



**UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU**

Collegium Medicum  
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

**Bydgoszcz 2023 r.**



**UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU**  
Wydział Lekarski  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

**Imię Nazwisko**  
**Przemysław Sobczak**

## **Tytuł rozprawy**

**Wpływ lewosimendanu na układ krzepnięcia i zmiany stężenia biomarkerów sercowo-naczyniowych u pacjentów z niewydolnością serca**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych**

**Promotor:**  
**dr hab. Magdalena Krintus, prof. UMK**

**Bydgoszcz rok 2023**

### ***Podziękowanie***

*Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania **Pani dr hab. Magdalenie Krintus, prof. UMK** za nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej, cierpliwość, wyrozumiałość oraz motywację.*

## Spis treści

<b>1. Wstęp</b> .....	13
1.1 Lewosimendan .....	13
1.1.1 Struktura.....	13
1.1.2 Mechanizmy działania .....	14
1.1.3 Farmakokinetyka .....	18
1.1.4 Badania kliniczne .....	20
1.1.5 Odziaływanie na fosfodiesterazy.....	24
1.2 Niewydolność serca.....	26
1.2.1 Definicja.....	26
1.2.2 Epidemiologia .....	28
1.2.3 Diagnostyka oraz leczenie przewlekłej niewydolności serca .....	29
1.2.4 Ostra niewydolność serca .....	33
1.2.4.1 Postępowanie farmakologiczne w AHF .....	36
1.3 Peptydy natriuretyczne .....	41
1.3.1 Charakterystyka.....	41
1.3.2 BNP oraz NT-proBNP a terapia lewosimendanem .....	43
1.4 Galektyna- 3 .....	46
1.5 Troponiny .....	48
1.6 Hemostaza.....	50
1.6.1 Ściany naczyń krwionośnych .....	51
1.6.2 Płytki krwi .....	52
1.6.2.1 Płytki krwi - informacje ogólne.....	52
1.6.2.2 Budowa płytek krwi.....	52
1.6.2.3 Płytki krwi- receptory błonowe .....	55
1.6.3 Układ krzepnięcia .....	63
1.6.3.1 Kaskada krzepnięcia .....	64
1.6.3.2 Endogenne inhibitory krzepnięcia.....	65
1.6.4 Fibrynoliza .....	66
<b>2. Cel pracy</b> .....	70
<b>3. Pacjenci, materiały i metody</b> .....	71
3.1. Charakterystyka badanej grupy pacjentów.....	71
3.2 Materiał do badania .....	73
3.3 Metody oznaczeń .....	74

<b>3.3.1 Badanie funkcji płytek oraz układu krzepnięcia</b> .....	74
3.3.1.1 Agregometria impedancyjna .....	74
3.3.1.2 Tromboelastografia .....	76
3.3.1.3 System całościowej analizy formowania skrzepu .....	78
3.3.2 Farmakokinetyka lewosimendanu i jego metabolitów .....	81
3.3.3 Biomarkery sercowo-naczyniowe .....	81
3.3.3.1 Galektyna -3 .....	81
3.3.3.2 Sercowa troponina I .....	82
3.3.3.3 Peptyd natriuretyczny typu B.....	82
3.3.4 Pozostałe parametry laboratoryjne .....	83
3.3.4.1 CRP .....	83
3.3.4.2 Kreatynina .....	84
3.3.4.3 Jonogram .....	84
3.3.4.4 Morfologia .....	85
3.4 Statystyka .....	85
<b>4. Wyniki</b> .....	86
4.1 Charakterystyka grupy badanej .....	86
4.2 Funkcje płytek krwi.....	88
4.2.1 Agregometria impedancyjna.....	88
4.2.1.1 ADPtest.....	88
4.2.1.2 ASPItest .....	89
4.2.1.3 COLtest .....	90
4.2.1.4 RISTOtest .....	91
4.2.1.5 TRAPtest .....	92
4.2.2 Tromboelastografia .....	93
4.3 Badanie układu hemostazy .....	95
4.3.1 T-TAS system .....	95
4.3.2 Tromboelastografia .....	95
4.3.2.1 CK-R .....	95
4.3.2.2 CK-K .....	96
4.3.2.3 CK-Angel .....	97
4.3.2.4 CK-MA.....	97
4.3.2.4 CK-LY30.....	98
4.4 Farmakokinetyka .....	99

4.5 Parametry laboratoryjne- biomarkery sercowo-naczyniowe .....	101
4.5.1 BNP .....	101
4.5.2 hs-cTnI .....	102
4.5.3 Galektyna-3 .....	103
4.6 Pozostałe parametry laboratoryjne .....	105
4.6.1 CRP .....	105
4.6.2 Kreatynina .....	105
4.7 Ocena zależności pomiędzy testami aktywności funkcji płytek a stężeniem biomarkerów sercowo-naczyniowych .....	106
<b>5. Dyskusja .....</b>	<b>109</b>
<b>6. Wnioski .....</b>	<b>117</b>
<b>7. Streszczenie .....</b>	<b>118</b>
<b>8. Abstract.....</b>	<b>120</b>
<b>9. Piśmiennictwo .....</b>	<b>122</b>
<b>10. Wykaz ryciny .....</b>	<b>134</b>
<b>11. Wykaz tabele .....</b>	<b>136</b>
Załącznik .....	137

## Wykaz skrótów

ACS (*acute coronary syndromes*)- ostre zespoły wieńcowe

ADHF (*acutely decompensated heart failure*)- ostra dekompensacja niewydolności serca

ADP (*adenosine diphosphate*)- adenozydodifosforan

AF (*atrial fibrillation*)- migotanie przedsionków

AHF (*acute heart failure*)- ostra niewydolność serca

ALT (*alanine transaminase*)- aminotransferaza alaninowa

AMI (*acute myocardial infarction*)- ostry zawał mięśnia sercowego

ANP (*atrial natriuretic peptide*)- przedsionkowy peptyd natriuretyczny

APC (*activated protein C*)- aktywowane białko C

ASA (*acetylsalicylic acid*)- kwas acetylosalicylowy

AST (*aspartate transaminase*)- aminotransferaza asparaginianowa

AUC (*area under the curve*)- pole powierzchni pod krzywą

AT (*antithrombin*)- antytrombina

ATP (*adenosine triphosphate*)- adenozyntrifosforan

ATPazy (*adenosine triphosphatase*)- trifosfataza adenozyiny

BNP (*B-type natriuretic peptide*)- peptyd natriuretyczny typu B

Ca<sup>2+</sup> (*calcium ion*)- jon wapnia

CaCl<sub>2</sub> (*calcium chloride*)- chlorek wapnia

CAD (*coronary artery disease*)- choroba niedokrwienna serca

cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*)- cykliczny adenozynomonofosforan

cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*)- cykliczny guanozynomonofosforan

CHF (*chronic heart failure*)- przewlekła niewydolność serca

CLEC-2 (*C2-type lectin-like receptor*)- receptor lektynopodobny typu C-2

Cl<sup>-</sup> (chloride ion)- jon chlorkowy

CMIA (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*)- test immunochemiczny z użyciem mikrocząstek i znacznika chemiluminescencyjnego

CNP (*C-type natriuretic peptide*)- peptyd natriuretyczny typu C

CRD (*carbohydrate-recognition domain*)- domena rozpoznawania węglowodanów

CRP (*C-reactive protein*)- białko C-reaktywne

CS (*cardiogenic shock*)- wstrząs kardiogeny

CTI (*corn trypsin inhibitor*)- inhibitor trypsyny kukurydzianej

cTnC (*cardiac troponin C*)- sercowa troponina C

cTnI (*cardiac troponin I*)- sercowa troponina I

cTnT (*cardiac troponin T*)- sercowa troponina T

DNP (*dendroaspis natriuretic peptide*)- peptyd natriuretyczny Dendroaspis

EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*)- kwas wersenowy

eGFR (*estimated glomerular filtration rate*)- szacunkowa wielkość przesączania kłębuszkowego

EKG (*electrocardiography*)- elektrokardiogram

ESC (*European Society of Cardiology*)- Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne

FDP (*fibrin degradation product*)- produkty degradacji fibrynogenu

GDP (*guanosine diphosphate*)- guanozynydifosforan

GTP (*guanosine triphosphate*)- guanozynytrifosforan

HF (*heart failure*)- niewydolność serca



HFmrEF (*heart failure with mildly reduced ejection fraction*)- niewydolność serca z łagodnie obniżoną frakcją wyrzutową lewej komory

HFpEF (*heart failure with preserved ejection fraction*)- niewydolność serca z zachowaną frakcją wyrzutową lewej komory

HFrEF (*heart failure with reduced ejection fraction*)- niewydolność serca z obniżoną frakcją wyrzutową lewej komory

HGB (*hemoglobin*)- hemoglobina

hs-cTn (*high-sensitivity cardiac troponin*) - sercowa troponina oznaczana metodą o wysokiej czułości

ICAM-2 (*intercellular adhesion molecule 2*)- cząsteczka adhezji międzykomórkowej 2

IgSF (*immunoglobulin superfamily*)- receptory immunoglobulinowe

IL-1 (*interleukin-1*)- interleukina-1

IL-2 (*interleukin-2*)- interleukina-2

IL-6 (*interleukin-6*)- interleukina-6

ISE (*ion-selective electrode*)- elektrody jonoselektywne

JAM (*junctional adhesion molecules*)- łącznikowe cząsteczki adhezyjne

K<sup>+</sup> (*potassium ion*)- jon potasu

K<sub>ATP</sub> (*ATP-dependent potassium channels*)- kanały potasowe ATP zależne

K<sub>Ca</sub> (*calcium-activated potassium channels*)- kanały potasowe aktywowane jonami wapnia

K<sub>v</sub> (*voltage-gated potassium channels*)- kanały potasowe bramkowane potencjałem

LPR (*leucine-rich repeat*)- powtórzenia bogate w leucynę

LV (*left ventricular*)- lewa komora

LVEF (*left ventricular ejection fraction*)- frakcja wyrzutowa lewej komory

MDA (*malondialdehyde*)- aldehyd malonowy

Mg<sup>2+</sup> (*magnesium ion*) - jon magnezu

mitoK<sub>ATP</sub> (*mitochondrial ATP-dependent potassium channels*)- mitochondrialne kanały potasowe ATP zależne

mRNA (*messenger ribonucleic acid*)- matrycowy kwas rybonukleinowy

Na<sup>+</sup> (*sodium ion*)- jon sodowy

NaCl (*sodium chloride*)- chlorek sodu

NPR (*natriuretic peptide receptor*)- receptor błonowy peptydów natriuretycznych

NT-proBNP (*N-terminal proB-type natriuretic peptide*)- N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B

NYHA (*New York Heart Association*)- Nowojorskie Towarzystwo Kardiologiczne

OM- omecantiv mecarbil

PAF (*platelet activating factor*)- czynnik aktywujący płytki krwi

PAI-1 (*plasma activator inhibitor-1*) inhibitor aktywatora plazminogenu-1

PAI-2 (*plasma activator inhibitor-2*) - inhibitor aktywatora plazminogenu-2

PAR (*protease-activated receptors*)- receptory aktywowane proteazą

PDE (*phosphodiesterase*)- fosfodiesteraza

PDEI (*phosphodiesterase inhibitor*)- inhibitor fosfodiesterazy

PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*)- cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonna i płytek krwi

PGE1 (*prostaglandin E1*)- prostaglandyna E1

RBC (*red blood cells*)- erytrocyty

RHF (*right heart failure*)- niewydolność prawej komory serca

RLU (*relative light unit*)- względna jednostka światła

RTG (*radiography*)- badanie radiologiczne

RV (*right ventricle*)- prawa komora

SBP (*systolic blood pressure*)- ciśnienie skurczowe

SERCA2a ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPase of sarcoplasmic reticulum)-  $\text{Ca}^{2+}$  ATPaza retikulum sarkoplazmatycznego

SLS (*sodium lauryl sulfate*)- laurylosiarczan sodu

SMN (*survival motor neuron*)- kompleks białkowy przetrwania neuronów ruchowych

SR (*sarcoplasmic reticulum*)- retikulum sarkoplazmatycznego

TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*)- aktywowany trombiną inhibitor fibrynolizy

TF (*tissue factor*)- czynnik tkankowy

TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*)- inhibitor szlaku czynnika tkankowego

TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* )- transformujący czynnik wzrostu  $\beta$

TNF-  $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* )- czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$

t-PA (*tissue plasminogen activator*)- tkankowy aktywator plazminogenu

TRAP-6 (*thrombin receptor activator for peptide 6*)- peptyd aktywujący receptor trombinowy-6

TREMs (*triggering receptors on myeloid cells*)- receptory wyzwalające na komórkach mieloidalnych

TRL (*toll-like receptors*)- receptory toll-podobne

T-TAS (*Total Thrombus formation Analysis System*)- system całościowej analizy formowania skrzepu

u-PA (*urokinase-plasminogen activator*)- aktywator plazminogenu typu urokinazy

URO (*urodilantin*)- urodylatyna

vWF (*von Willebrand factor*)-czynnik von Willebranda

WBC (*white blood cells*)- leukocyty

$\alpha$ 2-AP ( *$\alpha$ 2-antiplasmin*)-  $\alpha$ 2-antyplazmine

5-HT2A (*5-hydroxytryptamine type-2A receptor*)- receptor 5-hydroksytryptaminowy typu 2A

