czynnik hiperpolaryzujący (EDHF) czy naczynioskurczowym jak: tromboxan A₂, prostaglandyna H₂, endotelina (Et-1), jest nie tylko lokalnym regulatorem napięcia ściany naczyń, ale pełni także ważną funkcję w endogennym układzie kontroli systemowego ciśnienia tętniczego.

Adres do korespondencji:

Robert Irzmański, Klinika Chorób Wewnętrznych i Rehabilitacji Kardiologicznej, Pl. Hallera 1, 90-647 Łódź, tel.: +48 42 639-30-82, e-mail: robik03@mp.pl

Tlenek azotu powstaje z L-argininy za pośrednictwem enzymu zwanego syntetazą tlenku azotu (eNOS). Jest uwalniany w sposób ciągły – podstawowe uwalnianie NO, wskutek stałej stymulacji komórek śródbłonna przez naczyniowe siły ścinające (*shear stress*), prowadzi do permanentnego tonicznego rozkurczu [4]. Zahamowanie podstawowego uwalniania NO u ludzi skutkuje przerostem mięśniówki gładkiej naczyń, wzrostem naczyniowego oporu obwodowego i w rezultacie nadciśnieniem tętniczym. Tlenek azotu wydzielany jest także w zależności od aktualnego zapotrzebowania – stymulowane uwalnianie NO następuje pod wpływem takich czynników, jak acetylocholina, bradykinina oraz substancja P, które pobudzają swoiste receptory śródbłonkowe. Część uwalnianego NO przedostaje się również do światła naczyń, gdzie reagując z płytkami krwi, wywiera działanie antyagregacyjne i antyadhezyjne. W warunkach fizjologicznych ciągła synteza i uwalnianie NO przeciwdziała i buforuje następstwa działania wydzielanych jednocześnie substancji obkurczających naczynia np. ET-1 [5]. W przypadku upośledzenia aktywności NO, czy to wskutek zmniejszonej sekrecji, czy w następstwie inaktywacji, dochodzi do przewagi czynników naczynioskurczowych promujących rozwój miażdżycy [6]. Uważa się, że w nadciśnieniu tętniczym procesy syntezy i uwalniania NO nie są zaburzone. Dochodzi natomiast do wzmożonej inaktywacji NO. Spowodowana jest ona przez krążące we krwi rodniki tlenowe – aniony nadadtlenkowe, powstające w wyniku zaburzonej równowagi pomiędzy systemem czynników oksydacyjnych i enzymów antyoksydacyjnych [7]. Uwolnione w nadmiarze aniony nadadtlenkowe reagują z tlenkiem azotu, tworząc nadtlenek azotynu będący znacznie słabszym wazodilatatorem. Powstająca przewaga czynników wazokonstrykcyjnych, takich jak endotelina, angiotensyna II czy współczulny układ nerwowy prowadzi do dalszej dysfunkcji śródbłonna, wpływając nie tylko na wzrost napięcia ściany naczyniowej, ale również na zwiększenie agregacji płytek i koagulacji.

Endotelina jest parakrynnym hormonem wielonarządowym, który występuje w 3 postaciach izomorficznych: ET-1, ET-2, ET-3. Są one syntetyzowane przez komórki ścian naczyń w mózgu, nerkach i w gruczołach wydzielania wewnętrznego [8]. Czynnikiem stymulującym wydzielanie endotelin jest szereg różnych substancji, takich jak: adrenalina, angiotensyna II, wazopresyna, trombina, insulina, interleukina 1, płytkopochodny czynnik wzrostu (PGDF), TNF- α oraz czynnik wzrostu naskórki (EGF). Najsilniejsze działanie naczyniozwiązujące i presyjne wykazuje ET-1, której zwiększone stężenie obserwowano w złośliwym nadciśnieniu tętniczym i stanie przedzrzucawkowym [9]. Pod-

wyższone stężenie ET-1 zwiększa napięcie ośrodkowego i obwodowego układu współczulnego, jak również nasila naczyniokurczące działanie noradrenaliny [10]. Na tej podstawie przypuszcza się, że zaburzenie interakcji między ET-1 a współczulnym układem nerwowym może być jednym z czynników determinujących rozwój nadciśnienia tętniczego. W działaniu endotelin pośredniczą dwa typy metabotropowych receptorów związanych z białkami G: ET-A i ET-B [11]. W wyniku aktywacji receptorów ET-A dochodzi do zwiększenia aktywności fosfolipazy C, D, a nawet A2 i tym samym do wzrostu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie, co powoduje efekt naczyniozwiązujący. Aktywacja receptorów ET-B oraz jego poznanych podtypów: endotelialnego ET-B1 i mięśniowego ET-B2 powoduje zwiększenie wytwarzania związków rozkurczających mięśnie gładkie naczyń, np. tlenku azotu czy adrenomedulliny, a także zwiększa ekspresję genu endoteliny, stymulując lokalnie własną syntezę. ET-1 wydzielana przez komórki śródbłonna aktywuje oba typy receptorów [12]. Pobudzenie występujących w śródbłonku receptorów ET-B powoduje, jak wspomniano, relaksację naczyń poprzez stymulację aktywności syntazy NO z następczym wzrostem cykazy guanylowej i zwiększonym uwalnianiem cGMP oraz syntazy prostacykliny przebiegający ze zwiększeniem aktywności cykazy adenylowej i wzrostem uwalniania cAMP. Zachodzące jednocześnie procesy prowadzą w rezultacie do zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. W naczyniu przeważa jednak efekt naczynioskurczowy [13].

W układzie krążenia receptory ET-A występują w komórkach mięśni gładkich i kardiomiocytów, natomiast receptory ET-B w komórkach śródbłonna i komórkach mięśniowych [14]. Receptory ET-B występujące w nerkach, jak się przypuszcza, mogą pełnić rolę receptorów klirensowych, zmniejszając resorbcję zwrotną sodu w kanalikach nerkowych przez hamowanie pompy sodowo-potasowej. Efekt ten jest jednak w znacznym stopniu ograniczany przez przeciwstawne, hemodynamiczne działanie ET-1 na nerki prowadzące do wzrostu resorbcji sodu [15, 16].

W sercu ET-1 zwięża naczynia wieńcowe i działa inotropowo dodatnio [17]. Zwiększa również wydzielanie peptydów natriuretycznych oraz pobudza proliferację kardiomiocytów i fibroblastów. Wydzielanie endotelin w mięśniu serca rośnie w warunkach jego zwiększonego naprężenia, spowodowanego wzrostem obciążenia następczego oraz pod wpływem angiotensyny (Ang II). Oprócz stymulacji wydzielania endotelin Ang II potęguje efekty ich aktywności. Endotelina, zwiększając wydzielanie aldosteronu, współuczestniczy z Ang II w zwłóknieniu mięśnia serca [18]. Zablokowanie po-

wstawania Ang II przez inhibitory konwertazy powoduje spadek sekrecji ET-1 [19].

Wielu badaczy obserwuje istnienie ścisłej zależności pomiędzy układem endoteliny i peptydów natriuretycznych w osoczu. W badaniu Kida i wsp. udowodniono, że endoteliny zwiększają sekrecję przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP), zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Z kolei ANP i mózgowy peptyd natriuretyczny (BNP) zwrotnie ograniczają wydzielanie ET-1. W doświadczeniu na szczurach normotensyjnych i z samoistnym nadciśnieniem tętniczym podawano dożylnie endotelinę i jednocześnie ANP, oceniając wpływ infuzji na ciśnienie tętnicze i częstość rytmu serca. W obu grupach obserwowano obniżenie ciśnienia tętniczego. Jednak jego znaczący spadek był większy u szczurów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym niż u szczurów normotensyjnych. W grupie normotensyjnej zmniejszenie ciśnienia i częstości rytmu było wyraźnie łagodniejsze w trakcie podawania ANP [20].

Do rodziny peptydów natriuretycznych należą oprócz wymienionych: ANP i BNP także peptyd natriuretyczny typu C (CNP), urodylatyna (URO) i otrzymany z jadu węża peptyd natriuretyczny typu D (*dendroaspis* – DNP) [21]. Wszystkie poznane peptydy natriuretyczne mają zbliżoną budowę i działają za pośrednictwem układu receptorów tkankowych. Powodują wzmożoną diurezę i nasilają wydalanie sodu. Działają hipotensyjnie, a także hamują proliferację komórek mięśni gładkich w ścianie naczyń krwionośnych. ANP i BNP są wytwarzane głównie w sercu, przy czym ANP jest uwalniany z miocytów w przedsionkach, a BNP wydzielany w komorach, w odpowiedzi na rozciąganie jam serca. Natomiast CNP wytwarzany głównie przez komórki śródbłonka i struktury mózgu pełni rolę hormonu parakrynnego. Urodylatyna wytwarzana jest i działa przede wszystkim w nerkach. Rozciągnięcie kardiomiocytów powoduje uwalnianie peptydów natriuretycznych z tzw. szybkiej puli serca [22]. Przedłużające się przeciążenie mięśnia serca prowadzi do wzmożonej syntezy peptydów natriuretycznych [23]. Dzieje się tak pod wpływem endoteliny-1, jak również w wyniku działania noreadrenaliny czy Ang II. Przyjmuje się, że czynniki mogące inicjować przerost serca indukują liczne szlaki transdukcji sygnału oraz czynniki transkrypcyjne prowadzące do zwiększenia ekspresji genów płodowych w kardiomiocytach i tym samym wzrostu aktywności promotora genu ANP [24]. Wydzielanie CNP jest natomiast regulowane przez czynniki wzrostu i cytokiny, głównie przez TNF- α , interleukinę-1 i czynniki transformujące. Zwiększone wydzielanie CNP obserwuje się w wyniku uszkodzenia lub hipoksji tkanek, jak również w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek.

Działanie hormonów natriuretycznych związane jest z aktywacją trzech typów receptorów natriuretycznych: A, B oraz C. Receptory typu A i B posiadają dwie domeny zewnątrzkomórkowe wiążące ligand i dwie domeny wewnątrzkomórkowe zawierające cyklazę guanylową i kinazę, które warunkują tworzenie cGMP. Receptory typu C, nie posiadające cyklazy guanylowej, pełnią rolę receptorów klirensowych, umożliwiając transport hormonów natriuretycznych do komórek. ANP i BNP wiążą się z receptorami typu A, natomiast CNP pobudza najsilniej receptory typu B. Największe powinowactwo do receptorów typu A, i co za tym idzie wzrostu stężenia c-GMP, wykazują w kolejności wg siły ich oddziaływania: ANP>BNP>CNP. Natomiast receptory typu B najsilniej pobudzają w kolejności: CNP>ANP>BNP.

ANP wykazuje również największe powinowactwo do receptorów typu C, które – jak się uważa – mogą aktywować szlak fosfatydyloinozitolowy oraz hamować wytwarzanie cAMP [25]. Działanie hipotensyjne ANP polega na rozszerzeniu naczyń oporowych. Głównie dotyczy ono przedwłośniczkowych naczyń tętniczych, w mniejszym stopniu natomiast pozawłośniczkowych naczyń żylnych. Zmniejszając powrót żylny, ANP redukuje napływ krwi do serca i zmniejsza pojemność minutową, prowadząc do obniżenia ciśnienia tętniczego. Wynika to ze zwiększenia przepuszczalności śródbłonka dla płynu osocznego pod wpływem ANP, co powoduje jego ucieczkę z naczyń do przestrzeni pozanacyniowej, zwiększając tym samym hematokryt i stężenie białek osocza. Dochodzi w ten sposób do hipowolemii, którą nasila jednoczesne działanie natriuretyczne ANP [26]. Wszystkie te zjawiska obserwowano w trakcie infuzji dożylniej ANP lub BNP w niewielkim stężeniu. Peptydy hamują bowiem uwalnianie z zakończeń nerwowych zarówno ATP, aktywatora receptorów purynowych, jak i noradrenaliny, nie mają natomiast wpływu na aktywność postsynaptyczną tych przekaźników. Peptydy natriuretyczne poza bezpośrednim wpływem naczyniorozszerzającym wywierają również pośrednie działanie prohipotensyjne, osłabiając naczyniozwiązujące działanie noradrenaliny, angiotensyny II i wazopresyny [27]. Osłabiają również ośrodkowe presyjne działanie angiotensyny II i wazopresyny oraz ośrodkowe pobudzenie układu współczulnego. Redukcja tego ostatniego wynika z potęgowania przez ANP odruchu z baroreceptorów. Podczas dożylniej infuzji BNP obserwowano zmniejszenie oporu naczyniowego i spadek ciśnienia tętniczego, zwiększenie wskaźnika sercowego oraz zmniejszenie oporu naczyniowego w krążeniu płucnym i prawym przedsionku. Szczególnie wrażliwe na naczyniorozszerzające działanie peptydów natriuretycznych są naczynia krążenia wieńcowego i nerkowe-

go. Istotną rolę w lokalnym rozszerzaniu naczyń przypisuje się CNP, który jest wytwarzany przez komórki śródbłonna. CNP w odróżnieniu od pozostałych peptydów natriuretycznych działa zarówno na mięśnie gładkie naczyń żylnych, jak i tętniczych.

W badaniach przeprowadzonych przez Pigeona i wsp. po raz pierwszy bezpośrednio porównano siłę działania tych samych dawek ANP i BNP u chorych z nadciśnieniem tętniczym. Oceniano hemodynamiczny i endokryny wpływ peptydów natriuretycznych. Docelowe stężenia peptydów w krwi miały odzwierciedlać wartości obserwowane u pacjentów z ciężkim nadciśnieniem tętniczym. W badaniu tym porównywano efekty równomolalnych dawek ANP, BNP oraz obu peptydów łącznie. Infuzja peptydów zwiększała natriurezę powyżej poziomu obserwowanego przed ich podaniem, powodowała obniżenie ciśnienia tętniczego, wzrost hematokrytu oraz zahamowanie układu RAA i zwiększenie stężenia norepinefryny w osoczu. Efekt natriuretyczny i hipotensyjny BNP był większy w porównaniu do ANP. Jednak ANP znamienne podwyższał stężenie w osoczu i w moczu II przekaźnika-cGMP, w porównaniu z BNP. Oba peptydy hamowały aktywność reninową osocza i sekrecję aldosteronu oraz zwiększały stężenie norepinefryny o blisko 30% [28]. Z kolei zahamowanie aktywności osoczowej endopeptydazy (*neutral endopeptidase* – NEP), biorącej udział w eliminacji peptydów natriuretycznych, wywierało działanie sodopędne w modelu zwierzęcym nadciśnienia tętniczego oraz u ludzi. Z drugiej strony, działanie sodopędne i hipotensyjne peptydów natriuretycznych jest znacznie osłabione u chorych z nadciśnieniem tętniczym, niewydolnością nerek czy serca. Przypuszcza się, że przyczyną tego stanu jest zarówno zwiększenie metabolizmu peptydów natriuretycznych, jak i zmniejszona ekspresja receptorów tkankowych.

Ważnych danych o udziale peptydów natriuretycznych w patogenezie nadciśnienia tętniczego dostarczyła genetyka molekularna. Zaobserwowano, że brak genu ANP warunkuje powstanie sodowrażliwego nadciśnienia, zaś zwiększona ekspresja tego genu u zwierząt transgenicznych wiąże się z nadmiernym spadkiem ciśnienia. Z kolei u chorych z nadciśnieniem tętniczym badania polimorfizmu genów ANP zaowocowały oznaczeniem allelicznego i genotypowego rozkładu wariantów molekularnych genów kodujących ANP. W badaniach klinicznych potwierdzono u ludzi występowanie nadciśnienia idiopatycznego w ścisłym związku z obecnością polimorfizmu genu ANP [29]. Szczegółowa analiza struktury genu ANP pozwoliła na odkrycie mutacji w obrębie jego sekwencji kodującej oraz końca 5'. W badanej grupie obserwowano zwiększone uwalnianie cGMP, co prowadziło do zachwiania równowagi

śródbłonkowej i w konsekwencji do przedwczesnego uszkodzenia ściany naczyniowej [30].

Peptydy natriuretyczne wspólnie z tlenkiem azotu hamują aktywność presyjną angiotensyny, noradrenaliny i przede wszystkim endoteliny, warunkując w ten sposób utrzymanie prawidłowego napięcia ściany naczyniowej. Zatem czynniki wpływające na równowagę śródbłonkową odgrywają podstawową rolę w regulacji ciśnienia systemowego. Z tego punktu widzenia wyjaśnienie procesów zachodzących w błonie wewnętrznej naczyń, zwłaszcza w przebiegu chorób układu sercowo-naczyniowego, ma istotne znaczenie dla precyzyjnego ustalenia patomechanizmów wielu schorzeń tego układu oraz wyznaczenia nowych kierunków ich terapii.

Piśmiennictwo

1. Esler M, Rumantir M, Kaye D, et al. The sympathetic neurobiology of essential hypertension: disparate influences of obesity, stress, and noradrenaline transporter dysfunction? *Am J Hypertens* 2001; 14: 139S-46S.
2. Peticone F, Ceravolo R, Pujia A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104: 191-6.
3. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 2696-8.
4. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 532-41.
5. Rizvi MA, Myers PR. Nitric oxide modulates basal and endothelin-induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen levels. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1779-89.
6. Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* 1995; 91: 1732-8.
7. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* 1999; 34: 539-45.
8. Benigni A, Remuzzi G. Endothelin antagonists. *Lancet* 1999; 353: 133-8.
9. Gryglewski RJ. Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol Toxicol* 1995; 77: 1-9.
10. Ferro CJ, Webb DJ. Endothelial dysfunction and hypertension. *Drugs* 1997; 53 (Suppl. 1): 30-41.
11. Ohmishi M, Wada A, Tsutamoto T, et al. Significant role of endothelin-A and endothelin-B receptor in renal function in congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36 (5 Suppl. 1): 44-9.
12. Wang J, Chiou WJ, Gagne GD, et al. Internalization of type-A endothelin receptor. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36 (5 Suppl. 1): S61-5.
13. Iglar M, Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5: 144-8.
14. Haynes WG, Ferro CJ, O'Kane KPJ, et al. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* 1996; 93: 1860-70.

15. Bennini A, Perico G, Remuzzi G. Endothelin antagonists and renal protection. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35 (4 Suppl. 2): 75-9.
16. Bassenge E. Endothelial function in different organs. *Progress in Cardiovasc Dis* 1996; 39: 209-28.
17. Schiffrin EL, Intengan HD, Tibault G, et al. Clinical significance of endothelin in cardiovascular disease. *Curr Op Cardiol* 1997; 12: 354-67.
18. Weber KT. Fibrosis, a common pathway to organ failure: angiotensin II and tissue repair. *Semin Nephrol* 1997; 17: 461-4.
19. Fabris B, Chem B, Pupic V, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) in plasma and tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 15 (Suppl. 2): 56-9.
20. Budzikowski AS, Paczwa P, Szczepańska-Sadowska E. Central V1 AVP receptors are involved in cardiovascular adaptation to hypovolemia in WKY but not in SHR. *Am J Physiol* 1996; 271: H1057-H64.
21. Stein BC, Levin RI. Natriuretic peptides: Physiology, therapeutic potential and risk stratification in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1998; 135: 914-23.
22. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, et al. Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 1998; 97: 1921-9.
23. Ogawa K, Oida A, Sugimura H, et al. Clinical significance of blood brain natriuretic peptide level measurement in the detection of heart disease in untreated outpatients-comparison of electrocardiography, chest radiography and echocardiography. *Circ J* 2002; 66: 122-6.
24. McKinsey TA, Nolson EN. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 267-74.
25. Suzuki T, Yamazaki T, Yazaki Y. The role of the natriuretic peptides system in cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 481-8.
26. Brunner-la Rocca HP, Kiowski W, Ramsay D, et al. Therapeutic benefits of increasing natriuretic peptides levels. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 510-20.
27. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Mechanism of disease: Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; 339: 321-8.
28. Pidgeon GB, Richards AM, Nichols MG. Differing metabolism and bioactivity of atrial and brain natriuretic peptide in essential hypertension. *Hypertension* 1996; 27: 906-13.
29. Kato N, Sugiyama T, Morita H, et al. Genetic analysis of the atrial natriuretic peptide gene in essential hypertension. *Clin Sci* 2000; 98: 251-8.
30. Rubattu S, Giliberti R, Ganten U, et al. A differential brain atrial natriuretic peptide expression co-segregates with occurrence of early stroke in the stroke prone phenotype of spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1999; 17: 1849-52.