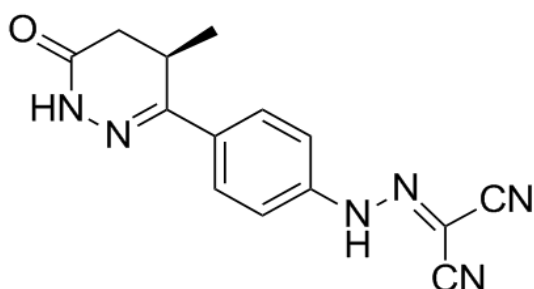
5-HT3A (*5-hydroxytryptamine type-3A receptor*)-receptor 5-hydroksytryptaminowy typu 3A

## 1. Wstęp

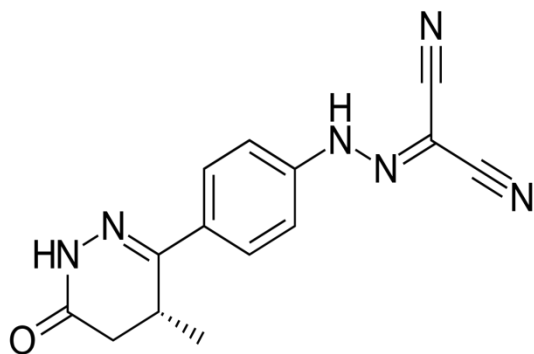
### 1.1 Lewosimendan

#### 1.1.1 Struktura

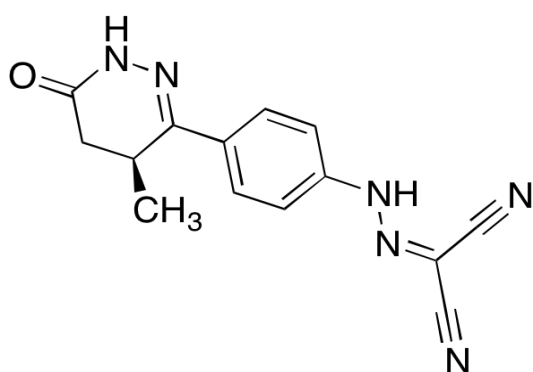
Simendan ( $C_{14}H_{12}N_6O$ )- ((4-(1,4,5,6-tetrahydro-4-metylo-6-okso-3-pyridazyńyl)fenyl)hydrazono)propanodinitrylu to pochodna hydrazonu oraz pirydazyny posiadająca chiralny atom węgla w pierścieniu pirydazyny, w związku z czym posiada dwa stereoizomery: (-) enancjomer lewosimendan i (+) enancjomer dextrosimendan. Strukturę chemiczną simendanu i jego enencjomerów przedstawia Rycina 1. Oba enancjomery simendanu stereoselektywnie oddziałują z sercową troponiną C (cTnC) uwrażliwiając komórki mięśniowe na jony wapnia ( $Ca^{2+}$ ). Jednak lewosimendan wykazuje znacznie większe powinowactwo do domeny N-końcowej cTnC, przez co efekty działania widoczne są przy znacznie mniejszym stężeniu w porównaniu z dextrosimendanem co znalazło zastosowanie kliniczne [1][2].



A.



B.



C.

**Ryc. 1.** Struktura chemiczna: A. Simendanu; B. Lewosimendanu; C. Dextrosimendanu.

Lewosimendan to żółty krystaliczny proszek o masie cząsteczkowej 280,3. Jest słabym kwasem organicznym i umiarkowanie lipofilowym związkiem ( $pK_a = 6,3$ ). Składowa hydrazonopropanodinitrylowa wiąże się z cTnC i jest odpowiedzialna za działanie uwrażliwiające miofilamentów na  $Ca^{2+}$  [3].

### 1.1.2 Mechanizmy działania

Tabela 1 przedstawia charakterystykę głównych mechanizmów działania lewosimendanu. Do najistotniejszych mechanizmów działania lewosimendanu wykorzystywanych w praktyce klinicznej zaliczamy działanie inotropowo dodatnie, działanie wazodylatacyjne oraz kardioprotekcyjne.

**Tabela 1.** Główne mechanizmy działania lewosimendanu (wg [4]).

Mechanizm	Inotropowo dodatni	Rozszerzenie naczyń	Kardioprotekcja
Miejsce uchwytu (komórka)	Kardiomiocyty	Komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych	Kardiomiocyty
Struktura komórkowa	Miofilamenty	Sarkolemma	Mitochondria
Molekularne miejsce uchwytu	Troponina C nasycona $Ca^{2+}$	Kanały potasowe ATP zależne	Kanały potasowe ATP zależne
Mechanizm molekularny	Uwrażliwienie na $Ca^{2+}$	Hiperpolaryzacja	Ochrona mitochondriów w niedokrwieniu-reperfuzji

ATP- adenozyntrifosforan;  $Ca^{2+}$ - jony wapnia;

### Działanie inotropowo dodatnie

Do skurczu mięśnia sercowego dochodzi w konsekwencji oddziaływania pomiędzy filamentami aktynowymi i miozynowymi, które są zorganizowane w wysoce spolaryzowane jednostki skurczowe znane jako sarkomery. Głównym białkiem filamentu cienkiego (aktynowego) jest aktyna. Globularne monomery G-aktyny polimeryzują do formy filamentowej F-aktyny tworząc helikalny polimer składający się w dwie wolno skręcające prawoskrętne nici. Kolejną kluczową komponentą filamentu cienkiego jest tropomiozyna. Jest to białko układające się na obu stronach spiralnie skręconego łańcucha F-aktyny. Jedna cząsteczka tropomiozyny obejmuje siedem podjednostek aktyny. Sąsiadujące cząsteczki tworzą liniowy polimer tropomiozyny obejmując cały filament aktynowy. Jedna cząsteczka tropomiozyny oddziałuje z jednym kompleksem troponiny. Troponina sercowa stanowi kompleks trzech białek wchodzący w skład filamentu cienkiego i obejmuje:

- ❖ sercową troponinę C (cTnC)- która bezpośrednio wiąże jony  $Ca^{2+}$
- ❖ sercową troponinę T (cTnT)- białko wiążące kompleks troponiny z tropomiozyną
- ❖ sercową troponinę I (cTnI)- podjednostkę hamującą skurcz poprzez interakcję z F-aktyną [5].

cTnC jest podzielona na dwie domeny. Domena C- końcowa pełniąc funkcje strukturalne oraz domena N-końcowa pełniąc funkcje regulacyjne. Każda z domen zawiera dwa potencjalnie wiążące  $Ca^{2+}$  motywy „EF-hand” złożone z helisy-pętli-helisy. Domena C-końcowa odpowiedzialna jest za utrzymywanie cTnC na cienkim filamencie poprzez ścisłe powiązanie z obszarem „kotwiczenia” cTnI. C-końcowa domena cTnC jest związana z dwoma dwuwartościowymi jonami magnezu ( $Mg^{2+}$ ) lub  $Ca^{2+}$  w całym cyklu skurczu-rozkurcz mięśni.

Wiązanie  $Ca^{2+}$  z regulacyjną domeną N-końcową cTnC jest kluczowym etapem, który łączy cytoplazmatyczny napływ wapnia ze skurczem mięśni. Wiązanie  $Ca^{2+}$  umożliwia domenie N-końcowej cTnC oddziaływanie z odpowiednim regionem cTnI (tzw. regionem „przełącznika”). Połączenie nasyconej  $Ca^{2+}$  cTnC z cTnI prowadzi do oddzielenia regionu hamującego cTnI od miejsca wiązania na aktynie. Połączenie regionu hamującego cTnI z aktyną zapobiega interakcji aktyna-miozyna i uniemożliwia skurcz mięśni przy braku  $Ca^{2+}$ . Gdy cTnI oddzieli się od aktyny, tropomiozyna zmienia swoją orientację, aby odsłonić powierzchnię wiązania miozyny z aktyną [5][6].

Lewosimendan wiąże się z domeną regulatorową cTnC nasyconą  $\text{Ca}^{2+}$  w sposób zależny od  $\text{Ca}^{2+}$ , w hydrofobowym regionie domeny N-końcowej w pobliżu regionu łącznika D/E. Wskutek tego działania elastyczny region łącznika staje się stabilniejszy i dochodzi do ograniczenia stopni swobody domeny N-końcowej. Pierścień pirydazyonowy i hydrazon malodinitrylu lewosimendanu tworzą wiązania wodorowe z polarnymi lub obdarzonymi ładunkiem aminokwasami w hydrofobowej kieszeni nasyconej  $\text{Ca}^{2+}$  N-końcowej domeny cTnC. Stabilizując konformację kompleksu wapń-cTnC poprzez sieć oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych, lewosimendan hamuje działanie cTnI. Mechanizm ten prowadzi do przyspieszenia tempa tworzenia mostków krzyżowych aktyna-miozyna i spowolnienia tempa dysocjacji. Wiązanie jest znacznie słabsze w czasie rozkurczu, gdy wewnątrzkomórkowy poziom wapnia jest niski. Ten mechanizm działania skutkuje wzmocnieniem kurczliwości mięśnia sercowego bez upośledzenia relaksacji komór, zwiększania zapotrzebowania na tlen, wewnątrzkomórkowego stężenia cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (cAMP, *cyclic adenosine monophosphate*) oraz wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w klinicznie istotnych dawkach [7].

#### Wpływ na naczynia krwionośne

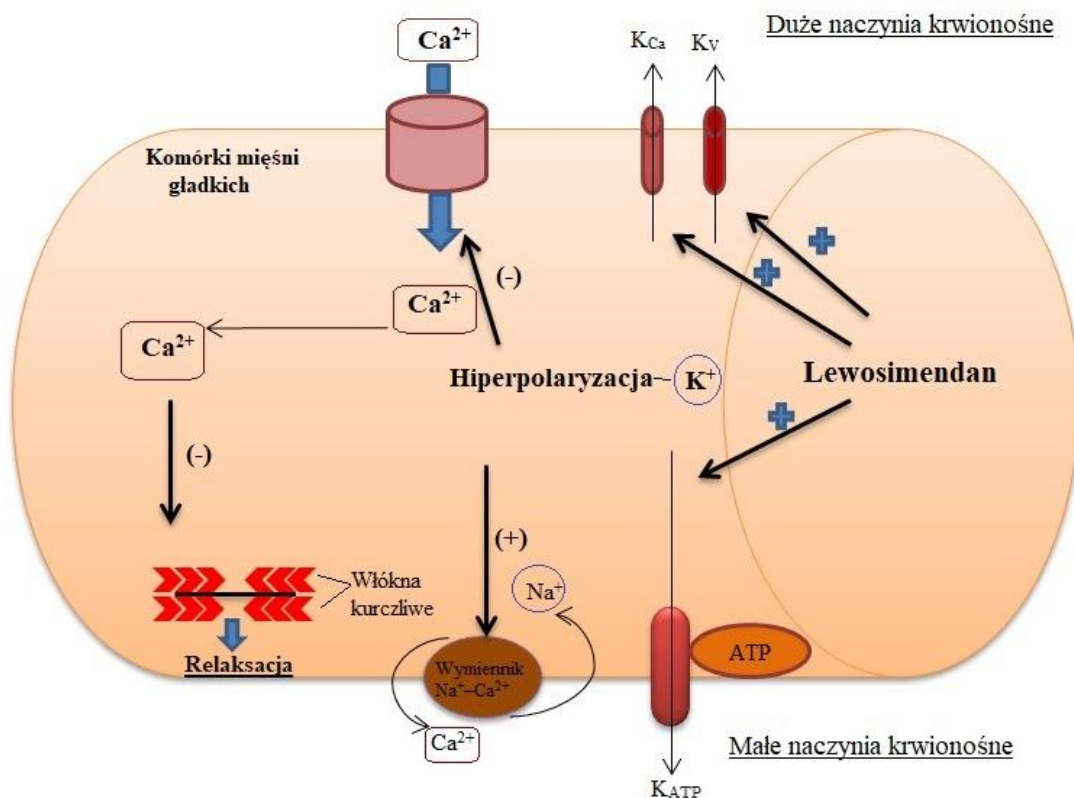
Kolejny mechanizm działania lewosimendanu obejmuje rozszerzanie tętniczych jak i żylnych naczyń krwionośnych. Dostępne badania sugerują zaangażowanie kilku szlaków w mechanizm wazodylatacyjnego działania lewosimendanu [8]. Kluczowy mechanizm obejmuje otwarcie kanałów potasowych mięśni gładkich budujących ściany naczyń krwionośnych. Przy czym otwarcie kanałów potasowych ATP zależnych ( $K_{\text{ATP}}$ ) dotyczy małych naczyń oporowych, natomiast otwarcie kanałów potasowych aktywowanych  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{\text{Ca}}$ ) oraz bramkowanych potencjałem ( $K_{\text{V}}$ ) stymuluje relaksację dużych naczyń [2][8].

Otwarcie kanałów potasowych powoduje hiperpolaryzację błony komórkowej czego efektem jest zahamowanie napływu  $\text{Ca}^{2+}$  oraz aktywacja wymiennika  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  i w konsekwencji spadek wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  i rozluźnienie naczyń krwionośnych. Badania z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów kanałów potasowych takich jak:  $K_{\text{ATP}}$ - glibenklamid,  $K_{\text{Ca}}$ - iberiotoksyna oraz  $K_{\text{V}}$ - 4.aminopirydyna potwierdzają istotną rolę otwierania kanałów potasowych w mechanizmie wazodylatacji naczyń krwionośnych [2][9][10]. Schemat tego mechanizmu przedstawia Rycina 2.



Innym potencjalnym mechanizmem związanym z rozszerzeniem naczyń krwionośnych wywołanym przez lewosimendan jest zmniejszenie wrażliwości białek kurczliwych (kalmoduliny) na  $Ca^{2+}$  w mięśniach gładkich naczyń. Zmniejszenie siły skurczu miofilamentów naczyniowych występuje bez proporcjonalnego zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$  [8][11].

Warto również wspomnieć o potencjalnym mechanizmie związanym z hamowaniem fosfodiesterazy (PDE, *phosphodiesterase*). Prowadzi to do wzrostu stężenia cAMP wewnątrz komórek mięśni gładkich budujących ściany naczyń krwionośnych. Jednak efekt ten obserwowany jest przy wysokich dawkach lewosimendanu [12].



**Ryc. 2.** Lewosimendan- mechanizm rozszerzający naczynia krwionośne (wg [13]).

### Efekt kardioprotekcyjny

Trzecim kluczowym mechanizmem działania lewosimendanu jest otwarcie mitochondrialnych kanałów potasowych wrażliwych na ATP (mito $K_{ATP}$ ), który wywiera działanie ochronne na serce przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym. Zwiększony napływ jonów potasu związany z otwarciem kanałów mito $K_{ATP}$  jest wystarczający do

ochrony/zachowania funkcji mitochondriów. Prawdopodobnie poprzez normalizację objętości macierzy i przestrzeni międzybłonowej w sytuacjach stresu, takich jak niedokrwienie i/lub reperfuzja [14].

Działanie krótkoterminowe związane z otwarciem mitoK<sub>ATP</sub>:

- Efekt antyogłuszeniowy
- Przystosowywanie komórek mięśnia sercowego do krótkotrwałych epizodów niedotleniania- tzw. „preconditioning”

Działanie długoterminowe związane z otwarciem mitoK<sub>ATP</sub>:

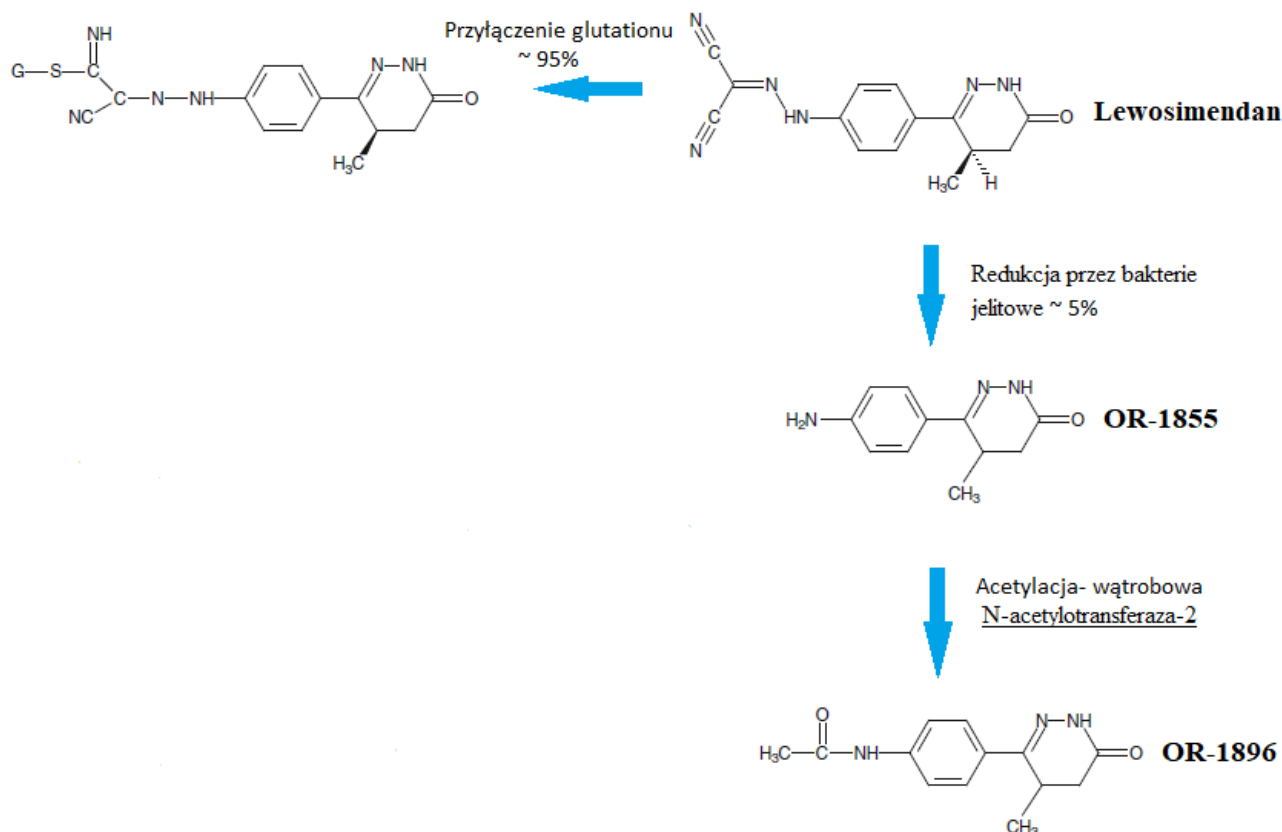
- Działanie przeciwzapalne
- Działanie antyapoptotyczne
- Działanie antyoksydacyjne

### **1.1.3 Farmakokinetyka**

Lewosimendan jest stosowany w postaci roztworu do infuzji dożylniej. Biodostępność doustnego lewosimendanu wynosi 85±6% u zdrowych ochotników, natomiast u pacjentów ze zdekompensowaną niewydolnością serca (HF, *heart failure*) 84±4%. Parametry farmakokinetyczne lewosimendanu podawanego dożylnie są porównywalne u zdrowych ochotników i pacjentów z niewydolnością serca [7].

Głównym szlakiem metabolicznym lewosimendanu jest sprzężanie z glutationem. Sprzężone metabolity są farmakologicznie nieaktywne i są wydalane z moczem i kałem. Około 5% podawanego lewosimendanu jest redukowane w jelicie grubym przez bakterie do metabolitu aminofenolopirydazyonu (OR-1855). Następnie dochodzi do ponownej absorpcji OR-1855 do krążenia i dalszego metabolizowania przez acetylację w wątrobie. Enzymem odpowiedzialnym za proces wątrobowej acetylacji jest N-acetylotransferaza-2 tworząca aktywny N-acetylowany metabolit OR-1896. Szlak powstawania głównych metabolitów lewosimendanu przedstawia Rycina 3. Krążące metabolity OR-1855 i OR-1896 tworzą się powoli, a ich maksymalne stężenia obserwuje się średnio 2 dni po zaprzestaniu 24-godzinnego wlewu leku. Enzym odpowiedzialny za metabolizm OR-1855 do OR-1896 jest rozłożony polimorficznie w populacji. Badanie, w którym uczestników poddano genotypowaniu pod kątem ich fenotypu acetylacji przed podaniem lewosimendanu

wykazało, że pacjenci tzw. „szybcy acetylatorzy” mieli wyższe stężenia OR-1896, ale niższe stężenia OR-1855 w osoczu niż pacjenci z niższą aktywnością enzymu odpowiedzialnego za acetylację. Stężenie lewosimendanu było podobne w obu fenotypach [7][8][15].



**Ryc. 3.** Szlak metaboliczny powstawania głównych metabolitów lewosimendanu.

Lewosimendan ma czas eliminacji 1-1,5 godziny, a całkowity klirens wynosi około 200-360 ml/min [7].

Krążące metabolity OR-1855 i OR-1896 mają znacznie dłuższe okresy półtrwania w fazie eliminacji niż lek macierzysty. Metabolity powstają powoli i są wykrywalne dopiero po 12 godzinach od rozpoczęcia ciągłej infuzji. Chociaż stężenie lewosimendanu we krwi szybko spada po przerwaniu wlewu, stężenia metabolitów wciąż rośnie i osiąga maksymalne wartości 48-72 godzin po rozpoczęciu 24-godzinnej wlewu. Ponieważ okres półtrwania w fazie eliminacji u pacjentów z zastoinową niewydolnością serca wynosi 70-80 godzin, można oszacować, że stężenie metabolitów w stanie stacjonarnym może zostać osiągnięte w ciągu 2 tygodni [15].

#### 1.1.4 Badania kliniczne

Skuteczność oraz bezpieczeństwo lewosimendanu oceniano w randomizowanych, podwójnie zaślepionych, wieloośrodkowych badaniach klinicznych, w których wzięło udział około 2800 pacjentów z HF [16]. Do najważniejszych badań klinicznych zalicza się następujące badania określone akronimami:

- Program REVIVE
- SURVIVE
- LIDO
- RUSSLAN

W wieloośrodkowym, randomizowanym, podwójnie zaślepionym badaniu LIDO (*Levosimendan Infusion vs. DObutamine*) porównywano wpływ lewosimendanu i dobutaminy na wydajność hemodynamiczną i wyniki kliniczne u pacjentów z HF [17]. Pierwszorzędowym punktem końcowym był odsetek pacjentów z poprawą hemodynamiczną (definiowana jako wzrost o 30% lub większa pojemność minutowa serca i spadek o 25% lub więcej ciśnienia zaklinowania w płucnych naczyniach włosowatych). Do kryteriów wyłączenia z badania zaliczano: ciśnienie skurczowe poniżej 90 mmHg oraz częstość czynności serca przekraczającą 120 uderzeń/min. W badaniu wzięło udział 203 pacjentów z ciężką HF- 103 pacjentów otrzymywało lewosimendan (dawka nasycająca 24 µg/kg przez 10 minut, a następnie infuzja ciągła w dawce 0,1-0,2 µg/kg/min przez 24 godziny) oraz 100 otrzymujących dobutamine (5-10 µg/kg/min przez 24 godziny). Pierwszorzędowy hemodynamiczny punkt końcowy osiągnięto u 29 (28%) pacjentów z grupy lewosimendanu i 15 (15%) z grupy dobutaminy ( $p= 0,022$ ). Po 180 dniach zmarło 27 (26%) pacjentów z grupy lewosimendanu w porównaniu z 38 (38%) w grupie dobutaminy ( $p= 0,029$ ). Uzyskane wyniki wskazują, że podawanie lewosimendanu prowadziło do zależnego od dawki zwiększenia pojemności minutowej serca i objętości wyrzutowej, a także zależnego od dawki spadku ciśnienia zaklinowania płucnych naczyń włosowatych, średniego ciśnienia tętniczego oraz całkowitego oporu obwodowego [16] [17].

W badaniu RUSSLAN (*Randomised study on Safety and effectiveness of Levosimendan in patients with left ventricular failure due to an Acute myocardial infarct*) oceniano bezpieczeństwa i skuteczności lewosimendanu u pacjentów z HF będącą komplikacją ostrego

zawału [18]. W tym randomizowanym, kontrolowanym placebo badaniu z podwójnie zaślepioną próbą podawano lewosimendan (0,1–0,4 µg/kg/min) lub placebo dożylnie przez 6 godzin 504 pacjentom. Pierwszorzędnym punktem końcowym był odsetek pacjentów, u których wystąpiło niedociśnienie lub niedokrwienie o znaczeniu klinicznym. Grupę badaną podzielono w zależności od dawki otrzymanego leku, co przedstawia Tabela 2.

**Tabela 2.** Profil badania.

	Placebo	Lewosimendan	Lewosimendan	Lewosimendan	Lewosimendan
<b>Dawka nasycająca</b>	-	6 µg/kg	12 µg/kg	24 µg/kg	24 µg/kg
<b>Dawka właściwa</b>	-	0,1 µg/kg/min	0,2 µg/kg/min	0,2 µg/kg/min	0,4 µg/kg/min
<b>Liczba pacjentów</b>	102	103	100	99	100

Częstość występowania niedokrwienia lub niedociśnienia była podobna we wszystkich leczonych grupach ( $p=0,319$ ). Gdy wszystkie cztery grupy lewosimendanu połączono i porównano z placebo, proporcje pacjentów, u których wystąpiło klinicznie istotne niedociśnienie lub niedokrwienie w grupach placebo i lewosimendanu były porównywalne (odpowiednio 10,8% vs 13,4%;  $p=0,456$ ). Łączne ryzyko zgonu i nasilenia niewydolności serca było niższe u pacjentów leczonych lewosimendanem niż u pacjentów otrzymujących placebo zarówno podczas 6-godzinnego okresu infuzji (odpowiednio 2,0% vs 5,9%;  $p=0,033$ ), jak i po 24 godzinach od początku wlewu (odpowiednio 4,0% vs 8,8%;  $p=0,044$ ). Śmiertelność ogólna wśród pacjentów leczonych lewosimendanem była znacząco niższa niż w grupie placebo przez 14 dni po rozpoczęciu leczenia (odpowiednio 11,7% vs 19,6%;  $p=0,031$ ). Tę samą zależność zaobserwowano również po 180 dniach (22,6% vs. 31,4%;  $p=0,053$ ). Dane te sugerują, że lewosimendan nie wywoływał niedociśnienia ani niedokrwienia i zmniejszał ryzyko pogorszenia niewydolności serca i zgonu u pacjentów z niewydolnością lewej komory wynikającą z ostrego zawału mięśnia sercowego [18].