Farmakologia śródbłonna w nadciśnieniu płucnym

Endothelium pharmacology in pulmonary hypertension

Andrzej Fedorowicz^{1,2}, Stefan Chłopicki²

¹Zakład Farmakodynamiki, Katedra Farmakodynamiki, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

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

Streszczenie

Dysfunkcja śródbłonna płucnego jest warunkiem koniecznym do rozwoju nadciśnienia płucnego. Niewydolność śródbłonkowej syntezy prostacykliny (PGI₂), tlenku azotu (NO) i wzrost aktywności endoteliny 1 (ET-1) są związane z rozwojem tej choroby. Celem niniejszego artykułu jest omówienie trzech podstawowych przekaźników śródbłonna płucnego, takich jak NO, PGI₂, ET-1, ich roli w nadciśnieniu płucnym oraz zarysowanie możliwości farmakologicznej modulacji czynności tych przekaźników.

Abstract

The dysfunction of lung endothelium is crucial in the development of pulmonary hypertension. Dysfunction of endothelial synthesis of prostacyclin (PGI₂) and nitric oxide (NO) and increased activity of endothelin 1 (ET-1) are connected to the progress of the disease. In this review the authors describe three major mediators of pulmonary endothelium: NO, PGI₂ and ET-1. Their role in pulmonary hypertension and possibilities of pharmacological modulation of their activity are also discussed.

Kardiologia Polska 2005; 63; 4 (Supl. 2): 462-471

Wprowadzenie

Krążenie płucne różni się od krążenia systemowego pod wieloma względami. Jednak znaczenie prawidłowej czynności śródbłonna dla zdrowia układu krążenia i rola dysfunkcji śródbłonna w patologii układu krążenia nabierają podobnego, fundamentalnego znaczenia. Istotnie, nadciśnienie płucne związane jest z niewydolnością śródbłonkowej syntezy prostacykliny (PGI₂), tlenku azotu (NO) i wzrostem aktywności endoteliny 1 (ET-1) [1-3]. Towarzyszą temu z jednej strony zmiany zakrzepopodne śródbłonna (np. spadek ekspresji śródbłonkowej trombomoduliny [4]) wzrost aktywności płytkowego TXA₂ [5], a z drugiej aktywacja procesów zapalnych śródbłonna, przejawiająca się wzrostem stężenia osoczkowego cytokin prozapalnych (takich jak np. IL-1β, IL-6) [6], rozpuszczalnych cząsteczek adhezyjnych (np. sVCAM-1, sICAM-1) i chemokin (np. MIP-1α, RANTES) [7, 8]. Istnieją więc uderzające podobieństwa pomiędzy fenotypem dysfunkcji śródbłonna w nadciśnieniu płucnym i w chorobach krążenia systemowego [9].

Rzecz jasna, inne czynniki wywołują dysfunkcję śródbłonna płucnego w nadciśnieniu płucnym, a inne dys-

funkcję krążenia systemowego, prowadzącą do *atherothrombosis*. Pomimo że w zarysie w jednym i drugim przypadku upośledzona jest produkcja naczynioprotekcyjnych mediatorów śródbłonna, aktywowane są mechanizmy zapalne i zakrzepowe śródbłonna, nasilenie tych procesów, ich biochemiczne podłoże, jak również znaczenie w rozwoju patologii mogą być odmienne. Jednak w jednym i drugim przypadku patologiczne zmiany w śródbłonnku odgrywają kluczową rolę. Dysfunkcja śródbłonna obwodowego jest warunkiem sine qua non rozwoju *atherothrombosis* [9], a dysfunkcja śródbłonna płucnego – rozwoju nadciśnienia płucnego [1].

Farmakoterapia nadciśnienia płucnego przez wiele lat błędziła [2, 10]. Dopiero niedawno w leczeniu nadciśnienia płucnego pojawili się antagoniści kanału wapniowego typu L, a obecnie są podstawową grupą leków w leczeniu tej choroby [11]. Nowe nadzieje pojawiły się jednak dopiero wtedy, gdy zaproponowano terapię z użyciem wziewnego NO, analogów PGI₂ oraz antagonistów receptorowych dla ET-1 [10, 12]. Dzisiejsza farmakologia nadciśnienia płucnego zasadza się więc na terapii substytucyjnej

Adres do korespondencji:

Stefan Chłopicki, Zakład Farmakologii Doświadczalnej Katedry Farmakologii, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Grzegorzewska 16, 31-531 Kraków, tel.: +48 12 421 11 68, +48 12 294 34 44, faks: +48 12 421 72 17, e-mail: mfschlop@cyf-kr.edu.pl

dla niewydolnego śródbłonka krążenia płucnego (zmniejszenie NO i PGI₂) albo na hamowaniu nadmiernej aktywności wytwarzanych przez niego przekaźników (ET-1). Ciężko, że leki z grupy antagonistów kanału wapniowego, poza swoim klasycznym działaniem na mięśniówkę gładką naczyń, mogą zawdzięczać skuteczność terapeutyczną również działaniu śródbłonkowemu [13–15].

Wydaje się więc, że podstawę leczenia nadciśnienia płucnego stanowi farmakologia śródbłonka. Celem niniejszego artykułu jest omówienie trzech podstawowych przekaźników śródbłonka płucnego, takich jak NO, PGI₂, ET-1, ich roli w nadciśnieniu płucnym oraz zarysowanie możliwości farmakologicznej modulacji czynności tych przekaźników.

Fenotyp dysfunkcji śródbłonka w nadciśnieniu płucnym

U pacjentów z nadciśnieniem płucnym i w modelach zwierzęcych nadciśnienia płucnego rozwija się dysfunkcja śródbłonka obejmująca wiele różnych zmian biochemicznych [1]. Na pierwszy plan wysuwają się: zmniejszenie wydzielania NO i PGI₂ oraz zwiększenie wydzielania ET-1 przez śródbłonek. Towarzyszą temu zmiany strukturalne, prozapalne, prozakrzepowe ściany naczyń, jak również zaburzenia proliferacji komórek śródbłonka (*plexiform lesion*) [2].

Nie są poznane mechanizmy rozwoju dysfunkcji śródbłonka w krążeniu płucnym. Najprawdopodobniej powstaje ona pod wpływem innych czynników niż w przypadku dysfunkcji śródbłonka obwodowego. Dla przykładu hipercholesterolemia, hipertriglicerydemia, oporność na insulinę, paradontoza, nie mają wielkiego znaczenia w nadciśnieniu płucnym [2]. Znaczenie mają raczej takie czynniki, jak niedotlenienie, czynniki hemodynamiczne, działanie toksyczne leków, czynniki zakaźne i predyspozycje genetyczne [2, 16].

Interesujące, że podnoszone ostatnio czynniki genetyczne predysponujące do rozwoju nadciśnienia płucnego, takie jak mutacje w obrębie BMPR-2 (*bone morphogenic protein receptor 2*), Alk-1 (*activin-receptor-like kinase 1*), Endoglin, TIE/2 (receptor dla angiopoetyny 1) – wszystkie dotyczą sygnalizacji w śródbłonku płucnym. Ich omówienie można znaleźć w kilku ostatnio opublikowanych pracach [1, 2, 17, 18]. My ograniczamy się do opisanie trzech ważnych przekaźników śródbłonka płucnego, których aktywność determinuje fenotyp zdrowego i chorego śródbłonka.

Tlenek azotu (NO)

Śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (NOS-3) wytwarza NO w złożonej reakcji oksydoredukcyjnej z udziałem wielu kofaktorów (takich jak np. NADPH,

FMN, FAD, BH₄, kalmodulina-Ca²⁺), w której substratem jest L-arginina a produktami NO i L-cytrulina [19]. Choć w modelach doświadczalnych nadciśnienia płucnego obserwowano upośledzenie aktywności biologicznej NO [20] i kompensacyjny wzrost ekspresji NOS-3 [21, 22], to u pacjentów z nadciśnieniem płucnym ekspresja NOS-3 w śródbłonku zmniejsza się wraz z postępem choroby [23]. O kluczowej roli NO w nadciśnieniu płucnym świadczą też obserwacje, że zwiększona ekspresja NOS-3 u myszy transgenicznych zapobiega rozwojowi nadciśnienia płucnego, natomiast myszy genetycznie pozbawione NOS-3 rozwijają ciężkie nadciśnienie płucne w odpowiedzi na łagodną hipoksję [24, 25].

Znany profil śródbłonkowego działania NO, w tym jego działanie naczyniorozszerzające, hamujące proliferację i przebudowę mięśniówki gładkiej ściany naczyń, przeciwplatek, przeciwzapalne i naczynioprotekcyjne tłumaczy, dlaczego niedobór śródbłonkowego NO może doprowadzić do nadciśnienia płucnego i związanej z tym przebudowy naczyń płucnych. Istotnie, niektóre z elementów charakteryzujących patologiczny obraz nadciśnienia płucnego, takie jak obkurczenie drobnych tętnic płucnych, patologiczny przerost mięśniówki gładkiej naczyń płucnych, zwłóknienie w ścianie naczyń, mogą być ściśle związane z upośledzeniem śródbłonkowego wydzielania NO [21–23, 26]. Charakterystyczna dla nadciśnienia płucnego nadmierna, patologiczna proliferacja śródbłonka może być również związana z zaburzeniem czynności śródbłonkowego NO [18]. U pacjentów z nadciśnieniem płucnym upośledzone jest bowiem wydzielanie śródbłonkowego NO w odpowiedzi na VEGF (*vascular endothelial growth factor*), które warunkuje prawidłową proliferację śródbłonka [27, 28].

Powstający w śródbłonku NO wywiera swoje biologiczne działanie przez pobudzenie rozpuszczalnej cyklicznej guanylowej (sCG) [29–31]. Prowadzi to do obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺, modyfikacji czynności kanałów jonowych [32, 33], pobudzenia/zahamowania fosfodiesteraz i wtórnych zmian w szlakach zależnych od cAMP, pobudzenia szlaku kinaz MAP czy wreszcie aktywacji kinazy Rho [34–38]. Ten ostatni szlak ma istotne znaczenie w nadciśnieniu płucnym i jego zahamowanie przez fasudil obniża nadciśnienie płucne [39]. NO może wpływać na proliferację mięśni gładkich przez szlaki zależne i niezależne od cGMP [38, 40]. Wydaje się, że główną rolę spełniają te ostatnie mechanizmy, w których udział biorą poliaminy [40].

Działanie przeciwplatekowe NO jest ściśle związane z działaniem PGI₂, bowiem oba te przekaźniki synergistycznie hamują aktywację płytek krwi odpowiednio przez mechanizmy zależne od cGMP i cAMP [41, 42]. Pobudzenie szlaków zależnych od cAMP i cGMP prowadzi do hamowania wapniowozależnych mechanizmów

pobudzenia płytki, ekspresji selektyny P, zahamowania powstawania aktywnej konformacji receptora GPIIb/IIIa [43].

Warto dodać, że NO może stymulować aktywność oksydazy hemowej [44], która stanowi ważny mechanizm utrzymujący w ryzach procesy proliferacji komórek mięśni gładkich w naczyniach płucnych [45, 46]. NO jest też inhibitorem ekspresji mRNA dla preproET-1 [47].

Upośledzenie działania NO w nadciśnieniu płucnym może być związane z spadkiem ilości NO w związku ze zmniejszoną ekspresją NOS-3 [23], zwiększonym stresem oksydacyjnym i wytwarzaniem O_2^- przez oksydazę ksantynową, oksydazę NADPH lub przez rozprężoną syntazę NO (NOS-3) [48], a wreszcie ze zwiększoną ekspresją PDE5 [49], która przyspieszając rozkład cGMP, osłabia działanie NO [48].

Zgodnie z tymi obserwacjami w modelach zwierzęcych nadciśnienia płucnego niedobór tetrahydrobiopteryny (BH_4) prowadził do zmniejszonego wytwarzania NO i zwiększonego wytwarzania O_2^- przez rozprężoną NOS-3, co prowadziło do nadciśnienia płucnego i wygórowanej reakcji krążenia płucnego na ostre niedotlenienie [50]. Również suplementacja L-argininą (L-Arg) poprawiała zdolność naczyń płucnych do rozkurczu zależnego od NO oraz zmniejszała przerost prawej komory, ciśnienie w tętnicy płucnej, zmniejszała stężenie ET-1, hamowała patologiczną przebudowę naczyń [51, 52].

Jak dotąd nie ma zbyt wielu dowodów na skuteczność L-Arg czy BH_4 w przywracaniu prawidłowej czynności śródbłonna w nadciśnieniu płucnym u ludzi [11]. Farmakologia NO w nadciśnieniu płucnym dotyczy jak na razie głównie wziewnego podawania NO, które może być potęgowane przez zablokowanie PDE5 (sildenafil) [53, 54].

Wziewne podawanie NO, choć selektywnie obniża nadciśnienie płucne związane np. z nieomogą oddechową u dzieci i dorosłych i wadami rozwojowymi serca, choć wiązano z tym sposobem leczenia duże nadzieje, to dzisiaj ma ograniczone znaczenie w długotrwałej terapii nadciśnienia płucnego u dorosłych. Ten sposób terapii jest natomiast szeroko stosowany w diagnostyce nadciśnienia płucnego i w leczeniu ciężkich postaci nadciśnienia płucnego [11, 55]. Jedną z bardzo istotnych niedogodności leczenia wziewnym NO jest oporność na jego działanie naczyniorozszerzające u wielu pacjentów oraz paradoksalny wzrost ciśnienia płucnego po zaprzestaniu leczenia [11, 56].

Prostacyklina (PGI_2)

Niedługo po odkryciu prostacykliny, pierwszego przekaźnika śródbłonna [57, 58], prof. Ryszard Gryglewski postawił hipotezę, że głównym źródłem ustrojowej prostacykliny jest śródbłonek naczyń płucnych [59], a wytwarzanie PGI_2 w płucach chroni nie tylko krążenie

płucne, ale również inne łożyska naczyniowe przez tworzeniem się zakrzepów [59]. Istotnie prostacyklina jest najsilniejszym ze znanych przekaźników hamujących aktywację płytek krwi [60]. Wytwarzana jest z kwasu arachidonowego w dwuetapowej syntezie z udziałem COX-1 lub COX-2 oraz syntazy prostacykliny (PGIS). Jej wewnątrzkomórkowy mechanizm działania związany jest ze wzrostem stężenia cAMP w komórkach docelowych [61]. Obok efektu przeciwplatekowego [57], PGI_2 powoduje zahamowanie proliferacji mięśniówki gładkiej naczyń tętnic płucnych [62], działa cytoprotekcyjnie na komórki śródbłonna, przeciwdziała aktywacji zapalnej śródbłonna i rozwojowi jego dysfunkcji [63]. W przeciwieństwie do NO endogenna PGI_2 nie uczestniczy w mechanizmach naczyniorozszerzających śródbłonna płucnego. Rzeczywiście tylko zahamowanie syntezy NO nasila skurcz naczyń płucnych wywołany przez hipoksję [64]. PGI_2 w krążeniu płucnym musi więc pełnić inną rolę niż NO.

Istotnie, zarówno prostacyklina (podawana dożylnie jako epoprostenol) jak i jej analogi (takie jak: beraprost, teprostinil, iloprost) silnie hamują niektóre elementy biochemiczne dysfunkcji śródbłonna i związanej z nią aktywacji zapalnej i prozakrzepowej śródbłonna. W nadciśnieniu płucnym stwierdza się podniesiony poziom rozpuszczalnej selektyny P, obniżony poziom trombomoduliny [4] i zwiększony poziom czynnika von Willebranda (vWF) [65]. Prostacyklina podana dożylnie obniża stężenie rozpuszczalnej selektyny P oraz podnosi poziom trombomoduliny u pacjentów z nadciśnieniem płucnym [66]. Stężenie trombomoduliny *in vitro* obniża również beraprost [67]. Długoterminowa terapia prostacykliną zmniejsza także poziom vWF [39]. Ten efekt terapeutyczny PGI_2 jest o tyle istotny, że poziom vWF jest wyznacznikiem postępu choroby i czynnikiem prognostycznym dla śmiertelności w nadciśnieniu płucnym [68]. Prostacyklina podana dożylnie nie wpływa jednak na poziom sCD40L, IL-8 i MCP-1 u pacjentów z nadciśnieniem płucnym [3].

Wydaje się więc, że terapia PGI_2 lub jej analogami poprawia czynność śródbłonna płucnego w nadciśnieniu płucnym i łagodzi niektóre objawy jego aktywacji zapalnej i zakrzepowej.

Wydzielanie NO i PGI_2 w śródbłonnku jest w wielu przypadkach sprzężone [69, 70]. Upośledzenie aktywności biologicznej śródbłonna NO jest niejednokrotnie związane z upośledzeniem aktywności PGI_2 [9]. Tak jest również w dysfunkcji śródbłonna płucnego. U pacjentów z nadciśnieniem płucnym stężenie stabilnego metabolitu prostacykliny 6-keto- $PGF1\alpha$ w moczu jest zmniejszone, a wytwarzanie TXB_2 jest zwiększone [71]. Stwierdzono też, że nadekspresja syntazy prostacykliny w tętniczkach płucnych jest zmniejszona [72]. Z drugiej strony inhibitory cyklooksygenazy, a zwłaszcza selek-

tywne inhibitory COX-2 (która jest głównym źródłem PGI₂ w ustroju), mogą nasilać patologię nadciśnienia płucnego [73]. Podobnie więc jak w dysfunkcji śródbłonka w krążeniu systemowym, niewystarczająca śródbłonkowa produkcja prostacykliny niesie ze sobą nadmierną aktywację płytek krwi, zwiększone wytwarzanie płytkowego TXA₂ i prozakrzepowe tego konsekwencje. Opisano również, że aktywowane płytki krwi uwalniają mikrocząstki, a te, wykorzystując śródbłonkowy kwas arachidonowy (a nie PGH₂ [74]), syntetyzują dodatkowe ilości TXA₂ [75], wzmacniając prozakrzepowe skutki upośledzonego wydzielania PGI₂.

W modelu zwierzęcym genetyczne pozbawienie myszy receptora dla prostacykliny (IP) związane jest z ogromnym nasileniem rozwoju nadciśnienia płucnego [76]. Z kolei selektywna ograniczona do krążenia płucnego nadekspresja syntazy prostacykliny u myszy chroni przed rozwojem nadciśnienia płucnego wywołanego przez przewlekłe niedotlenienie [77].

Nie są znane mechanizmy prowadzące do niewydolności śródbłonkowej produkcji PGI₂ w nadciśnieniu płucnym. W dysfunkcji śródbłonka systemowego syntaza PGI₂ zostaje unieczynniona przez nitrację tyrozyny w centrum aktywnym enzymu [78]. Czyni to ONOO⁻ powstający w jednej z najszybszych znanych reakcji w układach biologicznych pomiędzy NO i O₂⁻ [79]. Istnieją dowody na to, że w dysfunkcji śródbłonka płucnego produkcja O₂⁻ jest zwiększona. Źródłem O₂⁻ może być oksydaza NADPH [80], rozprężona syntaza NO (NOS-3) [81] lub oksydaza ksantynowa [82]. Pozostaje do wyjaśnienia, czy powstający w toku nadciśnienia płucnego ONOO⁻ prowadzi do nitracji syntazy PGI₂ tak jak to dzieje się w krążeniu systemowym na przykład w cukrzycy. Być może do upośledzenia wydzielania PGI₂ przez śródbłonek płucny prowadzą inne mechanizmy.

Już w 1980 r. podjęto pierwsze próby leczenia nadciśnienia płucnego przez dożylnie podawanie PGI₂ [83]. Dzisiejsza terapia substytucyjna PGI₂ polega na dożylnym (epoprostenol), podskórnym (teprostynil), doustnym (beraprost), a przede wszystkim wziewnym (iloprost) podawaniu analogów PGI₂ [11, 56]. Sugeruje się większe korzyści terapeutyczne dla analogów PGI₂ niż NO podawanego wziewnie [11, 56, 84]. Istnieje coraz więcej prac opisujących profil farmakologicznego działania analogów PGI₂ u pacjentów z nadciśnieniem płucnym; niektóre z nich cytowano powyżej [11, 39, 55, 66]. Warto jeszcze dodać, że PGI₂ i jej analogi, podobnie jak NO, zmniejszają aktywność ET-1 *in vitro* i w nadciśnieniu płucnym [11, 85-87].

Inhibitory fosfodiesterazy (PDE)

Istnieje co najmniej 11 izoenzymów PDE. Z punktu widzenia farmakologii nadciśnienia płucnego interesu-

jące są jednak tylko 3 z nich: PDE3, PDE4 i PDE5. PDE3 i 4 (hamowane przez odpowiednio: motapizon, roli-
pram) są nakierowane przede wszystkim na rozkład cAMP [88], natomiast PDE5 (występująca przede wszystkim w tkance płucnej, selektywnie hamowana przez sildenafil [89, 90]) jest enzymem o wysokiej specyficzności do cGMP [91]. W nadciśnieniu płucnym ekspresja PDE3 i PDE5 w mięśniach gładkich naczyń płucnych rośnie [49, 92]. Ciekawe, że aktywność PDE3 zależy od cGMP i w ten sposób od aktywności PDE5 [93, 94]. Do grupy inhibitorów PDE dołączają coraz to nowe leki (głównie ze względu na swoje działanie pozapłucne), jednak najwięcej danych dotyczących nadciśnienia płucnego opisano dla sildenafilu. Jest on już dziś stosowany w monoterapii lub w połączeniu z wziewnym NO oraz w połączeniu z bosentanem [11, 95]. W modelach zwierzęcych nadciśnienia płucnego sildenafil podnosi cGMP w osoczu, hamuje rozwój nadciśnienia płucnego, przerost prawej komory [90], zmniejsza patologiczny przerost mięśniówki naczyniowej [38], pozostając bez wpływu na ciśnienie obwodowe [54].

Równie obiecujący profil terapeutyczny mają inhibitory PDE3/PDE4 (tolafentryna), które w zwierzęcych modelach nadciśnienia płucnego potęgują korzystne działanie PGI₂ [94], oraz zmniejszają ekspresję metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej MMP-2 i MMP-9 i hamują przerost prawej komory [96].

Endotelina 1 (ET-1)

ET-1 jest najsilniejszym znanym przekaźnikiem naczynioskurczowym ustroju. Jej odkrycie w 1988 r. [97], niedługo po identyfikacji EDRF jako NO, wywołało zdumienie. Nie dawano wiary, że śródbłonek może produkować tak silny przekaźnik kurczący naczynia krwionośne. ET-1, która jest peptydem 21-aminokwasowym, jest wytwarzana przez śródbłonek jako big-endotelina i dopiero pod wpływem działania konwertazy endoteliny przekształca się do ET-1 [98]. ET-1 wywołuje efekty przez dwa rodzaje receptorów: ET_A i ET_B. Oba receptory są zlokalizowane w mięśniówce gładkiej naczyń, a ich aktywacja prowadzi do zależnego od fosfolipazy C (PLC) wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia [98] i skurczu komórki mięśniowej gładkiej [99]. Z drugiej strony receptor ET_B znajduje się na śródbłonku i jego aktywacja pobudza komórkę śródbłonka do syntezy NO i PGI₂ [100]. Działanie ET-1 mediowane przez receptory ET_B może więc mieć znaczenie w endogennej modulacji naczynioskurczowego, promitotycznego [101], prozapalnego i prozakrzepowego działania ET-1, wywieranego przez receptory ET_A, ale również w unieczynnianiu ET-1 [102-104].

W nadciśnieniu płucnym obserwuje się zwiększoną ekspresję ET-1 [105, 106], co więcej – istnieje korelacja

między poziomem ET-1 we krwi a występowaniem zmian patologicznych i progresją choroby. Poziom ET-1 we krwi stanowi więc dobry marker postępu tego schorzenia [107, 108]. Nie są znane dokładne mechanizmy prowadzące do zwiększonej aktywności ET-1 w nadciśnieniu płucnym. Sugeruje się aktywację konwersji big-ET do ET-1 [99], wzrost produkcji ET-1, jak również upośledzenie unieczynniania ET-1 [109].

Istnieje wiele dowodów z doświadczalnych modeli nadciśnienia płucnego, potwierdzających kluczową rolę receptora ET_A i ochronną rolę receptora ET_B w patogenezie nadciśnienia płucnego. W szczurzym modelu nadciśnienia płucnego selektywny antagonist receptoru ET_A BQ-123 bardzo skutecznie hamuje rozwój nadciśnienia płucnego, przerost prawej komory i chroni przed patologicznym przerostem mięśniówki gładkiej naczyń płucnych [110], podczas gdy selektywny antagonist receptoru ET_B (ABT-627) zaostrza przebieg choroby [111]. O pneumoprotekcyjnej roli śródbłonkowego receptora ET_B świadczy również fakt, że myszy genetycznie pozbawione receptora ET_B (co prowadziło do upośledzenia śródbłonkowego wydzielania NO i PGI₂) rozwijały cięższe nadciśnienie płucne z większym przerostem prawej komory, mniejszym wyrzutem sercowym, większymi oporami przepływu, 5-krotnie większym stężeniem ET-1 w osoczu, większą ekspresją konwertazy endoteliny (ECE) niż myszy posiadające oba podtypy receptora dla ET-1 [112, 113]. Nie ma jednak jak dotąd wystarczających dowodów na to, że selektywne blokowanie receptora ET_A jest skuteczniejsze niż nieselektywne blokowanie receptora ET_A i ET_B. Nie ma jednak wątpliwości, że nieselektywny antagonist receptorów ET_A/ET_B, Ro 47-0203 (bosentan), hamuje rozwój nadciśnienia płucnego w modelach doświadczalnych [114]. Bosentan ma szerokie zastosowanie również u pacjentów z nadciśnieniem płucnym i wiele jest dowodów przemawiających za jego skutecznością kliniczną. Warto dodać, że coraz większe znaczenie zyskuje preferencyjny antagonist receptoru ET_A: sitaksentran, który wykazuje 6 000-krotnie większe powinowactwo do ET_A niż do ET_B [11]. Dane kliniczne dotyczące selektywnych antagonistów ET_A (ambrisentan) są jednak jeszcze ciągle niepełne [115].

Płytki krwi

Od dawna sugeruje się, że aktywowana płytka krwi jest ważnym elementem w odpowiedzi naczyń krwionośnych na uraz. Ta hipoteza, zasugerowana po raz pierwszy przez Ross i wsp. w kontekście patogenezy miażdżycy [116], nabiera szczególnego znaczenia w nadciśnieniu płucnym. Aktywowane płytki są bowiem ważnym źródłem mediatorów naczynioskurczowych, prozakrzepowych (TXA₂, serotonina (5-HT)), a także czynników wzrostowych (VEGF, PDGF – *platelet-derived growth factor*, TGF_β – *transforming growth factor*),

mających udział w przebudowie ściany naczyń płucnych [117]. Istotnie inhibitory syntazy TXA₂/antagoniści receptora TP są skuteczne w zwierzęcych modelach nadciśnienia płucnego [118]. Sugeruje się też powiązania między stosowaniem leków wpływających na mechanizmy serotoninergiczne a nadciśnieniem płucnym, bowiem zaburzenia płytkowego wychwytu serotoniny i nadmierne pobudzenie receptora 5HT_{2B} mogą prowadzić do patologicznej proliferacji śródbłonka i naczyń płucnych, a w konsekwencji do rozwoju nadciśnienia płucnego [119–121]. Istotnie nordeksenfluramina, agonista receptora 5-HT_{2B}, wywołuje nadciśnienie płucne [121].

Ostatnio pojawiają się bardzo ciekawe prace dotyczące udziału płytkowych czynników wzrostu w przebudowie naczyń w nadciśnieniu płucnym. Aktywowane płytki krwi uwalniają VEGF, PDGF, TGF_β. Sugeruje się, że VEGF i TGF_β mają udział w patologicznej proliferacji komórek śródbłonka, natomiast PDGF, ale także TGF_β aktywują proliferację fibroblastów oraz komórek mięśni gładkich [122, 123]. Antagonista receptora PDGF, NX1975 zmniejsza patologiczny przerost naczyń płucnych w nadciśnieniu płucnym [124]. Uwalnianie PDGF przez płytki jest również hamowane przez PGI₂ lub jej analogi [122].

Istnieją również inne zależne od płytek krwi mechanizmy, które mogą przyczyniać się do patologicznej przebudowy naczyń płucnych. Płytki krwi są głównym źródłem sCD40L [3]. Kompleks sCD40L-CD40 stymuluje wydzielanie MCP-1, IL-8 przez komórki śródbłonka naczyń płucnych oraz syntezę czynnika tkankowego [125]. MCP-1 jest ważnym przekaźnikiem w odpowiedzi zapalnej śródbłonka w rozwoju nadciśnienia płucnego, ponieważ zahamowanie jego aktywności hamuje rozwój nadciśnienia płucnego [126].

Uwalnianie sCD40L z płytki krwi nie jest hamowane przez PGI₂, lecz przez antagonistów receptora GPIIb/IIIa (abciximab, infliximab), niestosowanych w terapii nadciśnienia płucnego [127]. Wydaje się, że brak wpływu PGI₂ na sCD40L może tłumaczyć niepełną skuteczność monoterapii PGI₂.

Podsumowując, aktywowane płytki krwi przez wiele mechanizmów zależnych od czynników wzrostu, TXA₂, 5-HT i sCD40L mogą przyczyniać się do patologii nadciśnienia płucnego. Zaskakujące, że leki przeciwplatekcyjne nie są standardem leczenia nadciśnienia płucnego. Być może klasyczne leki przeciwplatekcyjne, których zastosowanie w leczeniu *atherothrombosis* jest nie do przecenienia, nie wpływają na te płytkowe mechanizmy mające znaczenie w patologii nadciśnienia płucnego. Z drugiej strony, być może, badacze nadciśnienia płucnego poświęcają zbyt mało uwagi roli płytek krwi w rozwoju i progresji nadciśnienia płucnego.

Podsumowanie

Główny nurt rozwoju farmakoterapii nadciśnienia płucnego ogniskuje się wokół trzech mediatorów śródbłonna naczyń płucnych: NO, PGI₂, ET-1. Korekcja zaburzeń ich czynności stanowi podstawę współczesnego leczenia nadciśnienia płucnego, opierającego się na kombinacjach leków naśladujących działanie NO, PGI₂ lub/i hamujących działanie ET-1. Istnieją jednak możliwości jednoczesnej korekcji czynności tych trzech mediatorów przez inne leki o śródbłonkowym profilu działania, takie jak np. statyny. Istotnie statyny (inhibitory reduktazy 3-hydroksy-metyloglutarylo-CoA) [128], wprowadzone do medycyny jako leki hipolipemizujące, ujawniają ostatnio szerokie spektrum działań plejotropowych na śródbłonek i inne komórki układu sercowo-naczyniowego [129-132]. Działanie śródbłonkowe statyn obejmuje zwiększenie wydzielania NO i PGI₂ oraz obniżenie aktywności ET-1 [133-139] i te efekty działania statyn warunkują ich skuteczność w modelach zwierzęcych nadciśnienia płucnego. Być może ten śródbłonkowy mechanizm działania statyn stanowi też wyjaśnienie dla efektywności simwastatyny u ludzi z nadciśnieniem płucnym [140].

Inhibitory konwertazy angiotensyny (ACE-I) posiadają podobne do statyn, szerokie spektrum działania na śródbłonek i podobnie jak statyny, ich działanie obejmuje zwiększenie aktywności biologicznej NO i PGI₂ oraz zmniejszenie aktywności ET-1 [9]. Jednak dowody na ich skuteczność w nadciśnieniu płucnym nie są przekonujące i nie ma miejsca na ich zastosowanie we współczesnych standardach farmakoterapii nadciśnienia płucnego [11].

Obok statyn i ACE-I jest wiele innych leków śródbłonkowych, które mogłyby mieć znaczenie w farmakologii śródbłonna w nadciśnieniu płucnym [60]. Wśród nich obiecujący profil w modelach doświadczalnych nadciśnienia płucnego rysuje się dla agonistów PPAR_γ, inhibitorów oksydazy ksantynowej, inhibitorów FLAP (5-lipoxygenase-activating protein), antagonistów receptorów leukotrienowych, agonistów receptora B₂, peptydów natriuretycznych [34, 96, 139, 141-146].

Na przestrzeni kilku lat zmieniły się zasady terapii nadciśnienia płucnego: od postępowania objawowego, poprzez leki naczyniorozszerzające, do farmakologii śródbłonna. Ten ostatni etap rysuje też ciekawe dalsze perspektywy wykraczające poza modulację czynności NO, PGI₂ i ET-1.

Piśmiennictwo

- Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109: 159-65.
- Braunwald E, Zipes DP, Libby P (eds). Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. W. B. Saunders Company, Philadelphia 2001.
- Damas JK, Otterdal K, Yndestad A, et al. Soluble CD40 ligand in pulmonary arterial hypertension: possible pathogenic role of the interaction between platelets and endothelial cells. *Circulation* 2004; 110: 999-1005.
- Cella G, Bellotto F, Tona F, et al. Plasma markers of endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 120: 1226-30.
- Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 70-5.
- Humbert M, Monti G, Brenot F, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension (abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1628-31.
- Dorfmueller P, Zarka V, Durand-Gasselin I, et al. Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 534-9.
- Fartoukh M, Emilie D, Le Gall C, et al. Chemokine Macrophage Inflammatory Protein-1α mRNA Expression in Lung Biopsy Specimens of Primary Pulmonary Hypertension. *Chest* 1998; 114: 505-515.
- Chłopicki S. Farmakologia śródbłonna w atherothrombosis. *Kardiologia po Dyplomie* 2005; 4: 60-8.
- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004; 351: 1425-36.
- Badesch DB, Abman SH, Ahearn GS, et al. American College of Chest Physicians. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2004; 126 (1 Suppl.): 355-62S.
- Humbert M, Barst RJ, Robbins IM, et al. Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: BREATHE-2. *Eur Respir J* 2004; 24: 353-9.
- Zhang X, Hintze TH. Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation* 1998; 97: 576-80.
- Dhein S, Zhao Y, Simsek S, et al. Actions of 1,4-dihydropyridines in isolated mesenteric vascular beds (abstract). *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: 784-91.
- Brovkovych V, Kalinowski L, Müller-Peddinghaus R, et al. Synergistic antihypertensive effects of nifedipine on endothelium. Concurrent release of NO and scavenging of superoxide. *Hypertension* 2001; 37: 34-9.
- Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004; 351: 1655-65.
- Newman JH, Fanburg BL, Archer SL, et al. Pulmonary arterial hypertension: future directions: report of a National Heart, Lung and Blood Institute/Office of Rare Diseases workshop. *Circulation* 2004; 109: 2947-52.
- Runo JR, Loyd JE. Primary Pulmonary Hypertension. *Lancet* 2003; 361: 1533-44.
- Demiryurek AT, Karamsetty MR, McPhaden AR, et al. Accumulation of nitrotyrosine correlates with endothelial NO synthase in pulmonary resistance arteries during chronic hypoxia in the rat. *Pulm Pharmacol Ther* 2000; 13: 157-65.
- Nakazawa H, Hori M, Ozaki H, et al. Mechanisms underlying the impairment of endothelium-dependent relaxation in the pulmonary artery of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1098-104.

21. Le Cras TD, Tyler RC, Horan MP, et al. Effects of chronic hypoxia and altered hemodynamics on endothelial nitric oxide synthase expression in the adult rat lung. *J Clin Invest* 1998; 101: 795-801.
22. Igari H, Tatsumi K, Sugito K, et al. Role of EDRF in pulmonary circulation during sustained hypoxia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 299-305.
23. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333: 214-21.
24. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension* 2001; 37: 322-7.
25. Steudel W, Ichinose F, Huang PL, et al. Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) gene. *Circ Res* 1997; 81: 34-41.
26. Cooper CJ, Landzberg MJ, Anderson TJ, et al. Role of nitric oxide in the local regulation of pulmonary vascular resistance in humans. *Circulation* 1996; 93: 266-71.
27. Tuder RM, Chacon M, Alger L, et al. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis (abstract). *J Pathol* 2001; 195: 367-74.
28. He H, Venema VJ, Gu X, et al. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 1999; 274: 25130-5.
29. Gao Y, Dhanakoti S, Tolsa JF, et al. Role of protein kinase G in nitric oxide- and cGMP-induced relaxation of newborn ovine pulmonary veins. *J Appl Physiol* 1999; 87: 993-8.
30. Komalavilas P, Shah PK, Jo H, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 34301-9.
31. Sauzeau V, Jeune HL, Cario-Toumaniantz C, et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 2000; 275: 21722-9.
32. Lim I, Yun J, Kim S, et al. Nitric Oxide Stimulates a Large-Conductance Ca-Activated K (+) Channel in Human Skin Fibroblasts through Protein Kinase G Pathway. *Skin Pharmacol Physiol* 2005; 18: 279-87.
33. Triggie CR, Hollenberg M, Anderson TJ, et al. The endothelium in health and disease – a target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res* 2003; 39: 249-67.
34. Ameshima S, Golpon H, Cool CD, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression is decreased in pulmonary hypertension and affects endothelial cell growth. *Circ Res* 2003; 92: 1162-9.
35. Mason NA, Springall DR, Burke M, et al. High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *J Pathol* 1998; 185: 313-8.
36. Pilz RB, Casteel DE. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 2003; 93: 1034-46.
37. Wennerberg K, Ellerbroek SM, Liu RY, et al. RhoG signals in parallel with Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* 2002; 277: 47810-7.
38. Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Lehoux S, et al. Sildenafil prevents change in RhoA expression induced by chronic hypoxia in rat pulmonary artery. *Circ Res* 2003; 93: 630-7.
39. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, et al. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 2004; 94: 385-93.
40. Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, et al. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4202-8.
41. Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, et al. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem* 1999; 274: 14368-75.
42. Yang J, Wu J, Jiang H, et al. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem* 2002; 277: 46035-42.
43. Mendelsohn ME, O'Neill S, George D, et al. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *J Biol Chem* 1990; 265: 19028-34.
44. Polte T, Abate A, Dennery PA, et al. Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1209-15.
45. Li QF, Dai AG. Hypoxia inducible factor-1 alpha correlates the expression of heme oxygenase 1 gene in pulmonary arteries of rat with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Acta Biochim Biophys Sin* 2004; 36: 133-40.
46. Stanford SJ, Walters MJ, Hislop AA, et al. Heme oxygenase is expressed in human pulmonary artery smooth muscle where carbon monoxide has an anti-proliferative role. *Eur J Pharmacol* 2003; 473: 135-41.
47. Smith AP, Demoncheaux EA, Higenbottam TW. Nitric oxide gas decreases endothelin-1 mRNA in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Nitric Oxide* 2002; 6: 153-9.
48. Steinhorn RH, Russell JA, Lakshminrusimha S, et al. Altered endothelium-dependent relaxations in lambs with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 2001; 280: 311-7.
49. Black SM, Fineman JR, Steinhorn RH, et al. Altered molecular expression of nitric oxide synthase in a lamb model of increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 275: H1643-51.
50. Khoo JP, Zhao L, Alp NJ, et al. Pivotal role for endothelial tetrahydrobiopterin in pulmonary hypertension. *Circulation* 2005; 111: 2126-33.
51. Wei B, Du J, Li J, et al. The modulating effect of L-arginine on collagen metabolism of pulmonary artery in pulmonary hypertension induced by a left-to-right shunt. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 1273-5.
52. Sasaki S, Asano M, Ukai T, et al. Nitric oxide formation and plasma L-arginine levels in pulmonary hypertensive rats. *Respir Med* 2004; 98: 205-12.
53. Wodniecki J, Jachec W, Poloński L, et al. Sildenafil reduces pressure and pulmonary resistance and increases susceptibility of pulmonary arteries to nitric oxide in primary pulmonary arterial hypertension. *Przegl Lek* 2005; 62: 135-8.
54. Sebki A, Strange JW, Phillips SC, et al. Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003 Jul 1; 107 (25): 3230-5.