Kolejne randomizowane, z podwójnie zaślepioną próbą badanie- SURVIVE (*SURVival of Patients with acute heart failure in need of IntraVENousInotropic support*) oceniało skuteczność i bezpieczeństwo dożylnego podawania lewosimendanu lub dobutaminy u 1327 pacjentów wymagających wsparcia inotropowego. Pacjenci byli hospitalizowani z powodu ostrej zdekompensowanej niewydolności serca (ADHF, *acutely decompensated heart failure*)

[19]. Do kryteriów włączenia zaliczano frakcję wyrzutową 30% lub mniej w ciągu ostatnich 12 miesięcy oraz konieczność podania leków inotropowych, co wynikało z faktu niewystarczającej odpowiedzi na dożylnie leki moczopędne lub leki rozszerzające naczynia oraz występowanie co najmniej jednego z objawów:

- (1) duszność w spoczynku lub wentylacja mechaniczna;
- (2) skąpomocz nie wynikający z hipowolemii;
- (3) ciśnienie zaklinowania płucnych naczyń włosowatych 18 mmHg lub wyższe oraz wskaźnik sercowy 2,2 l/min/m<sup>2</sup> lub mniej.

Wyniki pierwszorzędowego oraz drugorzędowego punktu końcowego przedstawia Tabela 3.

**Tabela 3.** Wyniki pierwszorzędowego oraz drugorzędowego punktu końcowego badania SURVIVE.

	<b>Lewosimendan</b> (n =664)	<b>Dobutamina</b> (n = 663)	<b>HR (95% CI)</b>	<b>p</b>
<b>Pierwszorzędowy punkt końcowy</b>				
<b>Śmiertelność z jakiegokolwiek przyczyny w ciągu 180 dni</b>	173 (26)	185 (28)	0.91 (0.74-1.13)	0,40
<b>Drugorzędowy punkt końcowy</b>				
<b>Śmiertelność z jakiegokolwiek przyczyny w ciągu 31 dni</b>	79 (12)	91 (14)	0.85 (0.63-1.15)	0,29
<b>Średnia zmiana BNP po 24 godzinach od wartości wyjściowej, pg/ml</b>	n = 628) -631	(n = 611) -397		0,001
<b>Śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowa w ciągu 180 d</b>	157 (24)	171 (26)	0.90 (0.72-1.12)	0,33

BNP- peptyd natriuretyczny typu B

Badanie SURVIVE wykazało brak istotnej różnicy w przeżyciu pomiędzy grupami pacjentów leczonych lewosimendanem, a grupą pacjentów leczonych dobutaminą podczas

długoterminowej obserwacji, pomimo dowodów na wczesne obniżenie stężenia BNP w osoczu pacjentów otrzymujących lewosimendan [19].

Badanie REVIVE (*Randomized multicenter Evaluation of Intravenous leVosimendan Efficacy I and II*) składało się z dwóch części [20]. REVIVE I to mniejsze (grupa badana stanowiła 100 pacjentów) pilotażowe badanie, którego celem było sprawdzenie punktów końcowych badania. Z kolei właściwe badanie obejmowało grupę 600 pacjentów. Rekrutowano pacjentów z ADHF, których następnie randomizowano do grupy otrzymującej placebo + standardową terapię lub dożylnie lewosimendan przez 24h + standardowe leczenie. Wszyscy pacjenci mieli dysfunkcję lewej komory, potwierdzoną przez frakcję wyrzutową poniżej 35% w ciągu ostatnich 12 miesięcy. Badanie rozpoczęto od dożylnego podania dawki nasycającej 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  przez 10 minut (6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , jeśli pacjent otrzymywał jednocześnie dożylny środek rozszerzający naczynia lub lek o działaniu inotropowym dodatnim), następnie kontynuowano wlew w dawce 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  przez 24 godziny. Gdy pacjent tolerował leczenie po 50 min zwiększano dawkę do 0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  i utrzymywano przez 23 godziny. W sytuacji braku tolerancji leczenia szybkość wlewu zredukowana w granicach od 0,05 do 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  lub przerywano wlew. Jako pierwszorzędowy punkt końcowy przyjęto ocenę zmiany stanu klinicznego pacjentów w ciągu pierwszy 5 dni po randomizacji. Stan kliniczny każdego pacjenta w ciągu badania charakteryzowano jako „poprawiony”, „niezmieniony” lub „gorszy”. Drugorzędowe punkty końcowe w obu badaniach REVIVE I i REVIVE II obejmowały:

- 1) zmiany stężenia BNP w osoczu po 24 godzinach;
- 2) zmiany w ogólnej ocenie pacjenta po 6 godzinach;
- 3) zmiany w odczuwaniu duszności przez pacjenta po 6 godzinach;
- 4) liczba dni życia i czas poza szpitalem w ciągu pierwszych 14 dni po randomizacji;
- 5) czas do zgonu lub nasilenia niewydolności serca w ciągu 31 dni;
- 6) klasyfikacja funkcjonalna NYHA w 5 dniu;
- 7) śmiertelność z jakiegokolwiek przyczyny w ciągu pierwszych 90 dni.

Uzyskane wyniki wykazały, że wśród pacjentów otrzymujących lewosimendan w porównaniu z placebo (58 vs. 44) nastąpiła poprawa we wszystkich 3 punktach czasowych (6 godzin, 24 godziny i 5 dni), podczas gdy mniej pacjentów otrzymujących lewosimendan (58 vs. 82)

doświadczyło pogorszenia stanu klinicznego ( $p= 0,015$ ). Różnice te były widoczne pomimo częstszego nasilenia terapii wspomagającej w grupie placebo (79 vs. 45). Poprawa samooceny pacjentów i spadek stężenia BNP po zastosowaniu lewosimendanu utrzymywały się przez 5 dni i były związane ze skróceniem czasu hospitalizacji ( $p= 0,009$ ).

Badania REVIVE wykazują, że ciągły dożylny wlew lewosimendanu przez 24 godziny, dodany do standardowej terapii, ma korzystny wpływ objawowy na krótkoterminowy stan kliniczny pacjentów. Stosowanie lewosimendan wiązało się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych, na co miała wpływ stosowana dawka [20].

### 1.1.5 Odziaływanie na fosfodiesterazy

Mechanizmem działania lewosimendanu wymagającym osobnego rozważenia jest wpływ na enzym PDE. Mechanizm ten wiąże się z potencjalnym wpływem na aktywność płytek krwi oraz ich funkcję. PDE jest powszechnie występującym w tkankach człowieka enzymem, który katalizuje hydrolizę wiązań fosfodiesterowych. Odpowiada za hydrolizę wewnątrz komórkową cAMP oraz cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP). Cząsteczki cAMP oraz cGMP biorą udział w procesach związanych z metabolizmem komórki. Dlatego cAMP oraz w mniejszym stopniu cGMP, stały się punktem uchwytu, odgrywającym istotną rolę w regulacji mechanizmów inotropowych w ludzkim mięśniu sercowym. Cząsteczka cAMP pełni wiele funkcji w różnych tkankach. Zlokalizowanie różnych izoenzymy fosfodiesterazy w zależności od tkanki przedstawia Tabela 4. Leki hamujące działanie enzymu fosfodiesterazy oddziałują na serce, płuca, naczynia krwionośne, a także na funkcję płytek krwi oraz mechanizmy zapalne. Wiele z tych leków wpływa na więcej niż jeden izoenzym, a wiele tkanek posiada więcej niż jeden izoenzym. W rezultacie inhibitory fosfodiesterazy (PDEI) mogą mieć wielorakie działanie [21].

**Tabela 4.** Izoenzymy fosfodiesterazy wraz z miejscami występowania w organizmie człowieka oraz hydrolizowane cząsteczki [wg [21]].

PDE izoenzym typ	Miejsce działania	Hydrolizowana cząsteczka
1	Serce, mózg, nerki, wątroba, mięśnie szkieletowe, mięśnie gładkie	cGMP; cAMP
2	Kora nadnerczy, mózg, ciała jamiste, serce, wątroba, nerki, mięśnie gładkie dróg oddechowych, płytki krwi	cGMP; cAMP
3	Serce, ciała jamiste, płytki krwi, mięśnie	cAMP



	gładkie, wątroba, nerki, limfocyty T, limfocyty B, bazofile, komórki tuczne, monocyty, makrofagi, komórki śródbłonna	
<b>4</b>	Nerki, płuca, serce, mięśnie szkieletowe, mięśnie gładkie (naczyniowe, trzewne, drogi oddechowe), płytki krwi, większość komórek zapalnych (limfocyty T, limfocyty B, bazofile, komórki tuczne, monocyty, makrofagi, komórki śródbłonna, eozynofile, neutrofile)	cAMP
<b>5</b>	Ciała jamiste, płytki krwi, mięśnie szkieletowe, nerki, mięśnie gładkie, płytki krwi	cGMP
<b>6</b>	Siatkówka oka	cGMP
<b>7</b>	Mięśnie szkieletowe, serce, nerka, drogi oddechowe, limfocyty T, limfocyty B, monocyty, eozynofile	cAMP
<b>8</b>	8A: jądra, jajniki, jelito kręte, okrężnica, serce, mózg, nerki, trzustka, drogi oddechowe, monocyty 8B: tarczyca	cAMP
<b>9</b>	Śledziona, jelito cienkie i mózg	cGMP
<b>10</b>	Mózg	cAMP; cGMP
<b>11</b>	Mięśnie szkieletowe, prostata, nerki, wątroba, przysadka mózgowa, gruczoły ślinowe, jądra	cAMP; cGMP

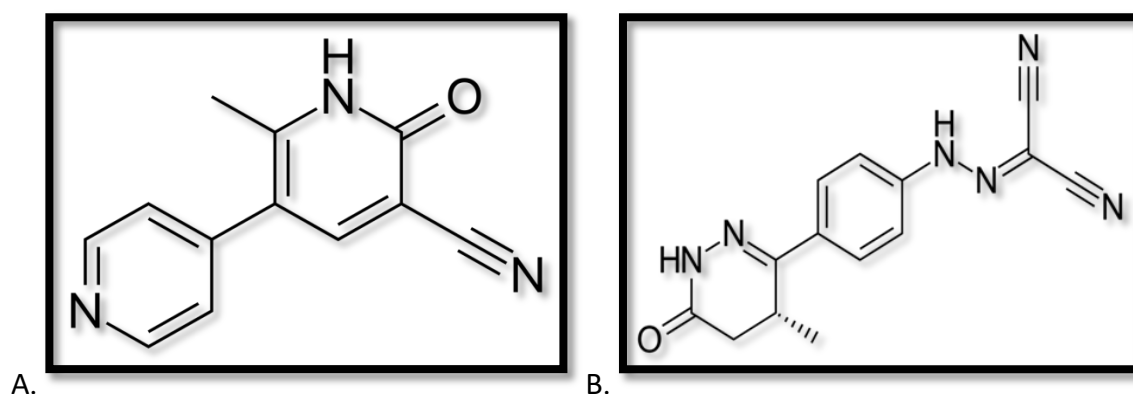
cAMP- cykliczny adenozyomonofoforan; cGMP- cykliczny guanozyomonofoforan;

Lewosimendan oraz jego aktywny metabolit OR-1896, wykazują podobieństwa strukturalne do rodziny inhibitorów PDE. Rycina 4 przedstawia porównanie struktury chemicznej inhibitora PDE oraz lewosimendanu. Hamowanie PDE prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, czego konsekwencją jest działanie inotropowe w komórkach mięśnia sercowego. Istnieją silne przesłanki wskazujące, że lewosimendan oraz OR-1896 mogą częściowo działać poprzez hamowanie PDE [13][22]. W badaniach eksperymentalnych wykazano również, że lewosimendan posiada właściwości hamujące aktywność PDE III przy wysokich stężeniach [23] [24].

Edes i wsp. [24] wykazali efekt polegający na hamowaniu aktywności enzymatycznej PDE III przy wyższych stężeniach (>0,3  $\mu\text{M}$ ), natomiast w klinicznie zalecanym zakresie terapeutycznym leku (0,03-0,3  $\mu\text{M}$ , czyli 10–100 ng/ml), działanie to nie jest widoczne lub

jest słabiej wyrażone [24]. Podobne wyniki otrzymali Lancaster i wsp. [23]. w swoich badaniach *ex vivo* na miocytach wyizolowanych z komórek sercowych świnki morskiej [23]. Wyniki te sugerują, że w terapeutycznie istotnych stężeniach lewosimendan może wywoływać znaczące działanie inotropowe bez wpływu na wewnątrzkomórkowe stężenie  $Ca^{2+}$ , ale w wyższych stężeniach może również hamować PDE [23][24].

Kolejnym badaniem oceniającym zależne od dawki działanie lewosimendanu oraz jego aktywnego metabolitu było badanie Szilagyi i wsp. [25]. W próbach *ex vivo* oceniali działanie hamujące aktywność PDE przez lewosimendan oraz OR-1896 na dwóch izoformach PDE III i IV dominujących w tkance lewej komory serca. Lewosimendan był 40-krotnie silniejszym i 3-krotnie bardziej selektywnym inhibitorem PDE III- IC(50)- połowa maksymalnego zahamowania dla PDE III= 2,5 nM i IC(50) dla fosfodiesterazy IV=25  $\mu$ M, współczynnik selektywności około 10000, natomiast OR- 1896 IC(50) dla PDE III=94 nM i IC(50) dla PDE IV= 286  $\mu$ M, współczynnik selektywności około 3000. Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę, że zarówno lewosimendan jak i OR-1896 wywierają działanie inotropowe dodatnie poprzez mechanizm uwrażliwiania na  $Ca^{2+}$ , a nie przez równoczesne hamowanie izoenzymów PDE III i IV w mięśniu sercowym przy ich maksymalnych stężeniach w osoczu [25].