55. Ichinose F, Roberts JD Jr, Zapol WM. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential. *Circulation* 2004 Jun 29; 109 (25): 3106-11.
56. Galie N, Torbicki A, Barst R. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25: 2243-78.
57. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263: 663-5.
58. Gryglewski RJ, Bunting S, Moncada S, et al. Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides. *Prostaglandins* 1976; 12: 685-713.
59. Gryglewski RJ, Korbut R, Ocetkiewicz A. Generation of prostacyclin by lungs in vivo and its release into the arterial circulation. *Nature* 1978; 273: 765-7.
60. Chłopicki S. Zapalenie śródbłonna w atherothrombosis. *Kardiologia po Dyplomie* 2005; 4: 77-88.
61. Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res* 2001; 89: 650-60.
62. Clapp LH, Finney P, Turcato S, et al. Differential effects of stable prostacyclin analogs on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 194-201.
63. Zardi EM, Zardi DM, Cacciapaglia F, et al. Endothelial dysfunction and activation as an expression of disease: role of prostacyclin analogs. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 437-59.
64. Gryglewski RJ, Chłopicki S, Uracz W, et al. Significance of endothelial prostacyclin and nitric oxide in peripheral and pulmonary circulation. *Med Sci Monit* 2001; 7: 1-16.
65. Muller AM, Skrzynski C, Skipka G, et al. Expression of von Willebrand factor by human pulmonary endothelial cells in vivo. *Respiration* 2002; 69: 526-33.
66. Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, et al. Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 2000; 102: 2720-5.
67. Kainoh M, Maruyama I, Nishio S, et al. Enhancement by beraprost sodium, stable analogue of prostacyclin, in the thrombomodulin expression on membrane surface of cultured endothelial cells via increase in cyclic AMP level. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 1135-40.
68. Lopes AA, Maeda NY, Goncalves RC, et al. Endothelial cell dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary pulmonary hypertension. *Am Heart J* 2000; 139: 618-23.
69. Sun D, Huang A, Smith CJ, et al. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circ Res* 1999; 85: 288-93.
70. Puybasset L, Bea ML, Ghaleb B, et al. Coronary and systemic hemodynamic effects of sustained inhibition of nitric oxide synthesis in conscious dogs: evidence for cross talk between nitric oxide and cyclooxygenase in coronary vessels. *Circ Res* 1996; 79: 343-57.
71. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327: 70-5.
72. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1925-32.
73. Pidgeon GP, Tamosiuniene R, Chen G, et al. Intravascular thrombosis after hypoxia-induced pulmonary hypertension: regulation by cyclooxygenase-2. *Circulation* 2004; 110: 2701-7.
74. Gryglewski RJ. Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pol J Pharmacol* 1999; 51: 113-7.
75. Pfister SL. Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension* 2004; 43: 428-33.
76. Hoshikawa Y, Voelkel NF, Gesell TL, et al. Prostacyclin receptor-dependent modulation of pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 314-8.
77. Geraci MW, Gao B, Shepherd DC, et al. Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1999; 103: 1509-15.
78. Zou M, Jendral M, Ullrich V. Prostaglandin endoperoxide-dependent vasospasm in bovine coronary arteries after nitration of prostacyclin synthase. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 1283-92.
79. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-4.
80. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97: 1916-23.
81. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 998-1005.
82. White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, et al. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8745-9.
83. Borchert J, Franke J, Lichey J. Reduction of acute pulmonary hypertension by prostacyclin. *Cor Vasa* 1980; 22: 281-7.
84. Hoepfer MM, Olschewski H, Ghofrani HA, et al. A comparison of the acute hemodynamic effects of inhaled nitric oxide and aerosolized iloprost in primary pulmonary hypertension. German PPH study group. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 176-82.
85. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 296-302.
86. Wort SJ, Woods M, Warner TD, et al. Cyclooxygenase-2 acts as an endogenous brake on endothelin-1 release by human pulmonary artery smooth muscle cells: implications for pulmonary hypertension. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1147-53.
87. Prins B, Hu RM, Nazario B, et al. Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 11938-44.
88. Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995; 75: 725-48.

89. Ghofrani HA, Voswinckel R, Reichenberger F, et al. Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1488-96.
90. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 39-45.
91. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, et al. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res* 2003; 93: 280-91.
92. Wagner RS, Smith CJ, Taylor AM, Rhoades RA. Phosphodiesterase inhibition improves agonist-induced relaxation of hypertensive pulmonary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 1650-7.
93. Giordano D, De Stefano ME, Citro G, et al. Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1539: 16-27.
94. Schermuly RT, Roehl A, Weissmann N, et al. Subthreshold doses of specific phosphodiesterase type 3 and 4 inhibitors enhance the pulmonary vasodilatory response to nebulized prostacyclin with improvement in gas exchange. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 512-20.
95. Wilkins MR, Paul GA, Strange JW, et al. Sildenafil versus Endothelin Receptor Antagonist for Pulmonary Hypertension (SERAPH) study. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1292-7.
96. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, et al. Antiremodeling effects of iloprost and the dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor tolfenetrine in chronic experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 2004; 94: 1101-8.
97. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells (abstract). *Nature* 1988; 332: 411-5.
98. Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 227-37.
99. Lal H, Yu Q, Ivor Williams K, et al. Hypoxia augments conversion of big-endothelin-1 and endothelin ET (B) receptor-mediated actions in rat lungs. *Eur J Pharmacol* 2000; 402: 101-10.
100. Benigni A, Remuzzi G. Endothelin antagonists. *Lancet* 1999; 353: 133-8.
101. Alberts GF, Peifley KA, Johns A, et al. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J Biol Chem* 1994; 269: 10112-8.
102. Touyz RM, Schiffrin EL. Effects of angiotensin II and endothelin-1 on platelet aggregation and cytosolic pH and free Ca²⁺ concentrations in essential hypertension. *Hypertension* 1993; 22: 853-62.
103. Ruetten H, Thiemeermann C. Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 675-88.
104. Browatzki M, Schmidt J, Kubler W, et al. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: 98-105.
105. Li H, Chen SJ, Chen YF, et al. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 1994; 77: 1451-9.
106. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328: 1732-9.
107. Bressollette E, Dupuis J, Bonan R, et al. Intravascular ultrasound assessment of pulmonary vascular disease in patients with pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 120: 809-15.
108. Collados MT, Velazquez B, Borbolla JR, et al. Endothelin-1 and functional tissue factor: a possible relationship with severity in primary pulmonary hypertension. *Heart Vessels* 2003; 18: 12-7.
109. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1993; 328: 1732-9.
110. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993; 73: 887-97.
111. Nishida M, Eshiro K, Okada Y, et al. Roles of endothelin ET_A and ET_B receptors in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44: 187-91.
112. Ivy DD, McMurtry IF, Colvin K, et al. Development of occlusive neointimal lesions in distal pulmonary arteries of endothelin B receptor-deficient rats: a new model of severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005; 111: 2988-96.
113. Ivy DD, Yanagisawa M, Garipey CE, et al. Exaggerated hypoxic pulmonary hypertension in endothelin B receptor-deficient rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L703-12.
114. Hill NS, Warburton RR, Pietras L, et al. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1997; 83: 1209-15.
115. Galie N, Badesch D, Oudiz R, et al. Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 529-35.
116. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138: S419-20.
117. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43 (12 Suppl. S): 13S-24S.
118. Nagata T, Uehara Y, Hara K, et al. Thromboxane inhibition and monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respirology* 1997; 2: 283-9.
119. Welsh DJ, Harnett M, MacLean M, et al. Proliferation and signalling in fibroblasts: role of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor and transporter. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 252-9.
120. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, et al. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2001; 108: 1141-50.
121. Launay JM, Herve P, Peoc'h K, et al. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 2002; 8: 1129-35.
122. Eddahibi S, Humbert M, Sediame S, et al. Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension. Effect of prostacyclin therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1493-9.

123. Li ZD, Bork JP, Krueger B, Patsenker E, et al. VEGF induces proliferation, migration, and TGF-beta1 expression in mouse glomerular endothelial cells via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 1049-60.
124. Balasubramaniam V, Le Cras TD, Ivy DD, et al. Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L826-33.
125. Andre P, Prasad KS, Denis CV, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med* 2002; 8: 247-52.
126. Ikeda Y, Yonemitsu Y, Kataoka C, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H2021-8.
127. Furman MI, Krueger LA, Linden MD, et al. Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization (abstract). *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 2319-25.
128. Tobert JA. New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase. *Circulation* 1987; 76: 534-8.
129. Laufs U, Marra D, Node K, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27 (Kip1). *J Biol Chem* 1999; 274: 21926-31.
130. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 1996; 348: 1079-82.
131. Takai Y, Sasaki T, and Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81: 153-208.
132. Takemoto M and Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1712-9.
133. Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL, et al. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation* 2003; 108: 1640-5.
134. Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, et al. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1403-8.
135. Girgis RE, Li D, Zhan X, et al. Attenuation of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H938-45.
136. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Soria E, et al. Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. *Circ Res* 2000; 87: 616-22.
137. Xu CB, Stenman E, Edvinsson L. Reduction of bFGF-induced smooth muscle cell proliferation and endothelin receptor mRNA expression by mevastatin and atorvastatin. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 497-505.
138. Degraeve F, Bolla M, Blaie S, et al. Modulation of COX-2 expression by statins in human aortic smooth muscle cells. Involvement of geranylgeranylated proteins. *J Biol Chem* 2001; 276: 46849-55.
139. Hoshikawa Y, Ono S, Suzuki S, et al. Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1299-306.
140. Kao PN. Simvastatin treatment of pulmonary hypertension: an observational case series. *Chest* 2005; 127: 1446-52.
141. Matsuda Y, Hoshikawa Y, Ameshima S, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Nihon Kogyoku Gakkai Zasshi* 2005; 43: 283-8.
142. Itoh T, Nagaya N, Murakami S, et al. C-type natriuretic peptide ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1204-11.
143. Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Stewart JM, et al. Treatment of severe pulmonary hypertension: a bradykinin receptor 2 agonist B9972 causes reduction of pulmonary artery pressure and right ventricular hypertrophy. *Peptides* 2005; 26: 1292-300.
144. Voelkel NF, Tuder RM, Wade K, et al. Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) reduces pulmonary vascular reactivity and pulmonary hypertension in hypoxic rats. *J Clin Invest* 1996; 97: 2491-6.
145. Morganroth ML, Reeves JT, Murphy RC, et al. Leukotriene synthesis and receptor blockers block hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 1984; 56: 1340-6.
146. Schreiber MD, Heymann MA, Soifer SJ. Leukotriene inhibition prevents and reverses hypoxic pulmonary vasoconstriction in newborn lambs. *Pediatr Res* 1985; 19: 437-41.

Nieoczekiwane niepowodzenia prób klinicznych z antyoksydantami

Unexpected failure of antioxidant clinical trials

Tomasz H. Wierzba

Katedra i Zakład Fizjologii, Akademia Medyczna, Gdańsk

Streszczenie

W pracy skonfrontowano wnioski z licznych badań eksperymentalnych, sugerujących korzyści ze stosowania antyoksydantów, z wynikami prób klinicznych i metaanaliz opartych na tych próbach, które tych korzyści nie potwierdziły. Wyszczególniono główne kierunki działania reaktywnych postaci tlenu (ROS) i sposoby działania antyoksydantów, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnych mechanizmów, przez które antyoksydanty mogą zakłócać funkcjonowanie ustroju. Przedmiotem rozważań były regulacyjne aspekty działania ROS i możliwości zaburzenia homeostazy przez nadmiar antyoksydantów oraz perspektywiczne kierunki poszukiwań badawczych nad praktycznym wykorzystaniem antyoksydantów.

Słowa kluczowe: reaktywne postaci tlenu, antyoksydanty, próby kliniczne, metaanaliza, regulacja, tokoferol, kwas askorbinowy

Abstract

Data from a variety of experimental studies suggesting benefits of the antioxidant supplementation were confronted with those from clinical trials and large metaanalyses which have failed to prove those benefits. Major directions of the biological effects of reactive oxygen species (ROS) and antioxidants were specified. In particular, plausible mechanisms through antioxidants may disturb physiological functions were discussed. The regulatory aspects of ROS potency, and the ways antioxidants may disturb homeostasis were taken particularly into account. Directions of prospective research towards practical use of antioxidants were suggested.

Key words: reactive oxygen species, antioxidants, clinical trials, metaanalysis, regulation, tocoferol, ascorbic acid

Kardiologia Polska 2005; 63 (Supl. 2): 472-482

Postaci tlenu występujące w układach biologicznych

Od chwili odkrycia przez Priestleya w 1774 r., tlen przykuwa uwagę badaczy jako pierwiastek życiodajny. Priestley zanotował, że oddychanie czystym tlenem wywołuje przyjemne doznania oraz wywnioskował – jak się później okazało niesłusznie – że przedłuża czas życia myszy.

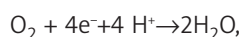
Tlen jest łatwo dostępnym akceptorem elektronów warunkującym uwalnianie energii zawartej w substratach pokarmowych i jej wykorzystywanie przez organizmy przystosowane do funkcjonowania w jego środowisku. Tlen w stanie podstawowym (tlen trypletowy) jest pierwiastkiem stosunkowo mało reaktywnym ze

względem na swoistą konfigurację dwóch zewnętrznych elektronów, które nie posiadają wzajemnych odpowiedników o przeciwnym spinie (kierunku obrotu wokół własnej osi), a mała reaktywność takiej cząsteczki wynika z niewielkiego prawdopodobieństwa napotkania partnera reakcji. Cząsteczka, którą może utlenić tlen w stanie podstawowym, czyli innymi słowy pobrać od tej cząsteczki dwa elektrony, powinna, w myśl zasad mechaniki kwantowej, posiadać także dwa niesparowane elektrony o spinach skierowanych przeciwnie względem dwóch zewnętrznych elektronów cząsteczki tlenu [1]. Większość molekuł występujących w przyrodzie ma sparowane elektrony, dlatego nie reaguje z tlenem w stanie podstawowym. Znacznie większą reak-

Adres do korespondencji:

Tomasz Wierzba, Katedra i Zakład Fizjologii, Akademia Medyczna, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, tel.: +48 58 349 14 75, +48 58 349 15 20, faks: +48 58 349 15 21, e-mail: twierzba@amg.gda.pl

tywnością od cząsteczki tlenu w stanie podstawowym charakteryzują się reaktywne postaci tlenu (*reactive oxygen species* – ROS). ROS stanowią zróżnicowaną grupę cząsteczek. Rodniki tlenowe, takie jak np. anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), rodniki organiczne, w tym rodniki nadtlenukowe (ROO^{\cdot}) są molekułami, które posiadają niesparowany elektron w wyniku niepełnej redukcji cząsteczki w stanie podstawowym. Cząsteczka tlenu w stanie podstawowym ulega standardowo całkowitej redukcji przez przyłączenie 4 elektronów (O_2^{2-}), w reakcji:



której produktem jest woda. Niekiedy jednak w przebiegu reakcji chemicznych cząsteczka tlenu ulega jedynie częściowej redukcji, przyłączając mniej elektronów. Klasycznymi produktami tych przemian są anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) przy jednoelektronowej redukcji cząsteczki O_2 , dwuelektronowej – nadtlenuk wodoru (H_2O_2), zaś trójelektronowej – niezwykle reaktywny rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}). Rodniki tlenowe określane są najczęściej mianem *wolnych rodników tlenowych* (*oxygen free radicals*, OFR). Przymiotnik: *wolny* określający molekułę zdolną do samoistnego istnienia, jest powszechnie używany, ale pod względem semantycznym nic nie wnosi, gdyż nie funkcjonują inne przymiotniki określające rodniki tlenowe. Do ROS należą także cząsteczki, które nie są rodnikami, ale w których w wyniku absorpcji energii doszło do przegrupowania elektronów na niestabilne orbitale o podwyższonej energii. Takimi cząsteczkami, powstającymi powszechnie w organizmach żywych, są np. nadtlenuk wodoru (H_2O_2), anion podchlorynowy ($^{\cdot}OCl$), nadtlenuk azotu ($ONOO^{\cdot}$), tlen singletowy (1O_2). Jakkolwiek określenia: *reaktywne postaci tlenu* i *wolne rodniki tlenowe* nie są synonimami, to określenie *wolnorodnikowy* jest powszechnie stosowane i odnosi się do zjawisk utleniania zachodzących przy udziale dowolnych ROS.

Kierunki działania ROS w ustroju

Z wysoką reaktywnością ROS wiąże się ich zdolność do reagowania z różnymi cząsteczkami, dlatego efekty ROS obserwowane w układach biologicznych są z reguły niespecyficzne. W organizmach żywych ROS reagują ze związkami drobnocząsteczkowymi, białkami, lipidami, DNA i histonami otaczającymi DNA, a także uczestniczą w reakcjach węglowodanów z aminokwasami, białkami oraz z zasadami purynowymi i pirymidynowymi składającymi się na DNA. Utlenienie białek wiąże się często z dekompozycją ich struktury przestrzennej, fragmentacją, agregacją i w rezultacie z utratą właściwości enzymatycznych oraz utratą zdolności do przekazywania sygnałów

w układach biologicznych. Najistotniejszą konsekwencją peroksydacji lipidów są zmiany właściwości fizykochemicznych błon biologicznych. Zazwyczaj dochodzi do obniżenia ich płynności wskutek wysycenia nienasyconych kwasów tłuszczowych [1]. W błonach biologicznych białka wplecione są struktury lipidowe. Zmiany w kompozycji lipidowej błony, wywołane przez peroksydację lipidów, nieuchronnie pociągają za sobą zmiany konformacji sąsiadujących białek i zaburzenia ich funkcji. Efektem wolnorodnikowych uszkodzeń DNA są doraźne lub trwale zakodowane zmiany metabolizmu komórki. DNA mitochondrialne jest znacznie bardziej podatne na uszkodzenia niż jądrowe, z uwagi na stosunkowo nieduży rozmiar i brak ochronnego otoczenia histonów. Oksydacyjne zaburzenia struktury białek mitochondrialnych łańcucha oddechowego, błony mitochondrialnej i mitochondrialnego DNA skutkują upośledzeniem komórkowych przemian energetycznych, mogą również inicjować mechanizmy prowadzące do unicestwienia komórki, zarówno w sposób niekontrolowany, indukowany z zewnątrz (nekroza) [2], jak też zależny od uruchomienia kaskadowych układów programowanej śmierci komórki (apoptoza) [3]. Liczne modelowe badania eksperymentalne wskazują, że większość reakcji wolnorodnikowych prowadzi do destrukcji cząsteczek docelowych, a w skali organizmu do zaburzeń struktury i czynności komórek, tkanek i całego ustroju. Stąd też powszechne przekonanie o szkodliwym wpływie ROS na organizmy żywe i o dużym wpływie ROS na rozwój zjawisk chorobowych, czemu należy przeciwdziałać.

ROS jako czynniki patogenetyczne

Z uwagi na wysoką reaktywność ROS, wielokierunkowość ich działania oraz niezwykle krótki czas istnienia *in vivo* wielu rodników tlenowych, udowodnienie udziału ROS w rozwoju zjawisk chorobowych stwarza zasadnicze trudności. Przypisano udział ROS w rozwoju co najmniej kilkuset chorób i zjawisk chorobowych [1, 4], lecz jedynie w niewielkiej części badań udało się w sposób przekonujący prześledzić łańcuch przyczynowo-skutkowy wiążący ROS z konkretnym mechanizmem patogenetycznym. Postulowane od ponad 50 lat związki przyczynowe między ROS a rozwojem poszczególnych chorób mają niejednokrotnie charakter wybitnie spekulatywny i są często oparte na przesłankach pośrednich, wynikających z oznaczeń produktów przemian wolnorodnikowych w materiale biologicznym lub z *a priori* wydedukowanego modelu rozwoju zjawisk chorobowych w oparciu o przebieg reakcji utleniania opisywanego w prostych układach *in vitro*.

Liczne doniesienia z piśmiennictwa wskazują, że ROS przyczyniają się do rozwoju chorób metabolicznych i ich powikłań narządowych [1, 4], m.in. miażdżycy, cukrzycy, dny moczanowej, alkaptonurii, hemochromatozy,

porfirii, nadczynności tarczycy. W patomechanizmie miażdżycy ROS są obecne na wielu poziomach jej rozwoju [5]. Są czynnikiem dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, uczestniczą w przebiegu odczynu zapalnego w ścianie naczyniowej. Przyczyniają się do powstawania komórek piankowatych zawierających utlenione lipidy. Powodują utlenianie lipoprotein osocza o niskiej gęstości (LDL) i uszkodzenie receptorów dla LDL.

ROS są uznanym czynnikiem chorób neurodegeneracyjnych [6]: stwardnienia zanikowego bocznego, choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, płasawicy Huntingtona, stwardnienia rozsianego, a także uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego wywołanych przez udary, urazy i miejscowe stany zapalne. Wykazano występowanie podwyższonych stężeń markerów lokalnych reakcji utleniania, w przebiegu chorób narządu wzroku: w retinopatiach, zaćmie, jaskrze.

ROS odgrywają rolę w rozwoju niedokrwistości w przebiegu wrodzonych nieprawidłowości metabolizmu krwinek czerwonych [1, 4] oraz w procesach chorobowych, których nieodłączną cechą jest występowanie odczynu zapalnego: infekcyjnych, a także chorób o podłożu autoimmunologicznym. Ważnym elementem chorób o podłożu autoimmunologicznym, a także onkogenezy jest powstawanie oksydacyjnie zmodyfikowanego DNA, które może indukować skierowaną przeciw sobie odpowiedź odpornościową [7].

Rodniki tlenowe są zaangażowane w reakcje skurczowe mięśniówki gładkiej oskrzeli w przebiegu astmy i zapalenia oskrzeli z odczynem spastycznym, w rozdmie płuc i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, w zespole błon szklistych i w mukowiscydozie [1, 4]. Zakres czynników środowiskowych zawartych w wodzie, powietrzu, pokarmach, zdolnych do wywoływania patologicznych reakcji wolnorodnikowych wydaje się w praktyce niemal nieograniczony. Oparzenia, choroba popromienna i wywołane promieniowaniem jonizującym mutacje genowe sprzyjające kancerogenezie i teratogenezie są przykładami zaburzeń wywoływanych czynnikami fizycznymi z udziałem rodników tlenowych [1].

Doświadczenia *in vitro* wskazują, że ROS mogą inicjować cykl komórkowy lub aktywować jego promotory, stymulować ekspresję protoonkogenów, takich jak: c-myc, c-fos, H-ras, mogą też bezpośrednio uszkadzać DNA [8]. Badania kliniczne ujawniły zwiększenie markerów stresu oksydacyjnego, m. in.: metabolitów oksydacyjnego uszkodzenia DNA, produktów utleniania lipidów i prostaglandyn, metalotioneiny, obniżenie stężenia grup tiolowych w białkach u pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową [9]. Dlatego ROS są uznawane za podstawowy czynnik rozwoju nowotworów.

Zgodnie z ogólnie akceptowaną wolnorodnikową teorią starzenia, starzenie jest pochodną akumulacji w orga-

nizmie cząsteczek uszkodzonych przez ROS. Istotnym argumentem przemawiającym za udziałem ROS w procesach starzenia było ujawnienie, że z wiekiem wzrasta stężenie tkankowe i osocze produktów utleniania: lipidów, kwasów nukleinowych, białek, cukrów i steroidów.

ROS są postrzegane jako kluczowy czynnik zaburzeń czynnościowych i strukturalnych wywołanych niedokrwieniem narządów. Podczas niedokrwienia przemiany metaboliczne zostają w znacznej mierze przekierowane na tory beztlenowe, a wytwarzanie i zasoby ATP ulegają dramatycznej redukcji. Po nagłym przywróceniu prawidłowego ukrwienia narządu (reperfuzja) dochodzi do zwiększonej generacji rodników tlenowych, co sprzyja wielokierunkowej destrukcji. Podstawową przyczyną wystąpienia oksydacyjnych zaburzeń w trakcie reperfuzji jest przesterowanie przemian wewnątrzkomórkowych podczas ischemii [10]. Przywrócenie podaży tlenu do mitochondriów, w których kluczowe składniki łańcucha oddechowego są niemal całkowicie zredukowane w następstwie ischemii, jest wzorcowym podłożem do niepełnej redukcji tlenu i generowania w nadmiarze jego reaktywnych postaci.

Udział ROS w dysfunkcji serca

Od niemal 30 lat ROS uważane są za czynnik patogenetyczny zaburzeń czynności serca wywołanych niedokrwieniem oraz w rozwoju zastoinowej niewydolności krążenia, co potwierdził w 2000 r. Ide i wsp., dokonując bezpośrednich pomiarów zwiększonej generacji rodnika hydroksylowego w niewydolnym sercu [11]. Niedawno wykazano, że do zwiększonej generacji wolnych rodników tlenowych dochodzi podczas zawału mięśnia sercowego oraz w rozwoju kardiomiopatii [12-14]. Badania ostatniej dekady wskazują, że ROS mogą indukować zaburzenia rytmu serca [13, 15] oraz że do wzmożonego wytwarzania ROS dochodzi podczas zabiegów kardiologicznych [16]. Reakcje wolnorodnikowe wydają się odgrywać kluczową rolę w reakcjach odrzutu po transplantacji serca [17].

Mechanizmy antyoksydacyjne zabezpieczające przed skutkami nadmiernego utleniania

Organizmy posiadają wielowarstwowe i uzupełniające się systemy zabezpieczające przed nadmiernym utlenianiem, określane mianem mechanizmów obrony antyoksydacyjnej. W ochronie przed nadmiernym utlenianiem istotną rolę odgrywają antyoksydanty (polski termin *przeciwutleniacz* nie jest powszechnie stosowany) – substancje, które w sposób bezpośredni reagują z czynnikami utleniającymi, np. z jonami żelaza Fe²⁺ lub z pośrednimi produktami utleniania, jakimi są rodniki tleno-

we. Przez to ograniczają lub całkowicie uniemożliwiają utlenianie innych molekuł. Niektórzy zaliczają do antyoksydantów również enzymy rozkładające ROS, ale rozszerzenie pojęcia: *antyoksydant* o związki o właściwościach katalitycznych nie zostało powszechnie zaakceptowane [1]. Antyoksydanty, które reagują z rodnikami tlenowymi, prowadząc do ich eliminacji, określa się jako wymiatacze ROS. Wśród czynników obrony antyoksydacyjnej istotną rolę odgrywają substancje drobnocząsteczkowe, m. in. glutation, kwas askorbinowy, cysteina, kwas moczowy, kreatynina, melatonina, tokoferole, w tym witamina E (α -tokoferol), karotenoidy (w tym witamina A), zredukowane postaci koenzymu Q (ubihydrochinon) i kwasu liponowego (tiooktanowego). Grupę związków drobnocząsteczkowych uzupełniają czynniki wchłaniane z diety, takie jak np. antocyjaniny, flawonoidy, kwas fitynowy, karotenoidy (zwłaszcza β -karoten), ksantofile. Wśród związków wielkocząsteczkowych zasadniczą rolę w protekcji antyoksydacyjnej odgrywają białka. Białka spełniają funkcję antyoksydacyjną z jednej strony przez wiązanie jonów metali przejściowych, w tym w szczególności jonów żelaza (Fe^{2+}), co usuwa substrat reakcji Fentona prowadzącej do powstawania niezwykle reaktywnego rodnika hydroksylowego, z drugiej zaś przez enzymatyczne i nieenzymatyczne reakcje z ROS prowadzące do ich eliminacji. Dysmutaza nadadtlenkowa (SOD) usuwa ze swojego otoczenia anionorodnik nadadtlenkowy. Nadtlenek wodoru jest redukowany do wody przez katalazę i peroksydazy, w tym peroksydazę glutationu i peroksydazę cytochromu c.

Z czynnościowego punktu widzenia mechanizmy obrony antyoksydacyjnej można podzielić na trzy grupy: 1) prewencyjne, których istotą jest niedopuszczenie do reakcji ROS ze związkami biologicznie czynnymi, 2) interwencyjne, w wyniku których dochodzi do terminacji (przerwania) niepożądanych reakcji utleniania, w tym łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych oraz 3) eliminujące i naprawcze, polegające na usuwaniu niepożądanych skutków reakcji wolnorodnikowych.

Korzystny wpływ antyoksydantów w zaburzeniach metabolicznych i chorobach przypisywanych szkodliwemu działaniu ROS

Badania doświadczalne wskazują na korzystny wpływ antyoksydantów w modelowych układach stresu oksydacyjnego i w zaburzeniach metabolicznych związanych z ROS. Opisano m.in. ochronny wpływ N-acetylocysteiny na komórki wątrobowe poddane toksycznemu działaniu ksenobiotyków [1], neuroprotekcyjne działanie kwasu moczowego i kwasu liponowego [18, 19], hamowanie utleniania lipoproteidów frakcji LDL (witamina C), hamowanie przez witaminy C i E oraz flawonoidy rozwoju miażdżycy [20], zmniejszenie wykładników stresu

oksydacyjnego w przebiegu nadciśnienia tętniczego i cukrzycy (kwas liponowy) [21], protekcyjne działanie antyoksydantów w uszkodzeniu siatkówki oka wywołanym cukrzycą (kwas liponowy, tauryna) [19], protekcyjny wpływ na serce w warunkach ischemii i reperfuzji (melatonina, tempol) [22, 23], zapobieganie agregacji i adhezji leukocytów związanej z dysfunkcją śródbłonna (witamina C) [1]. Badania kliniczne ujawniły, że podawanie antyoksydantów: witaminy C i tauryny, poprawia czynność śródbłonna w grupie palaczy tytoniu z udokumentowaną angiograficznie chorobą wieńcową lub dysfunkcją śródbłonna [24]. Istotną rolę antyoksydantów w prewencji zgonów sercowo-naczyniowych sugerowały badania epidemiologiczne, w których udokumentowano, że niskie stężenia antyoksydantów w osoczu: witamin C, E i A, korelują ze wzrostem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i ogólnej śmiertelności [25]. Na zmniejszenie ryzyka wystąpienia miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca w wyniku stosowania witamin A, E i C oraz β -karotenu wskazywały pierwsze duże próby kliniczne: Western Electric Study przeprowadzone na 1556 ludziach w średnim wieku, NHANES I z udziałem 11 348 dorosłych ochotników w wieku od 25 do 74 lat, ARIC wykonane na 6318 kobietach i 4989 mężczyznach w wieku od 45 do 64 lat oraz badanie ankietowe zrealizowane w ramach *The US Nurses' Health Study*, w którym uczestniczyło prawie 87 000 ochotników przyjmujących preparaty witaminy E [26–28].

Nieoczekiwane wyniki wieloośrodkowych prób klinicznych, podważające korzyści z prewencyjnego stosowania wybranych czynników o uznanym działaniu antyoksydacyjnym

Optymistyczne wnioski uzyskane w modelowych układach doświadczalnych i w pierwszych próbach klinicznych przyczyniły się do wdrożenia wieloośrodkowych programów badawczych ukierunkowanych na obiektywną ocenę korzyści stosowania antyoksydantów w prewencji pierwotnej i wtórnej chorób sercowo-naczyniowych w oparciu o prospektywne, randomizowane próby kliniczne. Wyniki większości podjętych prób okazały się zaskakujące, podważając mozolnie budowaną koncepcję o jedynie korzystnym profilu działania antyoksydantów. Badanie *Iowa Women's Health Study*, opublikowane w 1996 r. ujawniło, że wśród 34 387 kobiet po menopauzie systematycznie przyjmujących kwas askorbinowy (500 mg/dobę) lub/i α -tokoferol (10 000 jedn./dobę) niezamiennie zwiększyło się ryzyko wystąpienia raka piersi [29]. W ostatnim raporcie *Iowa Women's Health Study* opublikowanym w lipcu 2005 r. nie wykazano istotnego wpływu tej witaminy na śmiertelność ogólną i na śmiertelność z powodu chorób nowotworowych w populacji 39 876 kobiet w wieku powyżej 45. roku życia, któ-

re przyjmowały 600 jedn. witaminy E pochodzenia naturalnego [30]. Częstość występowania groźnych incydentów sercowo-naczyniowych odpowiadała częstości w grupie referencyjnej. Stwierdzono co prawda zmniejszenie o 24% ($P=0,03$) śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych, ale w końcowych wnioskach z *Iowa Women's Health Study* autorzy podkreślają, że nie ma przekonujących dowodów dla rekomendowania długotrwałego podawania witaminy E w diecie u kobiet po menopauzie. Niepokojące wnioski przyniosła metaanaliza opublikowana w styczniu 2005 r., po zsumowaniu wyników 19 dużych prób klinicznych, w których uczestniczyło 135 967 pacjentów. Wykazano, że śmiertelność ogólna była o 3,9% ($P=0,035$) większa w grupie długotrwałe przyjmującej duże dawki witaminy E (>400 mg/dobę) w porównaniu do populacji referencyjnej i że niekorzystny efekt witaminy E zaznacza się po przekroczeniu dawki 150 mg/dobę. W badaniu *CARET* obejmującym 18 314 palaczy tytoniu i pracowników ekspozowanych na azbest, w którym testowano wpływ β -karotenu (30 mg/dobę) i retinolu (25 000 jedn./dobę) na prewencję pierwotną chorób sercowo-naczyniowych, wykazano istotne zwiększenie ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych i raka płuc w grupach przyjmujących antyoksydanty [31]. Z kolei wśród 27 271 zdrowych palaczy tytoniu w przedziale wiekowym 50–69 lat, uczestniczących w fińskim badaniu *ATBC* i przyjmujących witaminę E (50 mg/dobę), β -karoten (20 mg/dobę) lub oba czynniki przez średnio 6 lat, stwierdzono zmniejszenie o 4% częstości występowania pierwotnych incydentów wieńcowych i o 8% śmiertelności z powodu niewydolności wieńcowej w grupie przyjmującej witaminę E, natomiast suplementacja β -karotenem nie miała istotnego znaczenia [32]. Z kolei w grupie 1 862 palaczy tytoniu w tym samym przedziale wiekowym, z zawałem serca w wywiadzie, wykazano, że przyjmowanie witaminy E i β -karotenu nie miało znaczenia we wtórnej prewencji ostrych incydentów wieńcowych, natomiast przyczyniało się do zwiększenia śmiertelności w następstwie nagłych incydentów sercowych [33]. Analogicznie, włoskie badanie *GISSI-P* z udziałem 11 324 chorych po zawałe serca wskazywało na brak korzyści ze stosowania α -tokoferolu w dawce 300 mg/dobę we wtórnej prewencji zawału serca i śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych [34]. W badaniu *CHAOS* prowadzonym na 2 002 pacjentach z angiograficznie udokumentowaną chorobą wieńcową ujawniono co prawda istotne statystycznie zmniejszenie ryzyka zawału serca podczas przewlekłego (średnio 510 dni) stosowania α -tokoferolu (800 jedn./dobę), ale jednocześnie wykazano niezamienny wzrost ryzyka zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych w tej grupie [35]. Wnioski z kolejnych prób klinicznych: *HPS* (20 356 pacjentów) i *HOPE* (9 541 pacjentów) dotyczących wpływu antyoksydantów na

pierwotną i wtórną prewencję incydentów sercowo-naczyniowych wskazują na brak istotnego wpływu stosowania antyoksydantów na ryzyko wystąpienia choroby sercowo-naczyniowej lub zgonu z powodu choroby sercowo-naczyniowej [36, 37].

Opublikowane w 2003 i 2004 r. trzy ogromne metaanalizy oparte na wieloośrodkowych próbach klinicznych z randomizacją nie tylko nie rozwiały wątpliwości związanych ze stosowaniem antyoksydantów, ale jeszcze je pogłębiły. Z zestawienia opracowanego przez zespół badaczy z Uniwersytetu w Sydney, na podstawie wcześniej opublikowanych wyników 7 wieloośrodkowych prób klinicznych, dotyczących wpływu flawonoidów zawartych w diecie na prewencję incydentów wieńcowych wynika, że wysokie spożycie flawonoidów jest związane ze zmniejszonym ryzykiem zgonu z powodu incydentu sercowo-naczyniowego [38]. Z kolei w analizie statystycznej opracowanej w 2003 r. pod egidą zespołu z Cleveland (USA) [39] wykorzystano dane pochodzące z 7 randomizowanych prób klinicznych dotyczących suplementacji witaminą E stosowaną w dawce dobowej od 50 do 800 jedn. u 81 788 pacjentów oraz z 8 prób klinicznych, których uczestnicy otrzymywali β -karoten w dawce dobowej od 15 do 50 mg. Czas suplementacji wybranymi antyoksydantami wynosił od 16 mies. do 12 lat. U pacjentów, którzy przyjmowali β -karoten, stwierdzono nieznaczne, ale statystycznie istotne (o 0,4%; $P=0,003$) zwiększenie śmiertelności ogólnej i śmiertelności spowodowanej przyczynami sercowo-naczyniowymi (o 0,3%; $P=0,003$). Witamina E nie miała znaczącego wpływu na śmiertelność ogólną (wzrost o 0,2%; $P=0,42$), śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych ($P=0,86$) i z powodu udarów mózgu (wzrost o 0,1%; $P=0,31$). Brak wpływu podawania witaminy E i karotenoidów w prewencji incydentów wieńcowych oraz na ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych potwierdził raport opublikowany przez grupę badaczy z Uniwersytetu w Helsinkach w grudniu 2004 r. [40]. Na metaanalizę składały dane uzyskane z 9 wieloośrodkowych prób klinicznych, których celem była ocena skuteczności witamin C i E oraz karotenoidów w prewencji choroby wieńcowej i ryzyka incydentów wieńcowych. Przy dziesięcioletnim okresie obserwacji w badaniach wzięły udział 293 172 osoby, które przewlekłe przyjmowały wybrane antyoksydanty. Zachęcające wyniki: istotne zmniejszenie częstości poważnych incydentów sercowych, uzyskano w grupie pacjentów, która systematycznie przyjmowała witaminę C, szczególnie w stosunkowo dużych dawkach dobowych, przekraczających 700 mg.