**Ryc. 4.** Struktura chemiczna: A. Inhibitor PDE III (Milrinon); B. Lewosimendan

## 1.2 Niewydolność serca

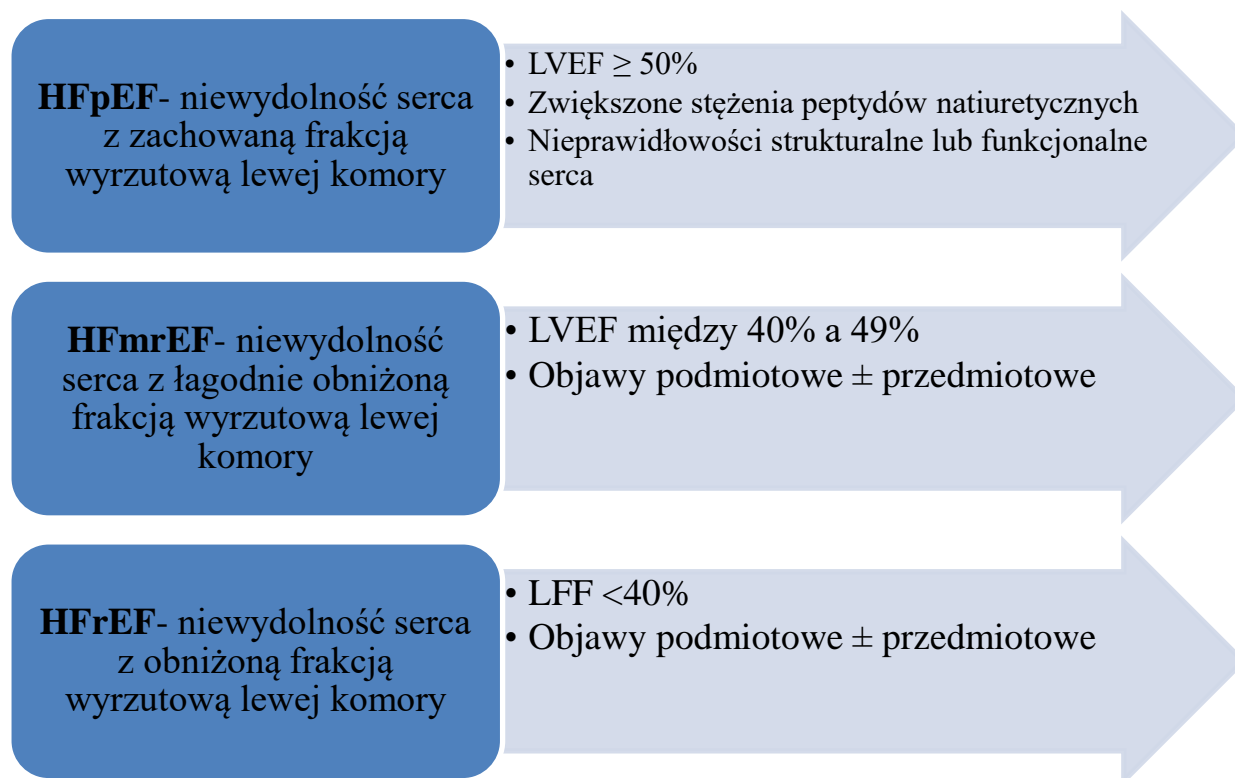
### 1.2.1 Definicja

HF jest złożonym zespołem klinicznym obejmującym wystąpienie typowych objawów podmiotowych:

- duszność
- obrzęki kończyn dolnych
- obniżona tolerancja wysiłku,

którym mogą towarzyszyć objawy takie jak poszerzenie żył szyjnych, trzeszczenia nad płucami oraz obrzęki obwodowe. Stan ten jest konsekwencją nieprawidłowości strukturalnych serca lub zaburzeniami czynnościowymi, które prowadzą do podwyższenia ciśnienia wewnątrzsercowego oraz niewystarczającej pojemności minutowej serca w spoczynku lub podczas wysiłku. Identyfikacja przyczyny leżącej u podłoża dysfunkcji serca jest niezbędna w diagnostyce niewydolności serca. Najczęściej jest spowodowana dysfunkcją mięśnia sercowego prowadzącą do zaburzeń czynności skurczowej lub rozkurczowej. Jednak patologia zastawek, osierdzia i wsierdzia oraz zaburzenia rytmu serca i przewodzenia mogą również powodować lub przyczyniać się do niewydolności [26][27].

Tradycyjnie niewydolność serca dzieli się na różne fenotypy na podstawie pomiaru frakcji wyrzutowej lewej komory (LVEF, *left ventricular ejection fraction*). Rycina 5 przedstawia klasyfikację HF z uwzględnieniem LVEF.



**Ryc. 5.** Klasyfikacje HF z uwzględnieniem LVEF (wg [26]).

### 1.2.2 Epidemiologia

Obecnie częstość występowania HF w Europie wynosi około 3/1000 osób rocznie (wszystkie grupy wiekowe) lub około 5/1000 osób rocznie u dorosłych. Częstość występowania HF wynosi 1-2% dorosłej populacji. Badania zwykle obejmują tylko zdiagnozowane przypadki niewydolności. Rzeczywista częstość występowania prawdopodobnie jest wyższa. Częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem: od około 1% u osób w wieku <55 lat do >10% u osób powyżej 70 roku życia. Ogólnie uważa się, że spośród osób z HF około 50% ma HFrEF, a 50% HFpEF/HFmrEF, głównie na podstawie badań pacjentów hospitalizowanych. Rejestr długoterminowy Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC, *European Society of Cardiology*) w warunkach ambulatoryjnych podaje, że 60% ma HFrEF, 24% ma HFmrEF, a 16% ma HFpEF. Nieco ponad 50% pacjentów z HF to kobiety [26][28].

Klasyfikację czynnościową NYHA (*New York Heart Association*) stworzono w celu określania nasilenia objawów oraz stopnia nietolerancji wysiłku fizycznego. NYHA obejmuje cztery stopnie, które przedstawia Tabela 5 [27].

**Tabela 5.** Klasyfikacja czynnościowa wg NYHA.

<b>Klasa I</b>	Bez ograniczenia aktywności fizycznej; zwykła aktywność fizyczna nie powoduje uczucia duszności, zmęczenia lub kołatania serca
<b>Klasa II</b>	Niewielkie ograniczenie aktywności fizycznej; komfort w spoczynku, natomiast zwykła aktywność fizyczna powoduje uczucie duszności, zmęczenia lub kołatania serca
<b>Klasa III</b>	Znaczne ograniczenie aktywności fizycznej; komfort w spoczynku, natomiast mniejsza niż przeciętna aktywność fizyczna powoduje uczucie duszności, zmęczenia lub kołatania serca
<b>Klasa IV</b>	Nieemożność wykonywania jakiegokolwiek aktywności fizycznej bez wystąpienia dyskomfortu; objawy niewydolności serca w spoczynku; po podjęciu jakiegokolwiek

### 1.2.3 Diagnostyka oraz leczenie przewlekłej niewydolności serca

Do najistotniejszych badań wykorzystywanych w diagnostyce HF zaliczamy:

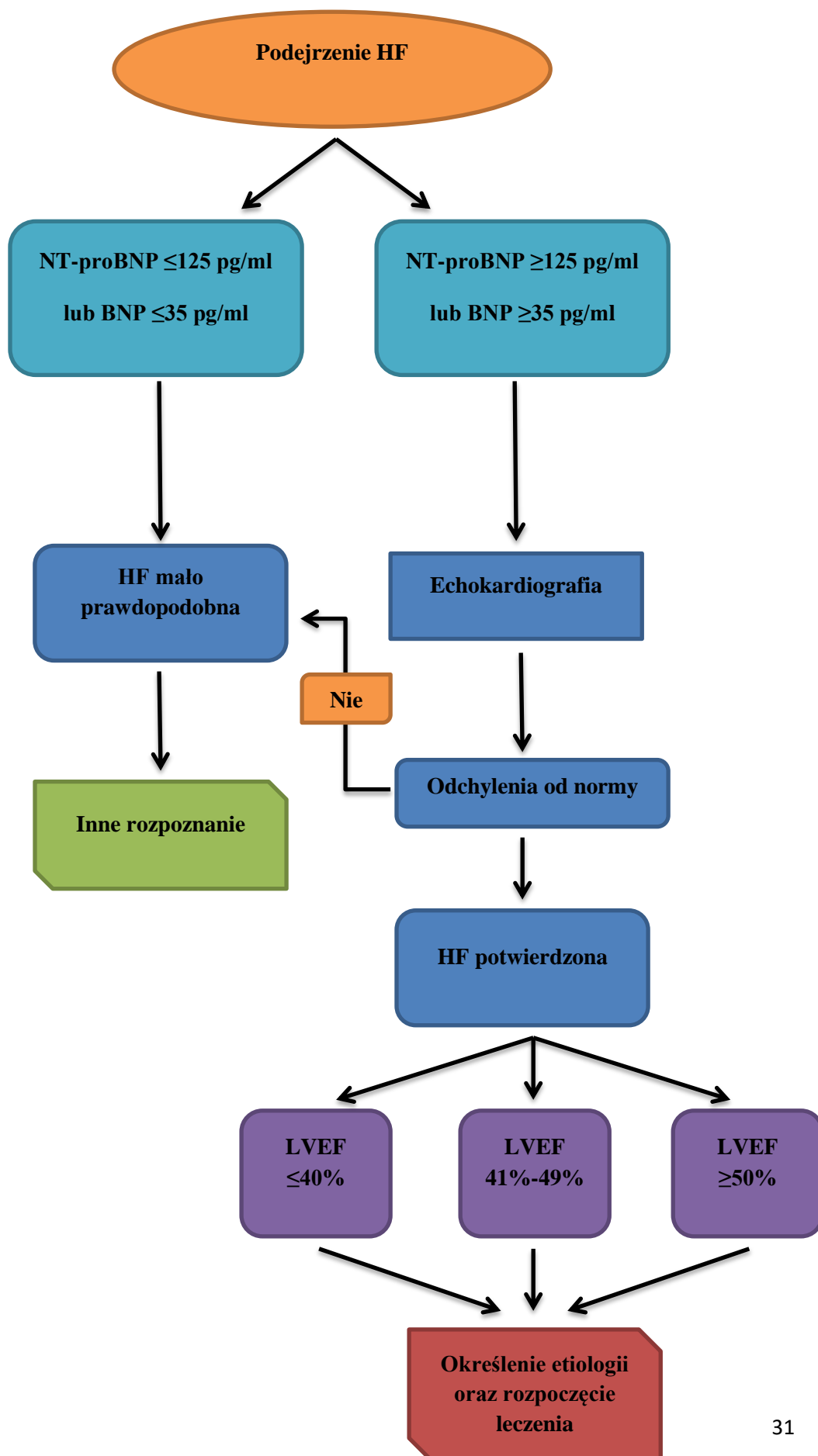
- badanie elektrokardiograficzne (EKG)- ocena rytmu serca, przerostu lewej komory, nieprawidłowe załamki Q (wskazujące na obecność blizny w obrębie miokardium);
- badanie radiologiczne (RTG)- ocena wielkości serca oraz cech zastoju w krążeniu płucnym;
- badanie echokardiograficzne- ocena anatomii serca oraz funkcji skurczowej i rozkurczowej komór sercowych.

Badania laboratoryjne w diagnostyce HF pełnią funkcję pomocniczą, która dotyczy m.in. oceny stopnia zaawansowania niewydolność, uszkodzenia innych narządów oraz odpowiedzi na zastosowane leczenie. Rycina 6 przedstawia podstawowe badania laboratoryjna wykonywane w krwi.

- **Morfologia krwi**
- **Stężenie elektrolitów**
- **Gazometria i równowaga kwasowo-zasadowa**
- **Aminotransferaza alaninowa (ALT, *alanine transaminase*), aminotransferaza asparaginianowa (AST, *aspartate transaminase* )**
- **Bilirubina**
- **D-dimery**
- **Profil lipidowy**
- **cTn**
- **Kreatynina**
- **Mocznik**
- **Szacunkowa wielkość przesączania kłębuszkowego (eGFR, *estimated glomerular filtration rate*)**

**Ryc. 6.** Podstawowe badania laboratoryjne wykonywane podczas diagnostyki niewydolności serca.

Oznaczanymi laboratoryjnie markerami niewydolności serca są peptydy natriuretyczne: BNP, N-końcowy fragment prekursora BNP (NT-proBNP) oraz środkowy fragment propeptydu natriuretycznego typu A (MR-proANP) [29][30]. Wytyczne ESC [26] rekomendują algorytm postępowania diagnostycznego w oparciu o stężenie peptydów natriuretycznych (klasa zaleceń I, poziom wiarygodności danych naukowych B) [26], co przedstawiono na Rycinie 7.



**Ryc. 7** Algorytm diagnostyczny w kierunku rozpoznania HF (wg [26]).

Rycina 8 przedstawia leki stosowane w celu zmniejszenia śmiertelności oraz poprawy jakości życia pacjentom z rozpoznaną HFrEF.