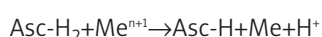
Rozbieżności między pożądanymi efektami przyjmowania antyoksydantów, opisywanymi w licznych pracach doświadczalnych i początkowych doniesieniach klinicznych a brakiem istotnych korzyści ujawnionym przez ba-

dania epidemiologiczne przeprowadzone na dużych populacjach, w których przewlekłe stosowano wybrane antyoksydanty, nadal wzbudzają ogromne zakłopotanie środowiska naukowego i skłaniają do podejmowania nowych poszukiwań. Niepowodzenia suplementacji antyoksydantami kontrastują z wnioskami z badań epidemiologicznych, w których wykazano ewidentne korzyści ze stosowania diety bogatej w warzywa i owoce i przez to zawierającej duży ładunek antyoksydantów.

Wątpliwości dotyczące założeń wstępnych i metodyki badań

Niektórzy badacze podważają metodykę opublikowanych metaanaliz, zaznaczając, że w różnych próbach klinicznych składających się na poszczególne zestawienia uczestniczyły odmienne subpopulacje, różniące się od siebie wiekiem i nawykami dietetycznymi oraz że stosowano różne dawki antyoksydantów przy nieporównywalnym okresie obserwacji. Słabą stroną tych zastrzeżeń jest fakt, że jedynie w niewielu perfekcyjnie wystandaryzowanych badaniach, obejmujących wyselekcjonowanych pacjentów, udało się wykazać istotny wpływ stosowania antyoksydantów na ryzyko zgonu i występowanie ostrych incydentów wieńcowych.

Pomijanym aspektem działania wielu czynników uznawanych za antyoksydanty, w tym kwasu askorbinowego i tokoferolu, są ich właściwości prooksydacyjne, które ujawniają się w odpowiednim przedziale stężeń, zależnie od otaczającego środowiska, a zwłaszcza w obecności jonów metali przejściowych [1]. W reakcjach zachodzących przy udziale witaminy C (Asc) i tokoferolu powstają ich postaci utlenione, kwas dehydroaskorbinowy (DHA) z rodnikiem askorbylowym (Asc[•]) jako pośrednim produktem reakcji. Utlenioną postacią tokoferolu jest rodnik tokoferylowy (Toc[•]), zaś utlenionymi postaciami karotenoidów są stosunkowo reaktywne rodniki, które łatwo prowadzą do powstawania nadtlenków lipidów i tworzenia adduktów karotenowych z udziałem kilku rodników nadtlenkowych, posiadające niesparowane elektrony zaabsorbowane przez atomy węgla. DHA wykazuje działanie biologiczne jako utleniacz, inaktywując białka zawierające grupy tiolowe, przez co może hamować syntezę ATP i mechanizmy transportu przez błonę, m. in. glukozy, wywoływać hemolizę erytrocytów i nekrozę komórek β wysp Langerhansa trzustki. Askorbinian (Asc) może redukować jony metali przejściowych według schematu:



gdzie przy dostępności jonów żelaza, jony Fe³⁺ są redukowane do Fe²⁺. Z kolei jony Fe²⁺ inicjują w obecności nadtlenków, m. in. nadtlenku wodoru i nadtlenków lipi-

dów, reakcję Fentona, prowadzącą do powstania jednego z najsilniejszych znanych utleniaczy – rodnika hydroksylowego. Układ Asc + jony żelaza jest standardowym zestawem do inicjowania peroksydacji lipidów.

Należy podkreślić, że większość spożywanych produktów roślinnych zawiera obok bogatego arsenału antyoksydantów liczne włókna i kwasy organiczne, takie jak np. kwas fitynowy, kwas winowy, kwas szczawowy, które skutecznie wiążą jony żelaza, eliminując substrat reakcji generującej rodniki tlenowe przy udziale antyoksydantu. Środowisko zasadowe charakterystyczne dla wielu roślinnych składników diety nie sprzyja przetrwaniu większości utlenionych postaci popularnych antyoksydantów. Antyoksydanty stosowane w postaci preparatów farmakologicznych mogą łatwiej ujawniać właściwości prooksydacyjne niż ich odpowiedniki zawarte w diecie, gdyż nie towarzyszą im kofaktory (np. o właściwościach chelatujących jony żelaza) zawarte w pokarmach roślinnych.

Odrębnym zagadnieniem, które nie zostało uwzględnione w próbach klinicznych, jest fakt, że antyoksydanty tworzą *in vivo* hierarchiczny, złożony układ wzajemnych powiązań, dostosowany do lokalnych potrzeb metabolicznych, który zapewnia utrzymanie względnej równowagi między utlenionymi i zredukowanymi postaciami antyoksydantów, w tym ich rodnikami. Żeby antyoksydant mógł spełniać swoją rolę, musi być zapewniona recyrkulacja pomiędzy jego postacią utlenioną i zredukowaną, tak aby była zapewniona możliwość oddawania elektronów przy spotkaniu cząsteczki antyoksydanta z ROS. Recykling zapewniają z jednej strony białka enzymatyczne, jak np. reduktaza kwasu askorbinowego i reduktaza rodnika tokoferylowego, z drugiej jest zależny od mechanizmów sprzęgających ich przemiany. Przykładowo redukcję rodnika tokoferylowego zapewnia wewnątrz komórki jego reakcja z glutationem (GSH), zaś w płynie zewnątrzkomórkowym i częściowo wewnątrz komórki reakcja w kwasem askorbinowym (Rycina 1.). Hipotetycznie, nagłe zwiększenie stężenia jednego ze składników tej układanki, np. wskutek izolowanej suplementacji jednego z antyoksydantów, może paradoksalnie zwiększyć stężenie rodników tlenowych – pochodnych innego antyoksydantu i w efekcie może promować reakcje utleniania.

Dysproporcja między kinetyką powstawania ROS i kinetyką reakcji zachodzących z ich udziałem a szybkością eliminowania ROS przez antyoksydanty

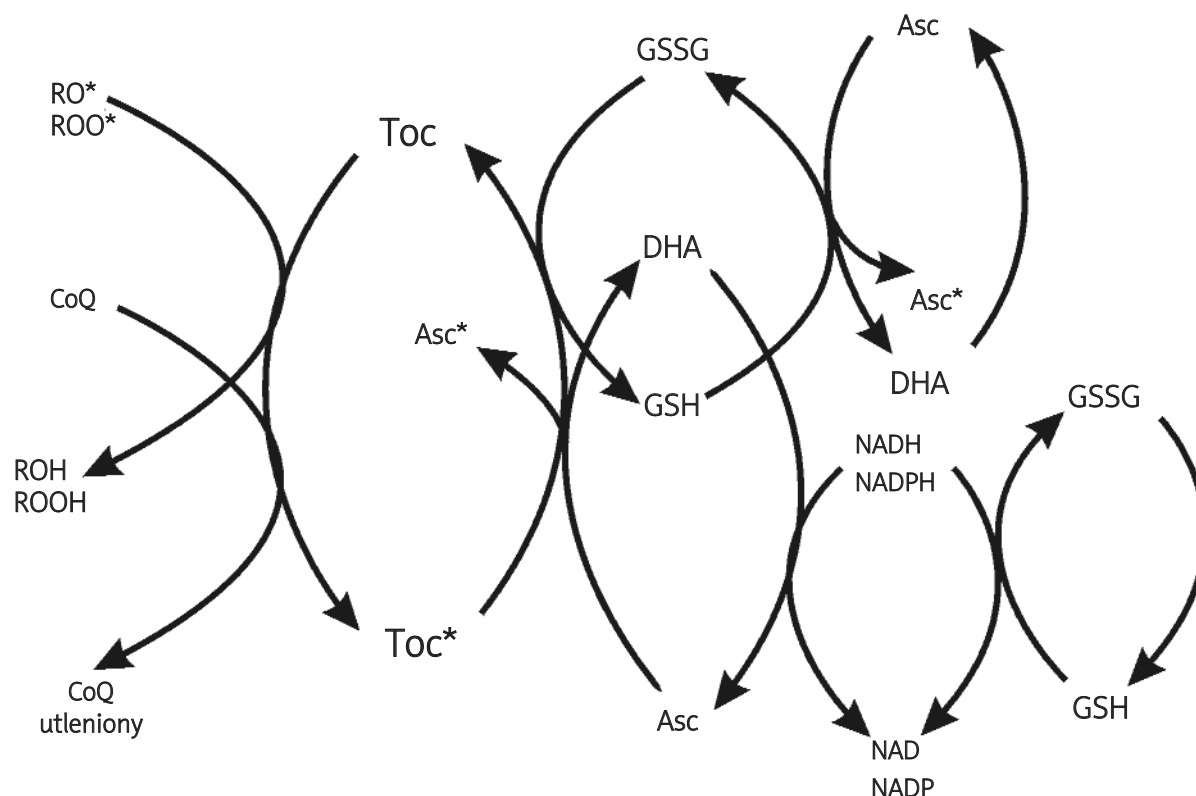
Podstawowym problemem w badaniach dotyczących antyoksydantów jest kinetyka reakcji z ich udziałem, która jest o wiele rzędów wielkości wolniejsza od

szybkości powstawania podstawowych ROS: anionorodnika ponadtlenkowego, rodnika hydroksylogowego nadtlendioazotynu i rodników lipidowych [1]. Ogromna reaktywność i niespecyficzność działania takich rodników tlenowych, jak np. rodnik hydroksylogowy, sprawia z jednej strony, że czas ich istnienia od chwili powstania jest niezwykle krótki, z drugiej zaś, że mogą one reagować niemal z każdą cząsteczką, którą napotkają na drodze. Dla rodnika hydroksylogowego głównym czynnikiem ograniczającym możliwości jego działania jest tzw. bariera dyfuzyjna, czyli dystans, który cząsteczka rodnika może przebyć od momentu powstania do jej destrukcji w wyniku reakcji z najbliższą napotkaną molekułą. Oznacza to, że antyoksydant niejako przeznaczony do unicestwienia utleniacza ma stosunkowo niewielkie szanse, aby w sposób preferencyjny uprzeczyć reakcje zachodzące z udziałem rodnika i zapobiec ewentualnym uszkodzeniom powstałym przy jego udziale. Szybkość reakcji dysmutacji nadtlenu wodoru prowadzącej do powstania anionorodnika ponadtlenkowego, reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z tlenkiem azotu (NO) generującej nadtlendioazotyn,

a także wielu innych reakcji prowadzących do powstawania rodników tlenowych jest o kilka rzędów wielkości większa od kinetyki reakcji anionorodnika ponadtlenkowego i innych rodników z większością egzogennych antyoksydantów [1]. Czy zatem można przyjąć, że antyoksydanty nie mają szansy przeciwdziałania nadmiernym procesom endogennego utleniania? Wdrożone ostatnio metody fizykochemiczne pozwalające na detekcję rodników tlenowych i ich bezpośrednich produktów w chwili ich powstawania jednoznacznie wskazują, że tak nie jest. Badania doświadczalne bezpośrednio wskazują, że antyoksydanty mogą ograniczać endogenne procesy utleniania [11].

Skuteczność antyoksydantów a stres oksydacyjny

Pomiędzy całkowitą destrukcją zależną hipotetycznie od niepojętego utleniania a śmiercią wynikającą z braku oksydantów, co w praktyce oznacza brak tlenu, rozciąga się przestrzeń zjawisk, w której ROS uczestniczą w przemianach fizjologicznych. Gdyby antyoksydanty były w stu procentach skuteczne, to zgi-



Rycina 1. Schemat powiązań czynnościowych umożliwiających utlenianie i regenerację witaminy E

Gwiazdką oznaczono rodniki poszczególnych antyoksydantów. Toc – tokoferol, Asc – kwas askorbinowy, DHA – kwas dehydroaskorbinowy, GSH – glutation, RO*, ROO* – rodniki tlenków i nadtlendioazotynowych

nęlibyśmy natychmiast. ROS i mechanizmy ochrony przed nimi tworzą delikatną równowagę dynamiczną na każdym poziomie żywego organizmu, która dostosowuje się do zmieniających się warunków otoczenia. Naruszenie tej równowagi, z przewagą ROS prowadzącą do potencjalnych uszkodzeń, jest określane jako stres oksydacyjny. Można przyjąć, że wieloosrodkowe badania epidemiologiczne, obejmujące bardzo duże populacje, składały się w większości z osobników względnie zdrowych, gdzie istniały warunki do zbilansowania endogennych reakcji utleniania i redukcji, czyli gdzie nie występowało zjawisko stresu oksydacyjnego w skali ogólnoustrojowej. Dlatego nie należało oczekiwać, że uzupełnienie antyoksydantów przyniesie wymierny efekt, gdyż kinetyka reakcji z udziałem antyoksydantów jest zbyt mała, aby spowodować zakłócenie sprawnie funkcjonujących mechanizmów kompensacyjnych.

Czy zatem można przyjąć, że ROS nie mają istotnego znaczenia w patogenezie wielu chorób? Zaprzeczają temu badania ostatnich lat przy wykorzystaniu metod bezpośredniej detekcji ROS. Przy użyciu tych metod udowodniono zwiększoną generację anionorodnika ponadtlenkowego i rodnika hydroksylowego w niewydolnym sercu [11].

Na korzystne efekty suplementacji antyoksydantami wskazywały głównie prace, w których w materiale badawczym były spełnione warunki do zaistnienia stresu oksydacyjnego. Dotyczy to zwłaszcza efektów antyoksydantów obserwowanych w patologicznie lub celowo zmienionych tkankach i komórkach, w izolowanych układach subkomórkowych, a także wyselekcjonowanych grupach chorych, np. w niewydolności wieńcowej, niewydolności krążenia, po udarach mózgu i urazach ośrodkowego układu nerwowego.

Antyoksydanty jako czynniki przeciwdziałające fizjologicznym efektom ROS

Praktycznie niemal każda cząsteczka organiczna: narząd, tkanka, komórka lub jej fragmenty stoją przed wyzwaniem ataku wolnorodnikowego. Z drugiej strony, gdyby rodniki tlenowe były aż tak niebezpieczne, to z pewnością w procesie ewolucji udałoby się ich unikać. W rzeczywistości są one wykorzystywane w procesach życiowych i są nieodzownym warunkiem życia. Zdecydowana większość opublikowanych prac naukowych dotyczących antyoksydantów pomija aspekt regulacyjny działania antyoksydantów, chociaż dane doświadczalne wskazują na kluczowe znaczenie ROS w systemach regulacji ogólnoustrojowej, tkankowej i komórkowej.

ROS uczestniczą w obrocie komórkowym białek, przyczyniając się do eliminacji uszkodzonych uprzednio

molekuł lub ich fragmentów, co z kolei umożliwia ich reparację lub zastąpienie przez nowe białka [1]. Istnieją liczne przesłanki wskazujące, że ROS pełnią funkcję przekaźników, które decydują o przemianach metabolicznych komórki, jej różnicowaniu i dojrzewaniu, adaptacji komórki do zmian środowiska zewnętrznego, a także przeżyciu. ROS wpływają na dyfuzję i transport przez błony oraz na aktywację szlaków przekaźniczo-wewnątrzkomórkowego [1]. Intrygującym zjawiskiem jest zachodząca przy udziale ROS zmiana konformacji przestrzennej receptorów błonowych, gdyż zjawisko to w praktyce oznacza, że receptor może pełnić nie tylko funkcję sensora w stosunku do swojego liganda, ale także może pełnić dodatkowo funkcję czujnika wewnątrzkomórkowej równowagi redoks. W takim układzie odpowiedź komórkowa inicjowana przez pobudzenie określonej puli receptorów błonowych ma charakter zintegrowany, zależny od obecności liganda i od chwilowego statusu metabolicznego komórki [41]. Wiele ligandów, np. angiotensyna II, uruchamia reakcje generujące ROS w komórce [42]. Przyczynia się to do utleniania wewnątrzkomórkowych przekaźników, np. grup SH kinaz białkowych, jak również do zwiększonej fosforylacji reszt tyrozynowych białek. Taki profil działania sprzyja samoograniczeniu odpowiedzi wywołanej pobudzeniem

Tabela I. Procesy ustrojowe, w których uczestniczą ROS

1. Regulacja czynnościowa na poziomie subkomórkowym, komórkowym i tkankowym umożliwiająca dostosowanie przemian metabolicznych do zmian środowiska zewnętrznego
2. Regulacja przemian energetycznych, w tym dostępności substratów energetycznych i tlenu
3. Przekazywanie sygnałów metabolicznych
4. Odruchowa regulacja krążenia przy udziale mechanizmów chemodetekcji tlenu
5. Miogenna regulacja dopływu krwi do tkanek
6. Mechanizmy termoregulacji związane z redystrybucją krwi i z indukcją termogenezy bezdrżeniowej
7. Adhezja i agregacja płytek krwi do śródbłonna naczyniowego
8. Protekcja przed inwazją patogenów i ich eliminacja. Realizacja funkcji cytotoksycznych przez makrofagi i komórki mikrogleju
9. Zapłodnienie i rozmnażanie
10. Synteza niezbędnych czynników endogennych, np. tyroksyny, prostaglandyn, leukotrienów, protrobiny
11. Reakcje kataboliczne, w tym w przemiany metaboliczne kseniobiotyków
12. Indukowanie zjawiska przerostu, proliferacji oraz apoptozy, umożliwiających dostosowanie tkanek i narządów do wieku i zmiany warunków funkcjonowania, np. serca w nadciśnieniu tętniczym, podczas ischemii i reperfuzji, w niewydolności krążenia

danych receptorów. W Tabeli I przedstawiono skrótowo kierunki fizjologicznych działań ROS w układach biologicznych. Skuteczne ograniczenie którejkolwiek z wymienionych funkcji przez antyoksydanty powinno w założeniu prowadzić do istotnych zaburzeń funkcji organizmu w skali ogólnoustrojowej. Stąd też nie należy oczekiwać, że podawanie antyoksydantów o wysokim współczynniku biodostępności, które mogą potencjalnie zakłócać szereg procesów życiowych, przyniesie wymierne korzyści w prewencji pierwotnej i wtórnej choroby wieńcowej, incydentów sercowo-naczyniowych i że zmniejszy ryzyko zgonu. Znacznie większą szansę korzystnego działania wydają się mieć antyoksydanty o działaniu lokalnym, wiążące się ze swoistymi ligandami o wysokiej specyficzności działania.