#### **Inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (ACEI)**

- Klasa zaleceń- I
- Poziom wiarygodności danych naukowych- A

#### **Beta-adrenolityki**

- Klasa zaleceń- I
- Poziom wiarygodności danych naukowych- A

#### **Antagoniści receptora mineralokortykoidowego (MRA)**

- Klasa zaleceń- I
- Poziom wiarygodności danych naukowych- A

#### **Antagonista receptora angiotensyny- inhibitor neprylizyny (ARNI)**

- Klasa zaleceń- I
- Poziom wiarygodności danych naukowych- B

#### **Inhibitory kotransportera sodowoglukozowego typu 2 (SGLT2)**

- Klasa zaleceń- I
- Poziom wiarygodności danych naukowych- A

#### **Diuretyki pętlowe**

- Klasa zaleceń- I
- Poziom wiarygodności danych naukowych C

#### **Antagonista receptora angiotensynowego (ARB)**

- Klasa zaleceń- I
- Poziom wiarygodności danych naukowych- B

#### **Inhibitor kanału $I_f$**

- Klasa zaleceń- IIa
- Poziom wiarygodności danych naukowych- B

#### **Stymulator rozpuszczalnej cyklazy guanylowej**

- Klasa zaleceń-IIIb
- Poziom wiarygodności danych naukowych- B

#### **Połączenie hydralazyny i dwuazotanu izosorbidu**

- Klasa zaleceń- IIa
- Poziom wiarygodności danych naukowych- B



**Ryc. 8.** Leki stosowane w leczeniu pacjentów z HF (wg [26]).

#### **1.2.4 Ostra niewydolność serca**

Ostra niewydolność serca (AHF, *acute heart failure*) to termin odnoszący się do sytuacji, w której dochodzi do szybkiego lub nasilającego wystąpienia objawów lub oznak HF, na tyle ciężkich, że pacjent wymaga pilnej pomocy lekarskiej. Prowadzi to do nieplanowanego przyjęcia do szpitala lub wizyty na oddziale ratunkowym. AHF jest główną przyczyną hospitalizacji osób w wieku >65 lat i wiąże się z wysoką śmiertelnością oraz wskaźnikami rehospitalizacji. Śmiertelność wśród pacjentów hospitalizowanych z powodu AHF wynosi od 4% do 10%, natomiast śmiertelność w ciągu roku po wypisie ze szpitala może wynosić 25-30% [26].

AHF może być pierwszym objawem HF (*de novo*) wywołanym pierwotnym zaburzeniem czynności mięśnia sercowego lub co występuje znacznie częściej być wynikiem ADHF [27].

Do najczęstszych przyczyn AHF *de novo* zaliczamy:

- ostra dysfunkcja mięśnia sercowego (w mechanizmie niedokrwiennym, zapalnym lub toksycznym)
- ostra niedomykalność zastawkowa
- ostra tamponada serca.

Ostra dekompensacja przewlekłej HF może występować bez uchwytnej przyczyny, jednak znacznie częściej udaje się określić jeden lub większą liczbę czynników mających bezpośredni wpływ na rozwinięcie się AHF [27]. Przykładowe czynniki przedstawia Rycina 9.

### Przyczyna mechaniczna

- uraz klatki piersiowej
- zabieg kardiochirurgiczny
- rozwarstwienie lub zakrzepica w obrębie aorty
- ostra dysfunkcja zastawki własnej lub protezy zastawkowej w przebiegu infekcyjnego zapalenia wsierdzia
- pęknięcie wolnej ściany
- pęknięcie przegrody międzykomorowej
- ostra niedomykalność mitralna

### Stany zapalne

- zapalenie płuc
- infekcyjne zapalenie wsierdzia
- sepsa

### Zaburzenia metaboliczne/hormonalne

- zaburzenia funkcji tarczycy
- kwasica w przebiegu cukrzycy
- zaburzenia funkcji nadnerczy
- nieprawidłowości związane z ciążą i porodem

### Nasilenie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc

### Substancje toksyczne

- substancje psychoaktywne
- alkohol

### Ostry zespół wieńcowy

### Duży wzrost ciśnienia tętniczego

### Leki

- niesteroidowe leki przeciwzapalne
- kortykosteroidy
- leki o działaniu inotropowo ujemnym
- kardiotoksyczne chemioterapeutyki

### Tachyarytmie i bradyarytmie

### Zwiększone napięcie współczulne, kardiomiopatia stresowa

**Ryc. 9.** Przykładowe czynniki wywołujące ostrą dekomensację przewlekłej niewydolności serca (wg [27]).

Jak wskazują wytyczne ESC [26] można wyróżnić cztery główne prezentacje kliniczne AHF z możliwością nakładania się symptomów pomiędzy nimi. Prezentacje kliniczne opierają się głównie na obecności objawów przeciążenia serca oraz hipoperfuzji obwodowej i wymagają różnych podejść terapeutycznych.

- ✚ ADHF- to występująca najczęstsza postać AHF (stanowi 50-70%). Zazwyczaj dotyczy pacjentów z wcześniej rozpoznaną HF oraz dysfunkcją serca w całym spektrum LVEF, dodatkowo może obejmować dysfunkcję prawej komory (RV, *right ventricle*). ADHF charakteryzuje stopniowy początek w porównaniu z innymi prezentacjami klinicznymi AHF. W przebiegu ADHF dochodzi do zaburzenia mechanizmów kompensacyjnych, powodując objawy przedmiotowe i podmiotowe niewydolności LV lub RV [26] [31].
- ✚ Ostry obrzęk płuc jest związany z przekrwieniem płuc. Kryteria kliniczne rozpoznania ostrego obrzęku płuc obejmują duszność z orthopnoea, niewydolność oddechową (hipoksemia-hiperkapnia), przyspieszone oddychanie (>25 oddechów/min) oraz zwiększoną pracę oddechową [26].
- ✚ Izolowana niewydolność prawej komory wiąże się ze wzrostem ciśnienia w prawej komorze oraz przedsionku, a ponadto z przekrwieniem ogólnoustrojowym. Niewydolność RV może również upośledzać napełnianie lewej komory serca (LV, left ventricular) ostatecznie zmniejszając układowy rzut serca, poprzez współzależność komór [26].
- ✚ Wstrząs kardiogeny (CS, *cardiogenic shock*) jest spowodowany ciężkim upośledzeniem czynności mięśnia sercowego, co skutkuje zmniejszoną pojemnością minutową serca, hipoperfuzją narządową i niedotlenieniem. Pierwszym etapem w rozwoju CS jest zmniejszenie kurczliwości mięśnia sercowego, prowadzi to do zmniejszonej pojemności minutowej serca, niedociśnienia, ogólnoustrojowego skurczu naczyń oraz niedokrwienia serca. Cechą charakterystyczną jest zwężenie naczyń obwodowych i uszkodzenie końcowych narządów, które wynika z nieefektywnej objętości wyrzutowej i niedostatecznej kompensacji krążenia [32]. Rozpoznanie wstrząsu kardiogennego wymaga obecności klinicznych objawów hipoperfuzji, takich jak zimne poty, skąpomocz, splątanie, zawroty głowy, nitkowane tętno [26].

### 1.2.4.1 Postępowanie farmakologiczne w AHF

#### Leki moczopędne

Leki moczopędne (diuretyki) odpowiedzialne są za zwiększenie wydalania sodu i wody z organizmu przez nerki oraz posiadają właściwości wazodylatacyjne. Terapia lekami moczopędnymi obejmuje większość pacjentów z AHF wykazujących objawy przewodnienia oraz zastoju [26][27]. Diuretyki pętlowe są powszechnie stosowane ze względu na ich szybki początek działania i skuteczność. Jednak dane określające ich optymalne dawkowanie, czas oraz sposób podawania są ograniczone. Wysokie dawki leków moczopędnych mogą powodować większą aktywację neurohormonalną, zaburzenia elektrolitowe oraz często wiążą się z gorszym rokowaniem. Na podstawie badań klinicznych można stwierdzić, że odpowiednią strategią jest rozpoczęcie podawania dożylnego leków moczopędnych w małych dawkach, następnie ocenia się odpowiedź moczopędną zwiększając dawkę, gdy jest ona niewystarczająca [33][34]. Leczenie moczopędne należy rozpocząć od podania dożylnego furosemidu lub równoważnej dawki bumetanidu lub torasemidu, odpowiadającej 1-2-krotności dziennej dawki doustnej przyjmowanej przez pacjenta przed przyjęciem. Wytyczne wskazują przejście na leczenie doustne, gdy stan kliniczny pacjenta jest stabilny. [26].

#### Leki rozszerzające naczynia

Stosowane obecnie leki rozszerzające naczynia to azotany lub nitroprusydek sodu. Działanie tych leków polega na rozszerzaniu naczyń żylnych oraz tętnic, co prowadzi do: zmniejszenia powrotu żylnego do serca-> mniejszego przekrwienia-> mniejszego obciążenia następczego-> zwiększenia objętości wyrzutowej serca-> złagodzenia objawów.

Azotany działają głównie na żyły obwodowe, nitroprusydek natomiast w sposób zrównoważonym rozszerza zarówno naczynia tętnicze jak i żyłne. Dożylnie leki rozszerzające naczynia można rozważyć w celu złagodzenia objawów AHF, gdy ciśnienie skurczowe (SBP, *systolic blood pressure*) wynosi >110 mmHg [26]. Tabela 6 przedstawia stosowane w AHF leki wazodylatacyjne wraz z dawkowaniem.

**Tabela 6.** Podawane dożylnie leki rozszerzające naczynia (wg [27]).

<b>Lek rozszerzający naczynia</b>	<b>Dawkowanie</b>
Nitrogliceryna	Początkowo 10–20 µg/min, można zwiększać do 200 µg/min
Dwuazotan izosorbidu	Początkowo 1 mg/h, można zwiększać do 10 mg/h
Nitroprusydek	Początkowo 0,3 µg/kg/min, można zwiększać do 5 µg/kg/min
Nesiritida	Bolus 2 µg/kg + wlew 0,01 µg/kg/min

### Leki inotropowe

Funkcją leków inotropowych jest poprawa kurczliwości mięśnia sercowego niezależnie od zmian częstości akcji serca i warunków obciążenia [35]. Wykorzystywanie leków o działaniu inotropowo dodatnim powinno być ograniczone do pacjentów z dysfunkcją skurczową LV, małym rzutem serca i niskim SBP (<90 mmHg), co skutkuje słabą perfuzją życiowo istotnych narządów. Wytyczne ESC [26] wskazują jednak, aby terapię lekami inotropowymi stosować ostrożnie, zaczynając od małych dawek, które są następnie zwiększane w sytuacji, gdy jest to wymagane. Istotną kwestią jest monitorowanie parametrów życiowych pacjenta (tętno, ciśnienie, EKG, diureza). Jest to bardzo istotne, ponieważ leki inotropowe- zwłaszcza te oddziałujące na receptory adrenergiczne, mogą powodować tachykardię zatokową, zwiększać częstość rytmu komór u pacjentów z migotaniem przedsionków (AF, *atrial fibrillation*), indukować niedokrwienie mięśnia sercowego, zaburzenia rytmu oraz zwiększać śmiertelność [26]. Tabela 7 przedstawia najpowszechniej stosowane leki inotropowo dodatnie w leczeniu pacjentów z AHF.

**Tabela. 7.** Leki o działaniu inotropowym dodatnim (wg [36][37][38]).

<b>Lek</b>	<b>Mechanizm działania</b>	<b>Klasa zaleceń/ Poziomy wiarygodności danych</b>
<b>Digoksyna</b>	Inhibitor pompy Na-K	IIb/C
<b>Dobutamina</b>	Agonista receptora: $\beta_1 > \beta_2 > \alpha$	IIb/ C
<b>Dopamina</b>	Zależne od dawki działanie	IIb/ C

	na receptory adrenergiczne i dopaminergiczne	
<b>Norepinefryna</b>	Endogenna katecholamina; stymuluje receptory adrenergiczne $\beta$ i $\alpha$	IIb/ C
<b>Epinefryna</b>	Endogenna katecholamina; stymuluje receptory adrenergiczne $\beta$ i $\alpha$	IIb/ C
<b>Lewosimendan</b>	Uwrażliwianie na $Ca^{2+}$	IIb/C
<b>Milrinon</b>	Inhibitor fosfodiesterazy	IIb/ C

Na- sól; K- potas;  $Ca^{2+}$ - jony wapnia

- Digoksyna jest glikozydem nasercowym o właściwościach inotropowych. Mechanizm działania leku obejmuje hamowanie pompy sodowo-potasowej trifosfatazy adenozy (ATPazy) na poziomie komórkowym zapobiegając transportowi sodu z przestrzeni wewnątrzkomórkowej na zewnątrz komórki. Proces ten z kolei oddziałuje na pompy sodowo-wapniowe, w konsekwencji czego podniesiony zostaje wewnątrzkomórkowy poziom wapnia poprzez zmniejszanie jego wypływu, który odpowiada za działanie inotropowe dodatnie digoksyny [36]. Dodatkowo w leczeniu AHF digoksynę należy rozważyć u pacjentów z AF, u których występuje przyspieszony rytm komór (powyżej 110 uderzeń na minutę) pomimo stosowania beta-adrenolityków [26].
- Dobutamina to syntetyczna katecholamina. Zwiększenie kurczliwości serca odbywa się poprzez działanie stymulujące na receptory  $\beta$ -1 mięśnia sercowego. Wpływa również na układ naczyń obwodowy ze względu na łączne działanie na naczyniowe receptory  $\alpha$ -1 i  $\beta$ -2 [38].
- Dopamina jest endogenną katecholaminą, która wywiera zależny od dawki wpływ na układ sercowo-naczyniowy poprzez interakcję z czterema różnymi receptorami: dopaminergicznym typu 1 i typu 2 oraz adrenergicznym  $\alpha$ -1 i  $\beta$ -1. W małych dawkach (<3  $\mu$ g/kg/min) dopamina powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych w organizmie, w tym tętnic wieńcowych i nerkowych [36][38].

- Norepinefryna jest cząsteczką endogenną, która najsilniej działa na naczyniowe receptory adrenergiczne  $\alpha$ -1, wywołując skurcz naczyń zwiększając skurczowe i rozkurczowe ciśnienie krwi. Działa również na sercowe receptory  $\beta$ -1, wywierając w ten sposób działanie chronotropowe i inotropowe. W oparciu o te właściwości norepinefryna jest stosowana przede wszystkim u pacjentów z AHF, u których występuje wstrząs kardiogeny, zawsze w połączeniu z innym, silniejszym lekiem inotropowym. Norepinefrynę stosuje się również w połączeniu z lekami rozszerzającymi naczynia, aby zapobiec rozwojowi niedociśnienia [38].
- Epinefryna to endogenna katecholamina, wykazuje działanie zależne od dawki. Podawana w niższych dawkach do 0,01  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , działa głównie na obwodowe receptory adrenergiczne  $\beta$ -2, powodując w ten sposób rozszerzenie naczyń. Jednak przy podawaniu ze zwiększoną szybkością  $>0,2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  przeważa wpływ na receptory  $\beta$ -1 i  $\alpha$ -1, co skutkuje ogólną dodatnią inotropią i skurczem naczyń. Skurcz naczyń obejmuje nie tylko naczynia obwodowe, ale także tętnicze i żyłne krążenie płucne [38].
- Milrinon- inhibitor PDE typu III, powszechnie stosowany lek inotropowy u pacjentów z ciężką niewydolnością serca lub wstrząsem kardiogenym. Hamuje PDE III- enzym fizjologicznie rozkładający wewnątrzkomórkowy cAMP, co w konsekwencji prowadzi do gromadzenia cAMP w komórce, powodując aktywację kinazy białkowej A. Ułatwia to wnikanie większej ilości jonów wapnia do komórki mięśnia sercowego, wzmacniając w ten sposób mostkowanie krzyżowe aktyna-miozyna, prowadząc do zwiększonej kurczliwości serca. Mechanizm ten jest niezależny od szlaku beta-adrenergicznego [38].

#### Nowe leki inotropowe

- Omecamtiv mecarbil (OM) to cząsteczką, która zwiększa skuteczność skurczu mięśnia sercowego poprzez selektywną aktywację określonych izoform miozyny sercowej. Zwiększa szybkość obrotu ATP w miocytach sercowych, przyspiesza zależne od aktyny uwalnianie fosforanów i spowalnia uwalnianie adenylozynytrifosforanu (ADP, *adenosine diphosphate*). Zwiększając dostępność substratu energetycznego miozyny, OM wydłuża czas kontaktu miozyny na cząsteczce aktyny, zwiększając liczbę cząsteczek miozyny związanych z aktyną, czyli liczbę aktywnych mostków krzyżowych,

które uczestniczą w generowaniu siły podczas skurczu. OM wydłuża skurcz poprzez wydłużenie czasu wyrzutu skurczowego. Dodatkowo, wewnątrzkomórkowe poziomy cAMP oraz  $Ca^{2+}$  pozostają niezmienione. Właściwość ta sugeruje, że OM może nie wywoływać niedokrwienia mięśnia sercowego i arytmii, co jest powszechnym problemem w przypadku konwencjonalnych leków inotropowych [39].

#### Modulacja SERCA2a

- Uniwersalną cechą, przyczyniającą się do zmniejszonej kurczliwości w ludzkich i doświadczalnych niewydolnych sercach, jest upośledzenie sekwestracji wapnia do retikulum sarkoplazmatycznego (SR, sarcoplasmic reticulum) [40]. Retikulum sarkoplazmatyczne  $Ca^{2+}$ ATPaza (SERCA2a) to enzym kontrolujący wychwyt zwrotny wolnego wapnia do SR pod koniec skurczu, regulując zarówno rozluźnienie jak i skurcz mięśnia sercowego. W HF dochodzi do obniżenia aktywności SERCA2a, co przyczynia się do zaburzeń kurczliwości i arytmogenezy [39]. Badania przedkliniczne wykazały, że przywrócenie ekspresji SERCA2a poprzez dostarczenie genu SERCA2a specyficznego dla serca, za pośrednictwem adenowirusa (AAV2/1SERCA2a), spowodowało zależną od dawki poprawę wydolności serca wraz ze zmniejszeniem ekspresji BNP poprzez odwrócenie fenotypu molekularnego HF [41].

#### Leki obkurczające naczynia

Stosowanie leków obkurczających naczynia jest istotne w przypadku pacjentów z hipotonią. Zwiększenie ciśnienia tętniczego prowadzi do poprawy perfuzji ważnych narządów. Jednak odbywa się to kosztem wzrostu obciążenia następczego LV. Wśród leków o silnym działaniu zwężającym naczynia krwionośne obwodowe u pacjentów z ciężkim niedociśnieniem można wyróżnić norepinefrynę i dopaminę w wyższych dawkach.

Niektóre badania, choć z pewnymi ograniczeniami, wskazują na stosowanie norepinefryny jako leku pierwszego wyboru w porównaniu z dopaminą lub epinefryną [26].

#### Opioidy

Opiaty łagodzą duszność i niepokój. Jednak wywierają równocześnie szereg działań niepożądanych, w związku z tym nie zaleca się rutynowego stosowania opiatów u pacjentów



z AHF. Działania niepożądane zależne od dawki obejmują nudności, niedociśnienie, bradykardię i depresję oddechową. Jak wskazują wytyczne ESC można je rozważyć u wybranych pacjentów, szczególnie w przypadku silnego/nieuleczalnego bólu, lęku lub w sytuacji paliatywnej. Dostępne badania sugerują, że podawanie morfiny jest związane z większą częstotliwością wentylacji mechanicznej, przedłużoną hospitalizacją, częstszymi przyjęciami na oddział intensywnej terapii i zwiększoną śmiertelnością [26][42][43].

### Profilaktyka zakrzepowo-zatorowa

Według wytycznych ESC, zalecana profilaktyka zakrzepowo-zatorowa obejmuje zastosowanie heparyny (np. heparyny drobnocząsteczkowej) lub innych leków przeciwzakrzepowych, chyba że jest to przeciwwskazane lub niepotrzebne (z powodu istniejącego leczenia doustnymi lekami przeciwzakrzepowymi) [26].

## **1.3 Peptydy natriuretyczne**

### **1.3.1 Charakterystyka**

Pomiar stężenie peptydów natriuretycznych w osoczu jest wskazane jako wstępne badanie w diagnostyce pacjentów prezentujących objawy HF w celu wykluczenia rozpoznania. Podwyższone stężenie peptydów natriuretycznych potwierdza diagnozę, co więcej ocena stężenia peptydów natriuretycznych jest przydatny w ustaleniu rokowania oraz może ukierunkować dalsze badania kardiologiczne [26]. Prawdopodobieństwo rozpoznania HF u pacjentów z prawidłową wartością stężenia peptydów natriuretycznych jest mało prawdopodobne.

Peptydy natriuretyczne są oligopeptydowymi neurohormonami uczestniczącymi w utrzymaniu homeostazy układu sercowo-naczyniowego m.in. poprzez regulację gospodarki wodno-elektrolitowej. Do oznaczanych w organizmie człowieka peptydów natriuretycznych zaliczamy:

- ❖ Predsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP, *atrial natriuretic peptide*)- jest wytwarzany głównie w kardiomiocytach budujących ściany przedsionków i jest przechowywany w ziarnistościach wewnątrzkomórkowych.

- ❖ BNP- jest syntetyzowany w większym stopniu w komórkach mięśnia sercowego komór i przechowywany w niewielkich ilościach. BNP wymaga więcej czasu na syntezę i uwolnienie. BNP jest wolniej reagującym peptydem.

ANP oraz BNP indukują diurezę i natriurezę oraz zmniejszają opór naczyniowy i systemowe ciśnienie krwi [44][45].

- ❖ Peptyd natriuretyczny typu C (CNP, *C-type natriuretic peptide*)- jest wytwarzany w ośrodkowym układzie nerwowym i śródbłonku naczyniowym. Działa jako regulator parakryny. CNP ma jednak nie do końca określony wpływ na układ sercowo-naczyniowy [44][45].
- ❖ Peptyd natriuretyczny Dendroaspis (DNP, *Dendroaspis natriuretic peptide*)- w organizmie człowieka został wykryty w śladowych ilościach w miokardium i osoczu krwi. Z tego względu rola fizjologiczna w organizmie człowieka nie jest w pełni poznana [46].
- ❖ Urodylatyna (URO, *urodilantin*)- uważana za wydalany przez nerki produkt degradacji ANP. Wytwarzany jest w odpowiedzi na wzrost ciśnienia i objętości krwi w kanalikach dystalnych i zbiorczych nefronów [46].

Peptydy natriuretyczne zawierają strukturę pierścieniową zbudowaną z 17 reszt aminokwasowych oraz tworzą wewnątrzcząsteczkowe wiązanie dwusiarczkowe, które prawdopodobnie odpowiada za oddziaływanie z receptorem. Receptory błonowe peptydów natriuretycznych (NPR) są klasyfikowane jako NPR-A, NPR-B oraz NPR-C. Związanie receptorów sprzężonych z cyklazą guanylową prowadzi do wzrostu cGMP, czego konsekwencją jest szereg procesów m.in.:

- diureza,
- natriureza,
- rozszerzenia naczyń krwionośnych,
- hamowania układu renina-angiotensyna-aldosteron,
- zwiększenie relaksacji mięśnia sercowego,
- hamowania zwłóknienia i przerostu ścian komór,
- promowania przeżycia komórek,
- hamowanie odpowiedzi zapalnej.

NPR typu C nie ma aktywności cyklicznej guanylowej i uważa się, że jest receptorem klirensu.

BNP jest bardziej stabilny *in vitro* i ma lepszą skuteczność diagnostyczną niż ANP, w związku z tym peptydy BNP i BNP-pochodne są wartościowymi biomarkerami w praktyce klinicznej, diagnostyce, ocenie ryzyka oraz monitorowaniu pacjentów z HF [44].

Stany kliniczne towarzyszące przeciążeniu objętościowemu oraz ciśnieniowemu (HF i ostry zawał serca (AMI, acute myocardial infarction)) prowadzą do napięcia i rozciągania ścian serca lub niedokrwienia w efekcie do zwiększonej produkcji i uwalniania NP, które wywierają szereg działań ogólnoustrojowych antagonizując przeciążenia objętościowe serca [44][47].

Z preproBNP (preskursor BNP) pod wpływem działania enzymu proteazy serynowej powstaje proBNP, który z kolei przy udziale enzymu koryny zostaje przekształcony w aktywną biologicznie cząsteczkę BNP. Podczas powstawania BNP jako produkt uboczny powstaje N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP, *N-terminal proB-type natriuretic peptide*) [46][47].

Wartość referencyjne dla BNP u pacjentów z nieostrym początkiem objawów wynosi <35 pg/ml, natomiast dla NT-proBNP <125 pg/ml. W przypadku ostrego początku objawów powinno się stosować wyższe wartości BNP <100 pg/ml, NT-proBNP < 300 pg/ml [27].

### **1.3.2 BNP oraz NT-proBNP a terapia lewosimendanem**

Dostępne badania, w których oceniano stężenie BNP oraz NT-proBNP wykazują istotny wpływ lewosimendanu na redukcję stężenia tych cząsteczek w osoczu. Dodatkowo stwierdzono poprawę stanu klinicznego pacjentów, u których odnotowano spadek stężenia biomarkerów. Tabela 8 przedstawia wyniki badań, w których oceniano wpływ lewosimendanu na BNP. Dostępne dane wskazują, że BNP może być wiarygodnym wskaźnikiem skuteczności terapii lewosimendanem.

**Tabela 8.** Dostępne badania oceniające stężenie BNP u pacjentów leczonych lewosimendanem.

<b>Badanie</b>	<b>Cel</b>	<b>Wynik</b>	<b>p</b>
<i>Levosimendan reduces plasma B-type natriuretic peptide and interleukin 6, and improves central hemodynamics in severe heart failure patients [49]</i>	Badanie to sprawdzało, czy poprawa hemodynamiczna wywołana lewosimendanem u pacjentów z CHF (przewlekła niewydolność serca, <i>chronic heart failure</i> ) jest związana z odpowiednimi zmianami stężeń NT-proBNP i IL-6.	Stężenia NT-proBNP były znacząco obniżone u pacjentów z ciężką CHF w ciągu 72 godzin od rozpoczęcia leczenia lewosimendanem	<0,01
<i>Short-term effects of levosimendan and prostaglandin E1 on hemodynamic parameters and B-type natriuretic peptide levels in patients with decompensated chronic heart failure [50]</i>	Porównanie krótkoterminowego wpływu lewosimendanu vs. PGE1 na parametry hemodynamiczne i stężenie BNP u pacjentów z niewyrównaną CHF.	Lewosimendan zmniejszył stężenie BNP <ul style="list-style-type: none"> <li>• o 328±83 pg/ml (28%) po 24 godzinach</li> <li>• o 257±96 pg/ml (20%) po 48 godzinach</li> </ul> Po 1 tygodniu stężenie BNP nie różniło się od poziomu wyjściowego.	<0,001  <0,05
<i>Lowered B-type natriuretic peptide in response to levosimendan or dobutamine</i>	Retrospektywna analiza stężeń BNP w ciągu pierwszych	Pacjenci zostali zaklasyfikowani jako „responder”, jeśli	≤0,001