Hipotetyczny wpływ antyoksydantów na regulację krążenia

Jednym z podstawowych ogniw w łańcuchu powiązań czynnościowych regulujących układ krążenia są odruchy z chemoreceptorów tętniczych i chemodetektorów OUN. Przyjmuje się, że hipoksja powoduje pobudzenie przede wszystkim chemoreceptorów obwodowych, zaś hiperkapnia – ośrodkowych. Niedotlenienie mózgu może niezależnie inicjować pobudzenie układu krążenia. Niedawne badania ujawniły, że kluczowym elementem aktywacji chemoreceptorów obwodowych są ROS, które powstają w wyniku niepełnej redukcji jego podstawowej formy O₂. Stąd sugestia, że możliwość wyłączenia ROS poprzez zastosowanie skutecznych antyoksydantów może spowodować przesunięcie równowagi regulacyjnej w sposób charakterystyczny dla niedoboru tlenu. Zmniejszone oddziaływanie ROS na chemoreceptory może hipotetycznie spowodować zwiększenie ich aktywności w sposób odpowiadający hipoksji, czyli powodujący wzrost aktywności układu współczulnego i spadek aktywności układu przywspółczulnego. Wiadomo, że zwiększenie udziału komponenty współczulnej regulacji rytmu serca jest niezależnym czynnikiem wystąpienia nagłego incydentu sercowego i wiąże się ze zwiększonym ryzykiem nagłego zgonu. Ujawnienie dyskretnych przesunięć w autonomicznej regulacji serca umożliwia analiza zmienności rytmu serca (HRV), która dotychczas nie była wykorzystywana w znaczącym stopniu w ocenie działania antyoksydantów. Nadal nie rozstrzygnięto, dlaczego w grupie pacjentów przyjmującej witaminę E w ramach badania CHAOS istotne zmniejszenie ryzyka zawału mięśnia sercowego wiązało się z aż 18% wzrostem ryzyka nagłego zgonu [35]. Można spekulatywnie założyć, że zwiększona śmiertelność mogła być pochodną zwiększonej aktywności dosercowych włókien współczul-

nych, co mogło inicjować krytyczne zaburzenia rytmu serca. Niekorzystny wpływ relatywnie dużych dawek kwasu askorbinowego oraz troluksu, rozpuszczalnego w wodzie analogu witaminy E, na wykładniki HRV odzwierciedlające autonomiczną regulację rytmu serca, został ostatnio potwierdzony w badaniach doświadczalnych wykonanych na szczurach [43].

Zaburzenia czynnościowe i strukturalne wywołane przez nadmierne reakcje utleniania są podstawowym zagrożeniem dla żywego ustroju indukowanym przez czynniki zewnętrzne. Środowisko zewnętrzne komórki i organizmu nierzadko szybko się zmienia. Warunkiem przetrwania w niestabilnym otoczeniu jest wytworzenie i sprawne uruchamianie mechanizmów przystosowawczych, które pozwalają zachować integralność środowiska wewnętrznego. Zarówno organizmy wyższe, jak też niższe wykształciły w odpowiedzi na stres oksydacyjny szereg mechanizmów aktywujących endogenne mechanizmy obrony antyoksydacyjnej [1, 4]. Przykładowo, intensywny wysiłek fizyczny powoduje z jednej strony uszkodzenia DNA i utlenianie lipidów i białek, z drugiej zaś pobudza mechanizmy obrony antyoksydacyjnej, w tym wzrost aktywności SOD, katalazy, peroksydazy glutationu, a także indukuje przebudowę mięśnia i zwiększenie ekspresji jego białek kurczliwych. Stres oksydacyjny jest warunkiem *sine qua non* poprawy wydolności fizycznej w wyniku treningu fizycznego. Zjawisko pobudzającego organizm, korzystnego działania małej ekspozycji lub małych dawek czynnika, który w dawkach większych jest ewidentnie szkodliwy, zauważył już Hipokrates, a w czasach nowożytnych Paracelsus, i zostało ono nazwane hormezą, co w tłumaczeniu z greki oznacza *wprowadzić w ruch*. Istnieją liczne przesłanki, że ROS są nieodzownym elementem hormezy. Rattan wykazał, że powtarzana ekspozycja na czynnik wywołujący łagodny stres oksydacyjny opóźnia starzenie, stymuluje proteasomy, co przyczynia się do przyspieszonego usuwania oksydacyjnie uszkodzonych białek komórkowych, zmniejsza wrażliwość izolowanych komórek na destrukcyjne działanie etanolu i nadtlenu wodoru oraz aktywuje enzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne [44]. Analogicznie, powtarzane epizody krótkotrwałego niedokrwienia, znane jako *hartowanie przez niedokrwienie (ischemic preconditioning)* w znacznym stopniu ograniczają uszkodzenia serca wywołane późniejszym ciężkim niedokrwieniem [45, 46], a nadtlenek wodoru i rodniki tlenowe uruchamiają komórkową odpowiedź adaptacyjną [45, 47, 48]. W tym kontekście nieumiejętne zastosowanie antyoksydantów działających ogólnoustrojowo może zasadniczo utrudnić dostosowanie organizmu do zmienionych warunków funkcjonowania. Hipotetycznie można przyjąć, że wysoka podaż antyoksydantów może przynosić korzyści w ograniczonym czasie, kiedy warun-

ki środowiska zewnętrznego są ustabilizowane. W dłuższym okresie zewnętrzne i wewnętrzne warunki funkcjonowania organizmu zwykle ulegają zmianom, czasem gwałtownym, i wtedy przydają się zaindukowane wcześniej przez ROS mechanizmy adaptacyjne.

Uwagi końcowe

Niepowodzenia wielośrodkowych programów badawczych dotyczących zastosowania antyoksydantów w prewencji choroby wieńcowej i nagłych zgonów wyraźnie zniechęcają do rekomendowania suplementacji antyoksydantami w szerokich grupach społecznych. Zasadne wydaje się prowadzenie dalszych dobrze wystandaryzowanych badań, być może z wykorzystaniem odmiennych antyoksydantów niż dotychczas, przy włączeniu do testowanej populacji przede wszystkim osób, u których warunki stresu oksydacyjnego występują z dużym prawdopodobieństwem. Racjonalną strategią poszukiwań naukowych wydają się być dwa kierunki badań. Pierwszy dotyczyłby opracowania i wprowadzenia do praktyki antyoksydantów o specyficznym ukierunkowanym działaniu. Drugi kierunek badań odnosi się do oceny mechanizmów odruchowej regulacji rytmu serca i ciśnienia tętniczego, np. przy użyciu analizy zmienności rytmu serca (HRV) i ciśnienia tętniczego (BPV) u osób przyjmujących antyoksydanty, gdyż w ten sposób można zapewne określić subpopulację podatną na niepożądane działania antyoksydantów przejawiające się zwiększonym ryzykiem wystąpienia zaburzeń rytmu serca oraz zdefiniować konkretne przeciwwskazanie do stosowania konkretnego antyoksydanta u poszczególnych pacjentów.

Piśmiennictwo

- Bartosz G. Druga twarz tlenu. *PWN*, Warszawa 2003.
- Ueda S, Masutani H, Nakamura H, et al. Redox control of cell death. *Antiox Redox Signal* 2002; 4: 405-14.
- Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; 7: 153-63.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-14.
- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91: 7A-11A.
- Di Matteo V, Esposito E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003; 2: 95-107.
- Cooke MS, Herbert KE, Butler PC, et al. Further evidence for a possible role of conformation in the immunogenicity and antigenicity of the oxidative DNA lesion, 8-oxo-2-deoxyguanosine. *Free Radic Res* 1998; 28: 459-69.
- Cao C, Leng Y, Li C, et al. Functional interaction between the c-Abl and Arg protein-tyrosine kinases in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 2003; 278: 12961-7.
- Sgambato A, Zannoni GF, Faraglia B, et al. Decreased expression of the CDK inhibitor p27Kip1 and increased oxidative DNA damage in the multistep process of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 776-83.
- Ferrari R, Guardigli G, Mele D, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 1699-711.
- Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* 2000; 86: 152-7.
- Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, et al. Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation* 2001; 104: 134-6.
- Kumar D, Jugdutt BI. Apoptosis and oxidants in the heart. *J Lab Clin Med* 2003; 142: 288-97.
- Adeghate E. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol Cell Biochem* 2004; 261: 187-91.
- Demiryurek AT, Cakici I, Wainwright CL, et al. Effects of free radical production and scavengers on occlusion-reperfusion induced arrhythmias. *Pharmacol Res* 1998; 38: 433-9.
- Ochoa JJ, Vilchez MJ, Mataix J, et al. Oxidative stress in patients undergoing cardiac surgery: comparative study of revascularization and valve replacement procedures. *J Surg Res* 2003; 111: 248-54.
- Phillips M, Boehmer JP, Cataneo RN, et al. Prediction of heart transplant rejection with a breath test for markers of oxidative stress. *Am J Cardiol* 2004; 94: 1593-4.
- Zaidi SM, Banu N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta* 2004; 340: 229-33.
- Obrosova IG, Minchenko AG, Marinescu V, et al. Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 2001; 44: 1102-10.
- Prasad K, Kalra J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E. *Am Heart J* 1993; 125: 958-73.
- Midaoui AE, Elimadi A, Wu L, et al. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens* 2003; 16: 173-9.
- Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 10-19.
- Wierzbicka TH, Cherek M, Wszędybył-Winklewska Z, et al. Effect of substituted piperidine nitroxides on functional characteristics of the isolated heart challenged with ischemia. *Pol J Sport Med* 2001; 17: S44-S8.
- Fennessy FM, Moneley DS, Wang JH, et al. Taurine and vitamin C modify monocyte and endothelial dysfunction in young smokers. *Circulation* 2003; 107: 410-15.
- Gey KF, Moser UK, Jordan P, et al. Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 787S-97S.
- Pandey DK, Shekelle R, Selwyn BJ, et al. Dietary vitamin C and beta-carotene and risk of death in middle-aged men. The Western Electric Study. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 1269-78.

27. Enstrom JE, Kanim LE, Klein MA. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology* 1992; 3: 194-202.
28. Kritchevsky SB, Shimakawa T, Tell GS, et al. Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* 1995; 92: 2142-50.
29. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, et al. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996; 334: 1156-62.
30. Lee IM, Cook NR, Gaziano JM, et al. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 294: 56-65.
31. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 1150-5.
32. Virtamo J, Rapola JM, Ripatti S, et al. Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of primary nonfatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1998; 158: 668-75.
33. Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, et al. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 1997; 349: 1715-20.
34. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'infarto miocardico. *Lancet* 1999; 354: 447-55.
35. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347: 781-6.
36. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, et al. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 154-60.
37. Collins R, Peto R, Armitage J. The MRC/BHF Heart Protection Study: preliminary results. *Int J Clin Pract* 2002; 56: 53-6.
38. Huxley RR, Neil HA. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 904-8.
39. Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, et al. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2003; 361: 2017-23.
40. Knekt P, Ritz J, Pereira MA, et al. Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: a pooled analysis of 9 cohorts. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1508-20.
41. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
42. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension* 2005; 45: 438-44.
43. Wierzba TH, Borkowski T, Gawiński Ł. Do antioxidants play with heart rate variability? In: Bertoli E, Usukura J, Tanaka M (ed.). *Proceedings for Progress in Biomedical Science*, Gdańsk 2004; 1: 11-8.
44. Rattan SI. Mechanisms of hormesis through mild heat stress on human cells. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1019: 554-8.
45. Otani H. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 449-69.
46. Glantz L, Avramovich A, Trembovler V, et al. Ischemic preconditioning increases antioxidants in the brain and peripheral organs after cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2005; 192: 117-24.
47. Tang XL, Takano H, Rizvi A, et al. Oxidant species trigger late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H281-H91.
48. Yaguchi Y, Satoh H, Wakahara N, et al. Protective effects of hydrogen peroxide against ischemia/reperfusion injury in perfused rat hearts. *Circ J* 2003; 67: 253-8.

Pozawałowa przebudowa serca – rozstrzeń lewej komory jako potencjalny cel terapeutyczny

Remodeling after myocardial infarction – left ventricular dilation as potential therapeutic target

Michał Mączewski

Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie

Świeży zawał mięśnia sercowego uruchamia zjawisko pozawałowej przebudowy lewej komory serca, które odbywa się jednocześnie na kilku poziomach: makroskopowym, polegającym na zmianie geometrii (wielkości, kształtu i grubości ścian) lewej komory, mikroskopowym, obejmującym zmiany liczby kardiomiocytów i struktury sercowej tkanki łącznej oraz submikroskopowym, polegającym na zmianach zachodzących w poszczególnych kardiomiocytach. Zjawisko to jest napędzane z jednej strony mechanicznym wzrostem obciążenia kardiomiocytów, z drugiej aktywacją układów neurohumoralnych. Najważniejszy element procesu przebudowy – rozstrzeń lewej komory – jest zjawiskiem niekorzystnym, leżącym u podstaw progresji do niewydolności serca, a ponieważ coraz więcej argumentów wskazuje na to, że jest to proces odwracalny, być może w przyszłości uda się opracować interwencje swoiście ukierunkowane na zmniejszenie lub przynajmniej zahamowanie pozawałowej rozstrzeni lewej komory.

Abstract

Acute myocardial infarction triggers post-infarction left ventricular remodeling and proceeds concurrently on several levels: macroscopic, involving modification of left ventricular geometry (size, shape and wall thickness), microscopic, involving change of the number of cardiomyocytes and structure of cardiac connective tissue and submicroscopic, involving changes within cardiomyocytes. This phenomenon is triggered on one side by mechanical increase of cardiomyocyte load and on the other side by activation of neurohumoral systems. The most important element of the remodeling process – left ventricular dilation – is an adverse phenomenon, underlying progression to heart failure. Since more and more arguments indicates that this phenomenon is reversible, it is possible that in future interventions will be developed aimed at decreasing or at least halting post-infarction left ventricular dilation.

Kardiologia Polska 2005; 63 (Supl. 2): 483-488

Opis zjawiska

Świeży zawał mięśnia sercowego uruchamia zjawisko pozawałowej przebudowy lewej komory serca (*remodeling*), która stanowi odpowiedź tkanki na uszkodzenie i próbę przystosowania się do funkcjonowania w zmienionych warunkach [1, 2]. Zjawisko przebudowy dotyczy zarówno segmentu objętego zawałem, jak i nieobjętego martwicą, a odbywa się jednocześnie na kilku poziomach: makroskopowym, polegającym na zmianie geometrii (wielkości, kształtu i grubości ścian) lewej komory, mikroskopowym, obejmującym zmiany liczby kardiomiocytów i struktury sercowej tkanki łącznej oraz submikroskopowym, polegającym na zmia-

nach zachodzących w poszczególnych kardiomiocytach (Tabela I). Wszystkie powyższe zmiany prowadzą do zmiany czynności lewej komory serca. Zjawisko przebudowy zachodzi w dwóch fazach: wczesnej i późnej [1].

Wczesna faza przebudowy – ekspansja zawału

Już w kilka godzin od początku zawału rozpoczyna się zjawisko powiększania się jamy lewej komory, która dodatkowo zmienia kształt z eliptycznego na bardziej sferyczny. Jest to efekt postępującego rozciągania segmentu objętego zawałem [3], co z jednej strony prowadzi do jego ścieńczenia, z drugiej do rozstrzeni lewej komory. Zjawisko to nazywamy ekspansją zawału [4]. To-

Adres do korespondencji:

Michał Mączewski, Zakład Fizjologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel.: +48 22 834 03 67, faks: +48 22 864 08 34, e-mail: maczmich@cmkp.edu.pl

Tabela I. Różne poziomy pozawałowej przebudowy serca

makroskopowy	geometria lewej komory	rozstrzeń zmiana kształtu z eliptycznego na sferyczny przerost zdrowej ściany ścieńczenie części pozawałowej
mikroskopowy	mięsień sercowy	zmniejszenie liczby komórek (apoptoza, nekroza) zmiany dotyczące tkanki łącznej w sercu: – degradacja rusztowania łącznotkankowego – włóknienie zastępcze
submikroskopowy	biologia kardiomiocytu	zaburzenia sprzężenia elektromechanicznego desensytyzacja receptorów b-adrenergicznych przerost ekspresja genów płodowych (ciężkie łańcuchy β -miozyny)

warzysty temu znaczne przyspieszenie apoptozy kardiomiocytów, zarówno w segmencie zawałowym, jak i nieobjętym zawałem.

Ekspansja trwa do 2–3 tyg. od początku zawału. Po tym okresie włókna kolagenowe blizny tworzą już silną sieć, która nie wykazuje tendencji do dalszej rozstrzeni [5].

Późna faza przebudowy – dalsza rozstrzeń i przerost ekscentryczny zdrowego mięśnia

Zawałowa martwica kardiomiocytów prowadzi do nagłego wzrostu obciążenia pozostałych komórek – muszą one przejąć hemodynamiczne obowiązki utraczonych komórek. Dochodzi do rozciągania i przerostu żywych komórek, co prowadzi do dalszej rozstrzeni lewej komory i przerostu zdrowej części mięśnia sercowego (klasycznego przerostu ekscentrycznego). Mechanizm ten staje się istotny po kilku dniach od początku zawału [6]. U większości pacjentów po zawale mięśnia sercowego najbardziej intensywna przebudowa zachodzi w ciągu pierwszych tygodni/miesięcy po uszkodzeniu. Następnie po osiągnięciu nowego stanu hemodynamicznej równowagi proces przebudowy ulega zahamowaniu nawet na wiele lat, a być może do końca życia. U mniejszości pacjentów po zawale serca dochodzi do bardzo intensywnej przebudowy i gwałtownie postępującej rozstrzeni. W takim przypadku prawdopodobnie przerost zdrowej ściany nie nadąży za rozstrzeniem komory i u takiej osoby bardzo szybko dochodzi do załamania hemodynamicznej czynności lewej komory i rozwoju niewydolności serca. Wreszcie w niewielkiej grupie pacjentów po zawale serca rozstrzeń postępuje powoli, ale systematycznie, także prowadząc do rozwoju niewydolności serca po miesiącach/latach [7, 8]. Pomimo coraz lepszego poznawania czynników ryzyka pozawałowej przebudowy mięśnia sercowego, w dalszym ciągu trudno jest przewidzieć przebieg przebudowy u konkretnego pacjenta. Schematycznie przebieg pozawałowej rozstrzeni lewej komory pokazuje Rycina 1.

Obok zjawiska zmiany geometrii lewej komory dochodzi także do zmian struktury mięśnia sercowego na poziomie mikroskopowym. Znaczącej przebudowie ulega wewnątrzsercowa tkanka łączna: z jednej strony na skutek przewagi aktywności enzymów trawiących włókna kolagenowe, tzw. metaloproteinaz macierzy (MMP) nad ich inhibitorami – tkankowymi inhibitorami metaloproteinaz macierzy (TIMP), dochodzi do niszczenia łącznotkankowego rusztowania, na którym opierają się kardiomiocyty, co prowadzi do ich wzajemnego *ześlizgiwania* się i rozstrzeni lewej komory [9]. Z drugiej strony na skutek działania głównie aldosteronu i angiotensyny II w pozawałowym sercu wzrasta ilość włókien kolagenowych wokół naczyń (włóknienie zastępcze) [10].

Kolejnym efektem pozawałowej przebudowy mięśnia sercowego jest zmiana liczby kardiomiocytów. Obecnie wiadomo, że w dorosłym mięśniu sercowym dochodzi do regeneracji kardiomiocytów [11]. W pozawałowym sercu szybkość regeneracji jest większa niż w sercu zdrowym, ale nieproporcjonalnie bardziej zwiększone jest umiarnie miocytów w mechanizmie apoptozy [11], a w zaawansowanej przebudowie także w mechanizmie nekrozy [12]. Ostatecznym efektem działania tych mechanizmów jest systematyczne zmniejszanie się liczby kardiomiocytów w miarę postępowania procesu przebudowy. Co interesujące, pokazano, że kilkunastokrotne nasilenie apoptozy w zdrowym sercu myszy, do wartości, które są i tak dziesięciokrotnie niższe od obserwowanych w ludzkim niewydolnym sercu, wystarcza do wywołania rozstrzeni i dysfunkcji skurczowej lewej komory [13].

Wreszcie pozawałowa przebudowa prowadzi także od intensywnych zmian na poziomie poszczególnych kardiomiocytów. Dochodzi do zmiany ekspresji i funkcji białek sprzężenia elektromechanicznego: spada ilość SERCA (ATP-azy transportującej Ca^{2+} do siateczki sarkoplazmatycznej), kanały rianodynowe odpowiedzialne za uwalnianie Ca^{2+} w skurczu stają się nieszczelne, rośnie odkomórkowy transport wapnia. Zmiany te prowadzą ogólnie do spadku zawartości Ca^{2+} w siateczce sar-

koplazmatycznej i mniejszego wyrzutu jonów wapnia podczas pobudzenia kardiomiocytów, co prowadzi do spadku ich siły skurczu [14]. Obecne na powierzchni kardiomiocytów receptory β -adrenergiczne oraz wewnątrzkomórkowe szlaki przekaźnictwa sygnałów adrenergicznych stają się mniej wrażliwe na stymulację katecholaminergiczną [15], kardiomiocyty przerastają i dochodzi do ekspresji genów płodowych (np. genu kodującego łańcuchy ciężkie β -miozyny zamiast występującej w dorosłym sercu α -miozyny) [16].

Wydaje się, że zjawiska przebiegające w ramach procesu przebudowy toczące się na różnych poziomach są ze sobą sprzężone: pokazano, że zmiany na poziomie submikroskopowym, obejmujące np. ekspresję białek sprzężenia elektromechanicznego czy desensytyzację receptorów β -adrenergicznych korelują z nasileniem rozstrzeni. Podobnie pokazano, że nasilenie włóknienia zastępczego w pozawałowych sercach koreluje z nasileniem rozstrzeni i ekspresją łańcuchów ciężkich β -miozyny [17]. Wreszcie wiadomo, że stopień sferyczności lewej komory zależny jest także od rozstrzeni [18].

Mechanizmy i determinanty pozawałowej przebudowy

Zjawisko pozawałowej przebudowy napędzane jest przez dwie grupy czynników: czynniki mechaniczne oraz czynniki neurohumoralne.

Czynniki mechaniczne

Zarówno we wczesnej, jak i w późnej fazie przebudowy kluczowe znaczenie dla rozstrzeni oraz przerostu

lewej komory ma naprężenie, czyli rozciąganie poszczególnych kardiomiocytów. Wzrost naprężenia we wczesnej fazie prowadzi do ekspansji zawatu, w późnej fazie do przerostu i wydłużania miocytów. Naprężenie z kolei, zgodnie ze prawem Laplace'a, dane jest wzorem:

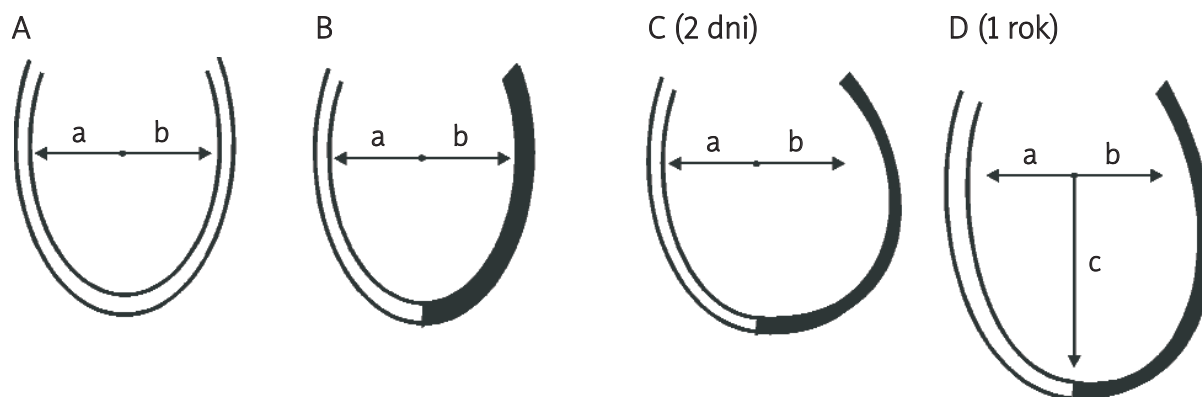
$$S = \frac{P \times r}{2h}$$

gdzie S oznacza naprężenie, P – ciśnienie skurczowe w lewej komorze, r – promień krzywizny komory, h – grubość ściany komory. Zatem intensywna przebudowa lewej komory będzie zachodziła w przypadku dużego naprężenia ściany lewej komory, czyli w przypadku wysokiego ciśnienia skurczowego krwi (odzwierciedlającego wysokie ciśnienie skurczowe w lewej komorze) i cienkiej ściany komory. Dodatkowo powiększenie komory sprzyja dalszej jej rozstrzeni, także w mechanizmie wzrostu naprężenia kardiomiocytów. Widać stąd, że wyjściowy przerost lewej komory, obecny w momencie wystąpienia zawatu mięśnia sercowego, chroni przed pozawałową rozstrzenią, podobnie jak obniżenie ciśnienia tętniczego, zarówno w ostrej fazie zawatu, jak i w okresie późniejszym.

Czynniki neurohumoralne

Świeży zawat serca prowadzi do aktywacji wielu układów neurohumoralnych, z których dla procesu przebudowy najważniejsze są układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) i współczulny układ nerwowy.

Spadek pojemności minutowej serca i ciśnienia tętniczego krwi, wtórny do martwicy kardiomiocytów i po-



Rycina 1. Schemat pozawałowej przebudowy serca. W zdrowym sercu odległości a i b odpowiadają odległości od punktu środkowego lewej komory do odpowiednio przegrody i wolnej ściany. Zawat (pokazany na czarno) prowadzi do procesu przebudowy: we wczesnej fazie (godziny – dni) dochodzi do ekspansji zawatu, polegającej na rozstrzeni martwiczej tkanki; w późnej fazie (tygodnie – lata) dochodzi do rozstrzeni i przerostu ekscentrycznego żywego mięśnia, a wielkość blizny nie ulega dalszym zmianom. Widocznym efektem przebudowy jest powiększenie wymiarów lewej komory

gorszenia sprawności hemodynamicznej serca, prowadzi do aktywacji układu współczulnego i osocznego układu RAA, natomiast wzrost napięcia w ścianie lewej komory pobudza dodatkowo lokalny wewnątrzsercowy układ RAA [19]. Wiadomo, że co prawda aktywacja receptorów β -adrenergicznych na kardiomiocytach krótkotrwale zwiększa ich kurczliwość, ale długotrwale wywołuje szereg zmian typowych dla pozawałowej przebudowy (zwiększa przerost lewej komory, nasila śmierć komórek w mechanizmie apoptozy, zaburza wewnątrzkomórkowe sprzężenie elektromechaniczne [15]). Dodatkowo aktywacja receptorów α -adrenergicznych także ma działanie pro-przerostowe. Angiotensyna II bezpośrednio, działając przez receptory AT1 na kardiomiocytach oraz pośrednio, zwiększając produkcję endoteliny, pobudza przerost kardiomiocytów [19], pobudza wewnątrzsercową produkcję metaloproteinaz [20], wreszcie stymuluje produkcję aldosteronu, który zwiększa syntezę kolagenu wewnątrz mięśnia sercowego, prowadząc do jego zwłóknienia. Pobudzenie receptorów AT1 na zakończeniach nerwów współczulnych zwiększa uwalnianie noradrenaliny, z kolei układ współczulny na kilku poziomach stymuluje układ RAA [21].

Istotną rolę układu współczulnego i RAA w pozawałowej przebudowie potwierdzają obserwacje pokazujące, że interwencje terapeutyczne hamujące aktywność tych układów, odpowiednio blokery receptorów β -adrenergicznych oraz inhibitory enzymu konwertującego, blokery receptorów angiotensynowych AT1 i blokery receptorów aldosteronowych, zmniejszają nasilenie pozawałowej przebudowy mięśnia sercowego zarówno w warunkach eksperymentalnych, jak i klinicznych [2].

Znaczenie pozawałowej przebudowy: czy jest to proces korzystny, czy niekorzystny?

Odpowiedź na to pytanie nie jest prosta, gdyż przebudowa obejmuje szereg różnych procesów toczących się na różnych poziomach. Natomiast z punktu widzenia terapeutycznego jest to kluczowe pytanie, gdyż gdyby udało się udowodnić, że jest to proces szkodliwy, mógłby się stać punktem uchwytu interwencji terapeutycznych, ukierunkowanych na zmniejszenie pozawałowej śmiertelności lub występowania niewydolności serca. Dlatego różne poziomy przebudowy trzeba rozpatrywać odrębnie.

Zmiana geometrii lewej komory

Z teoretycznego punktu widzenia rozstrzeń i zmiana kształtu lewej komory na bardziej sferyczny są wybitnie niekorzystne: prowadzą do wzrostu napięcia

w ścianie lewej komory (p. prawo Laplace'a), większego zużycia tlenu przez mięsień sercowy, desynchronizacji skurczu, niedomykalności zastawki mitralnej. Dodatkowo wzrost ciśnienia końcoworozkurczowego prowadzi do ucisku w fazie *diastole* na naczynia subendokardialne i zaburzenia przepływu wieńcowego w tej warstwie. Obserwacje kliniczne potwierdzają słuszność tych teoretycznych rozważań: pokazano, że po zawale serca u ludzi objętość końcowoskurczowa jest silnie skorelowana z pozawałową śmiertelnością i częstością występowania niewydolności serca [1, 22]. Dodatkowo pokazano, że leki zmniejszające postęp pozawałowej rozstrzeni lewej komory, takie jak blokery receptorów β -adrenergicznych oraz inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę, jednocześnie przynoszą korzyść pod względem zmniejszenia śmiertelności [23]. Wreszcie w badaniach eksperymentalnych pokazano, że myszy Timp (-/-), genetycznie pozbawione tkankowego inhibitora metaloproteinaz 3, a w związku z tym wykazujące nadmierną aktywność enzymów degradujących szkielet łącznotkankowy serca [24], w ciągu kilku tygodni rozwijają przebudowę przypominającą tę występującą po zawale, z podobnymi zmianami na poziomie tkanki i komórek. Zmianom tym można zapobiec, stosując inhibitory MMP. Powyższe dane sugerują, że rozstrzeń lewej komory jest wybitnie niekorzystna i że może brać udział w progresji do niewydolności serca.

Dodatkowo w ramach przebudowy dochodzi do ścieńczenia obszaru objętego zawałem: szczególnie niekorzystne wcześniej, bo zagraża pęknięciem. Wreszcie znaczenie pozawałowego przerostu mięśnia lewej komory jest nie do końca poznane. Z jednej strony badania eksperymentalne pokazują, że nasilenie pozawałowego przerostu zdrowej ściany lewej komory jest związane z mniejszą rozstrzenią i zachowaniem czynności skurczowej komory [25]. To potwierdza teoretyczne przesłanki bazujące na prawie Laplace'a, które wskazują, że pogrubienie ściany komory i zmniejszenie napięcia rzeczywiście powinno mieć korzystny wpływ na rozwój rozstrzeni. Z drugiej jednakże strony badania epidemiologiczne wskazują, że przerost lewej komory wiąże się z większą śmiertelnością, prawdopodobnie w mechanizmie zaburzeń rytmu [26].

Zmiany na poziomie mięśnia sercowego i kardiomiocytów

Wiadomo z badań eksperymentalnych, że zarówno ubytek liczby kardiomiocytów, jak i degradacja łącznotkankowego podścieliska oraz zwłóknienie zastępcze są zjawiskami niekorzystnymi [10]. Natomiast znaczenie zmian na poziomie poszczególnych kardiomiocytów nie jest oczywiste: co prawda ogólnie zmiany te prowadzą do zmniejszonej kurczliwości kardiomiocytów (np. za-

burzenie sprzężenia elektromechanicznego czy desensytyzacja β -receptorów), co przekłada się na mniejszą sprawność hemodynamiczną serca. Nie można jednak wykluczyć możliwości, że są to zmiany adaptacyjne, chroniące komórki mięśnia sercowego przed przetładowaniem jonami wapnia i nadmierną stymulacją neurohumoralną, które w dłuższej perspektywie czasowej wydłużają czas przeżycia komórek. Podobnie w przypadku ekspresji genów płodowych – pokazano na przykład, że powstałe w taki sposób łańcuchy ciężkie β -miozyny zużywają mniej tlenu [16].

Dlatego trzeba podkreślić, że pozawałowa przebudowa jest złożonym zjawiskiem, w ramach którego niektóre procesy są jednoznacznie niekorzystne (rozstrzeń lewej komory), natomiast znaczenie innych nie jest do końca poznane i nie można wykluczyć, że mają one charakter korzystny (przerost kardiomiocytów, desensytyzacja β -receptorów).

Czy proces przebudowy jest odwracalny?

Rozpatrzmy oddzielnie każdy z poziomów przebudowy.

Zmiana geometrii lewej komory

Dane kliniczne pokazują, że przynajmniej u niektórych pacjentów możliwe jest odwrócenie procesu przebudowy na poziomie geometrii lewej komory. Najlepszym przykładem są zmiany występujące po wszczępieniu urządzenia, wspomagające pracę lewej komory u pacjentów opornych na leczenie, oczekujących na przeszczep serca [27]. Pokazano, że u takich pacjentów mechaniczne odciążenie komory prowadzi do zmniejszenia objętości lewej komory oraz zwiększenia grubości jej ścian [28]. Ostatnio pokazano, że w niewydolności terapia resynchronizująca także zmniejsza objętości końcowoskurczową i końcoworozkurczową, poprawia frakcję wyrzutową i zmniejsza masę lewej komory [29]. Interwencje farmakologiczne, takie jak inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę czy blokery receptorów β -adrenergicznych prowadzą do mniej spektakularnych zmian: raczej zatrzymują progresję rozstrzeni niż są w stanie zmniejszyć wielkość lewej komory [2].

Zmiany na poziomie mięśnia sercowego i kardiomiocytów

Nie dysponujemy dowodami na to, że jakkolwiek interwencja jest w stanie przywrócić kardiomiocyty utracone w procesie apoptozy/nekrozy. Podobnie wydaje się, że patologiczne zwłóknienie mięśnia sercowego w najlepszym przypadku jest tylko częściowo odwracalne [30]. Natomiast dane eksperymentalne sugerują, że najłatwiej ustępują zmiany na poziomie poszczególnych kardiomiocytów: pokazano, że zarówno inhibitory enzymu konwertującego, jak i blokery recep-

torów β -adrenergicznych przywracają prawidłowe sprzężenie elektromechaniczne, gęstość i funkcję receptorów β -adrenergicznych, prowadzą do regresji przerostu kardiomiocytów [14].

Dane te pokazują, że odwrócenie procesu przebudowy pozawałowej jest możliwe, przy czym po zastosowaniu interwencji zmiany na poziomie kardiomiocytów mogą wycofać się całkowicie, na poziomie geometrii lewej komory częściowo, natomiast na poziomie struktury mięśnia sercowego ustępują najtrudniej.

Podsumowanie – możliwości terapeutyczne

Powyższe obserwacje sugerują, że podstawowym elementem przebudowy pozawałowej jest rozstrzeń lewej komory, która jest zjawiskiem niekorzystnym, pogarszającym warunki pracy lewej komory, leżącym u podstaw progresji do niewydolności serca. Ponieważ coraz więcej danych pokazuje, że jest to proces odwracalny, być może w przyszłości uda się opracować interwencje swoiście ukierunkowane na zmniejszenie lub przynajmniej zahamowanie pozawałowej rozstrzeni lewej komory. Badania nad takimi interwencjami są w toku. Z jednej strony są to próby ingerencji w układ metaloproteinaz/tkankowych inhibitorów metaloproteinaz, zmierzające do zachowania łącznotkankowego zrębu mięśnia sercowego, z drugiej są to różne interwencje chirurgiczne, takie jak częściowa wentrykulektomia (tzw. *operacja Batisty*) [31] czy rekonstrukcja zastawki mitralnej [32]. Takie interwencje hamujące lub odwracające niekorzystną przebudowę w przyszłości być może będą stanowić uzupełnienie dla leków hamujących układu neurohumoralne w leczeniu pacjentów z pozawałową dysfunkcją skurczową i niewydolnością serca.

Piśmiennictwo

1. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161-72.
2. Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* 2005; 111: 2837-49.
3. Eaton LW, Weiss JL, Bulkley BH, et al. Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: recognition by two-dimensional echocardiography. *N Engl J Med* 1979; 300: 57-62.
4. Hutchins GM, Bulkley BH. Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1978; 41: 1127-32.
5. Mitchell GF, Lamas GA, Vaughan DE, et al. Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 1136-44.
6. Weiss JL, Marino PN, Shapiro EP. Myocardial infarct expansion: recognition, significance and pathology. *Am J Cardiol* 1991; 68: 35D-40D.

7. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, et al. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 1993; 87: 755-63.
8. Pfeffer JM, Fischer TA, Pfeffer MA. Angiotensin-converting enzyme inhibition and ventricular remodeling after myocardial infarction. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 805-26.
9. Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, et al. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem* 1996; 155: 13-21.
10. Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 1997; 96: 4065-82.
11. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, et al. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. *J Clin Invest* 2003; 111: 1457-9.
12. Missov E, Calzolari C, Pau B. Circulating cardiac troponin I in severe congestive heart failure. *Circulation* 1997; 96: 2953-8.
13. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 2003; 111: 1497-504.
14. Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115: 556-64.
15. Port JD, Bristow MR. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 887-905.
16. Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, et al. Changes in gene expression in the intact human heart: downregulation of α -myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 1997; 100: 2315-24.
17. Fraccarollo D, Galuppo P, Schmidt I, et al. Additive amelioration of left ventricular remodeling and molecular alterations by combined aldosterone and angiotensin receptor blockade after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 97-105.
18. Linzbach AJ. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol* 1960; 5: 370-82.
19. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 551-71.
20. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-60.
21. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, et al. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation* 1988; 78: 186-201.
22. White HD, Norris RM, Brown MA. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 1987; 76: 44-51.
23. Udelson JE, Konstam MA. Relation between left ventricular remodeling and clinical outcomes in heart failure patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Card Fail* 2002; 8 (6 Suppl.): S465-71.
24. Kassiri Z, Oudit GY, Sanchez O, et al. Combination of tumor necrosis factor- α ablation and matrix metalloproteinase inhibition prevents heart failure after pressure overload in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knock-out mice. *Circ Res* 2005; 97: 380-90.
25. Lei L, Zhou R, Zheng W, et al. Bradycardia induces angiogenesis, increases coronary reserve, and preserves function of the post-infarcted heart. *Circulation* 2004; 110: 796-802.
26. Messerli FH, Soria F. Ventricular dysrhythmias, left ventricular hypertrophy, and sudden death. *Cardiovasc Drugs Ther* 1994; (8 Suppl.) 3: 557-63.
27. Levin HR, Oz MC, Chen JM, et al. Reversal of chronic ventricular dilation in patients with end-stage cardiomyopathy by prolonged mechanical unloading. *Circulation* 1995; 91: 2717-20.
28. Margulies KB. Reversal mechanisms of left ventricular remodeling: lessons from left ventricular assist device experiments. *J Card Fail* 2002; 8 (6 Suppl.): S500-5.
29. Sutton JMG, Plappert T, Abraham WT, et al. Effect of cardiac resynchronization therapy on left ventricular size and function in chronic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 1985-90.
30. Nakatani S, McCarthy PM, Kottke-Marchant K, et al. Left ventricular echocardiographic and histologic changes: impact of chronic unloading by an implantable ventricular assist device. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 894-901.
31. Batista RJ, Verde J, Nery P, et al. Partial left ventriculectomy to treat end-stage heart disease. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 634-8.
32. Bolling SF, Deeb GM, Brunsting LA, et al. Early outcome of mitral valve reconstruction in patients with end-stage cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 109: 676-82.