<p><i>treatment is associated with improved survival in patients with severe acutely decompensated heart failure</i> [51]</p>	<p>kilku dni hospitalizacji- ocena przeżycia pacjentów z ciężką ostrą niewyrównaną niewydolnością serca.</p>	<p>stężenie BNP było <math>\geq 30\%</math> niższe niż wyjściowe. Wczesny spadek stężenia BNP, niezależnie od tego, czy był oceniany w 1, 3 czy 5 dniu, wiązał się z niższą śmiertelnością.</p>	
<p><i>Effects of Levosimendan on circulating markers of oxidative and nitrosative stress in patients with advanced heart failure</i> [53]</p>	<p>Ocena właściwości modulujących lewosimendanu vs. placebo na krążące markery stresu oksydacyjnego i nitrozowego.</p>	<p>Stężenie BNP było oznaczane na początku i 48 godzin po leczeniu. Jedynie w grupie pacjentów leczonych lewosimendanem zaobserwowano istotny statystycznie spadek stężenia BNP</p>	<p>&lt;0,01</p>
<p><i>Intermittent levosimendan infusions in advanced heart failure: favourable effects on left ventricular function, neurohormonal balance, and one-year survival</i> [54]</p>	<p>Porównanie działania lewosimendanu vs. furosemidu po comiesięcznych wlewach. Oceniano: przed i po każdej infuzji klasę NYHA, funkcję skurczową i rozkurczową serca, funkcjonalną niedomykalność zastawki mitralnej</p>	<p>W grupie leczonej lewosimendanem czynność skurczowa i rozkurczowa, objętość komór, nasilenie niedomykalności zastawki mitralnej uległy poprawie. Poziom BNP w stosunku do wartości wyjściowych uległo obniżeniu.</p>	<p>&lt; 0,01</p>

	oraz poziom BNP.		
<i>The Ca<sup>2+</sup>-sensitizer levosimendan improves oxidative damage, BNP and pro-inflammatory cytokine levels in patients with advanced decompensated heart failure in comparison to dobutamine [55]</i>	Badanie wpływu lewosimendanu w porównaniu z dobutaminą, na stężenia BNP, IL-6, TNF-alfa i MDA u pacjentów z ciężką niewyrównaną niewydolnością serca.	Lewosimendan powodował istotne zmniejszenie stężenia BNP w porównaniu z wartością wyjściową, zarówno po <ul style="list-style-type: none"> <li>• 48 godzinach (744,1±-100 vs 1136,3±-93,7 pg/ml)</li> <li>• 5 dniach (446+/- 119,3 vs 1136,3+/-93,7 pg/ml)</li> </ul>	0,04            0,03

BNP- peptyd natriuretyczny typu B; NT-proBNP- N-końcowy peptyd natriuretyczny typu B; IL-6- interleukina-6; PGE1- prostaglandyna E1; NYHA- Nowojorskie Towarzystwo Kardiologiczne; TNF-alfa- czynnik martwicy nowotworów alfa; MDA- aldehyd malonowy.

### 1.4 Galektyna- 3

Galektyny to rodzina lektyn wiążących β-galaktozydy. Posiadają charakterystyczną domenę rozpoznawania węglowodanów (CRD, carbohydrate-recognition domain) [56]. Obecnie u ssaków zidentyfikowano 15 galektyn, które dzielą się na trzy typy w oparciu o organizację CDR w następujący sposób:

- (1) Prototyp- galektyny z jedną CRD (galektyna- 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15)
- (2) Typ powtarzalny tandemowo- galektyny powtarzane w tandemie z dwiema CRD (galektyna- 4, 6, 8, 9, 12)
- (3) Typ chimery- galektyny z pojedynczą CRD połączoną z długą elastyczną domeną N-końcową (**galektyna- 3**)

Ludzka galektyna-3 jest białkiem o masie 35 kDa, które jest kodowane przez pojedynczy gen LGALS3, zlokalizowany na chromosomie 14. N-końcowa domena galektyny-3 jest niezbędna do jej multimeryzacji. Ponadto, jest wrażliwa na proteolizę przez metaloproteiny macierzy i może uczestniczyć w interakcjach z innymi białkami wewnątrzkomórkowymi [56][57].

Galektyna-3 występuje w wielu tkankach ludzkiego organizmu, przede wszystkim w komórkach układu odpornościowego (makrofagi, monocyty, komórki dendrytyczne, eozynofile, komórki tuczne, komórki NK i aktywowane limfocyty T i B), komórkach nabłonkowych, komórkach śródbłona, a także w neuronach czuciowych.

Galektyna-3 znajduje się głównie w cytoplazmie, jednak ulega ekspresji również w jądrze komórkowym. Różne lokalizacje cząsteczki przyczyniają się do jej różnych funkcji.

Obecna w cytoplazmie galektyna-3 uczestniczy w szeregu różnych procesów wewnątrzkomórkowych, w tym w proliferacji, różnicowaniu, apoptozie i przeżyciu komórek oraz bierze udział we wzroście i rozwoju tkanki łącznej, rozwoju chrząstki i kości, co więcej ma wpływ na różnicowanie osteoklastów, przeżycie chondrocytów oraz wzrost embrionalny. Procesy te są w dużej mierze realizowane poprzez połączenie z wieloma białkami wiążącymi galektynę-3.

W jądrze komórkowym łączy się ze składnikami kompleksu rybonukleoproteinowego. Istnieją badania wskazujące, że galektyna-3 działa jako prekursorowy czynnik splicingowy matrycowego kwasu rybonukleinowego (mRNA) i uczestniczy w składaniu spliceosomów [58]. Ponadto, inne badania wykazały, że galektyny-3 wchodzi w interakcję z pre-mRNA poprzez kompleksy białkowe zawierające Gemin4 (Gemin4- składowa kompleksu białkowego przetrwania neuronów ruchowych (SMN, survival motor neuron), odpowiedzialnego za tworzenie i dojrzewanie małych rybonukleoprotein jądrowych klasy Sm) [59][60]. Galektyna-3 uczestniczy również w regulacji szlaku sygnałowego Wnt/ $\beta$ -katenina w jądrze [61].

Makrofagi wydzielają galektynę-3 poza komórką pod wpływem mediatorów, takich jak osteopontyna. W związku z tym dochodzi do namnażania fibroblastów, które aktywowane wydzielają białka macierzy- głównie kolagen typu I. Akumulacja kolagenu typu I w przestrzeniach pozakomórkowych, powoduje zaburzenie równowagi pomiędzy zawartością

kolagenu typu I oraz III. Konsekwencją tego procesu są zaburzenia kurczliwości mięśnia sercowego co może pogłębiać niewydolność serca [62][63].

Wzrostowi stężenia galektyny-3 towarzyszy wzrost stężeń cytokin prozapalnych m.in. transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ , *transforming growth factor  $\beta$* ), interleukiny-1 (IL-1, *interleukin 1*) oraz interleukiny-2 (IL-2, *interleukin 2*). Stąd galektyna-3 może nasilać proces zwłóknienia poprzez modulację odpowiedzi immunologicznej [63].

W ujęciu klinicznym, galektyna-3 badana jest najczęściej pod kątem użyteczności jako biomarker diagnostyczny lub prognostyczny w chorobach sercowo-naczyniowych. Dostępne są jednak prace naukowe, w których galektynę-3 badano jako biomarker w innych jednostkach chorobowych m.in. w infekcjach wirusowych, chorobach autoimmunologicznych, cukrzycy, chorobach nerek czy nowotworach. Sugeruje to, że galektyna-3 nie jest markerem narządowo swoistym, ale specyficznym markerem patogenez, w której bierze udział stan zapalny lub włóknienie [56].

### 1.5 Troponiny

Kompleks troponin odgrywa kluczową rolę w regulacji funkcjonowania aparatu kurczliwego komórek mięśniowych. Kompleks ten jak już przedstawiono w punkcie opisującym mechanizmy działania lewosimendanu, składa się z trzech podjednostek regulujących oddziaływanie aktyna-miozyna:

- TnC
- TnT
- TnI [64].

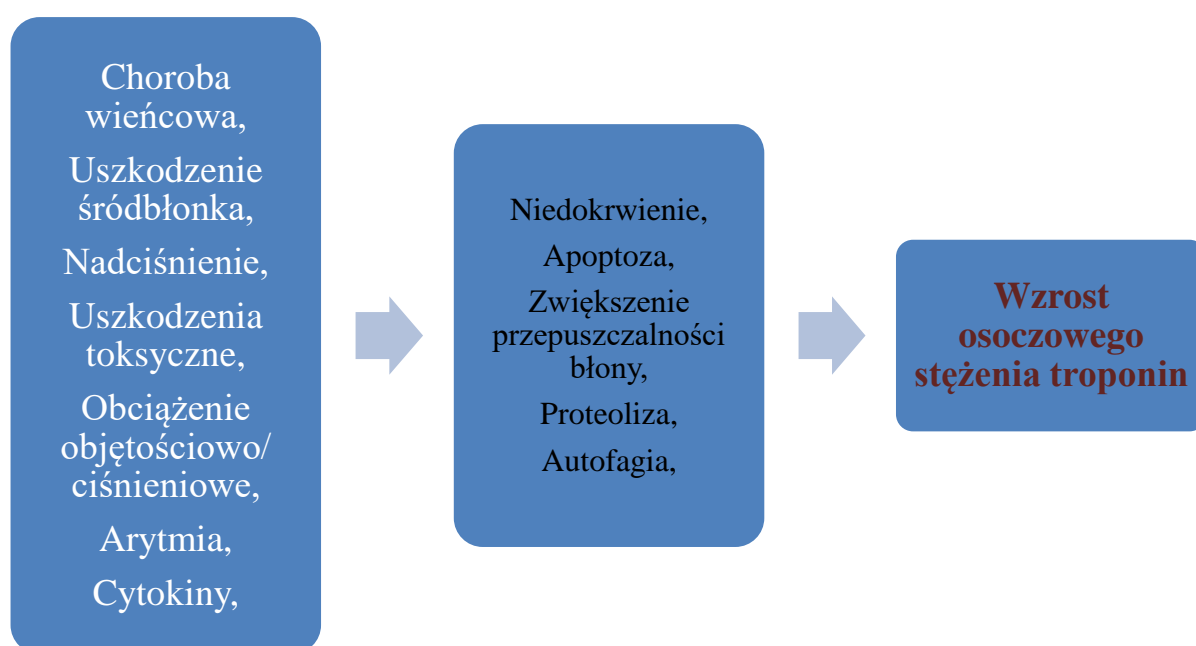
Troponiny znajduje się zarówno w mięśniach szkieletowych jak i mięśniu sercowym. TnT łączy kompleks troponin z tropomiozyną; TnI hamuje ATP-azę aktynomiozyny poprzez zmiany stężenia  $Ca^{2+}$ . TnC z czterema punktami wiązania  $Ca^{2+}$  działa jako pośrednik w oddziaływaniu kompleksu troponin- $Ca^{2+}$  [65].

TnC jest jedną izoformą, której struktura jest taka sama w mięśniach szkieletowych oraz w mięśniach budujących aparaty kurczliwy serca. Izoforny TnT oraz TnI różnią się w mięśniach szkieletowych i sercowych, różnica ta jest wykorzystywana w testach klinicznych.



Do wzrostu stężenia cTn w osoczu dochodzi, w następstwie przerwania struktury błony komórkowej miocytów z przyczyn niedokrwiennych lub niezwiązanych z niedokrwieniem. Wówczas cTn zawarte w cytozolu, a następnie cTn budujące aparat kurczliwy, w tym fragmenty troponin przedostają się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i krwioobiegu. Podwyższony poziom cTn koreluje ze stopniem uszkodzenia komórek [66]. Potencjalne procesy mogące uczestniczyć w wzroście osoczowego stężenia cTn przedstawia Rycina 10.

Badanie stężenia cTn jest zalecane w postępowaniu diagnostycznym AHF, aby wykluczyć ostre zespoły wieńcowe (ACS, *acute coronary syndromes*) [26].



**Ryc. 10.** Procesy patofizjologiczne, które mogą prowadzić do podwyższonego poziomu cTn (wg [64]).

W AHF stężenie cTn może wzrosnąć powyżej 99. percentyla górnej granicy referencyjnej lub umiarkowanie powyżej granicy wykrywalności, bądź pozostawać poniżej progu detekcji. Jeśli stężenie cTn pozostaje poniżej progu detekcji w czasie badania, wówczas można wykluczyć AMI i poszukiwać innych przyczyn AHF. W sytuacji, w której stężenie cTn jest podwyższone, ale poniżej wartości granicznej dla AMI, diagnostyka różnicowa staje się bardziej skomplikowana. Wówczas najczęściej obserwuje się ostrą dekompensację istniejącej wcześniej HF. W takiej sytuacji umiarkowany wzrost stężenia cTn w osoczu reprezentuje ostre niedokrwienne uszkodzenie mięśnia sercowego w zależności od obserwowanej

tendencji wzrostu lub spadku stężenia cTn (ostre uszkodzenie) lub przewlekłe uszkodzenia (CHF ze stabilnym poziomem cTn).

Niedokrwienie podwosierdziowe, wzrost napięcia ścian komór, wzmożona aktywacja układu współczulnego oraz wpływ cytokin zapalnych mogą wyjaśniać wzrost stężenia cTn powyżej granicy normy. W takim przypadku ostre niedokrwienne uszkodzenie mięśnia sercowego byłoby przyczyną postępującego upośledzenia czynności serca i rozwoju zaawansowanej HF.

Inne stany patologiczne determinujące AHF mogą być związane ze wzrostem stężenia cTn poza AMI w wyniku niedokrwiennego lub innego niż niedokrwienne uszkodzenie mięśnia sercowego, np. przełomy nadciśnieniowe, tachyarytmie przedsionkowe/komorowe, ciężkie zaburzenia przewodzenia, ostra niedomykalność zastawek, ostre zapalenie mięśnia sercowego, zatorowość płucna oraz udar. W takich sytuacjach stężenie cTn może szybko wzrastać, natomiast w serii oznaczeń stężenie cTn spada bądź utrzymywać stabilny poziom lub pozostać w granicach niskich stężeń [66].

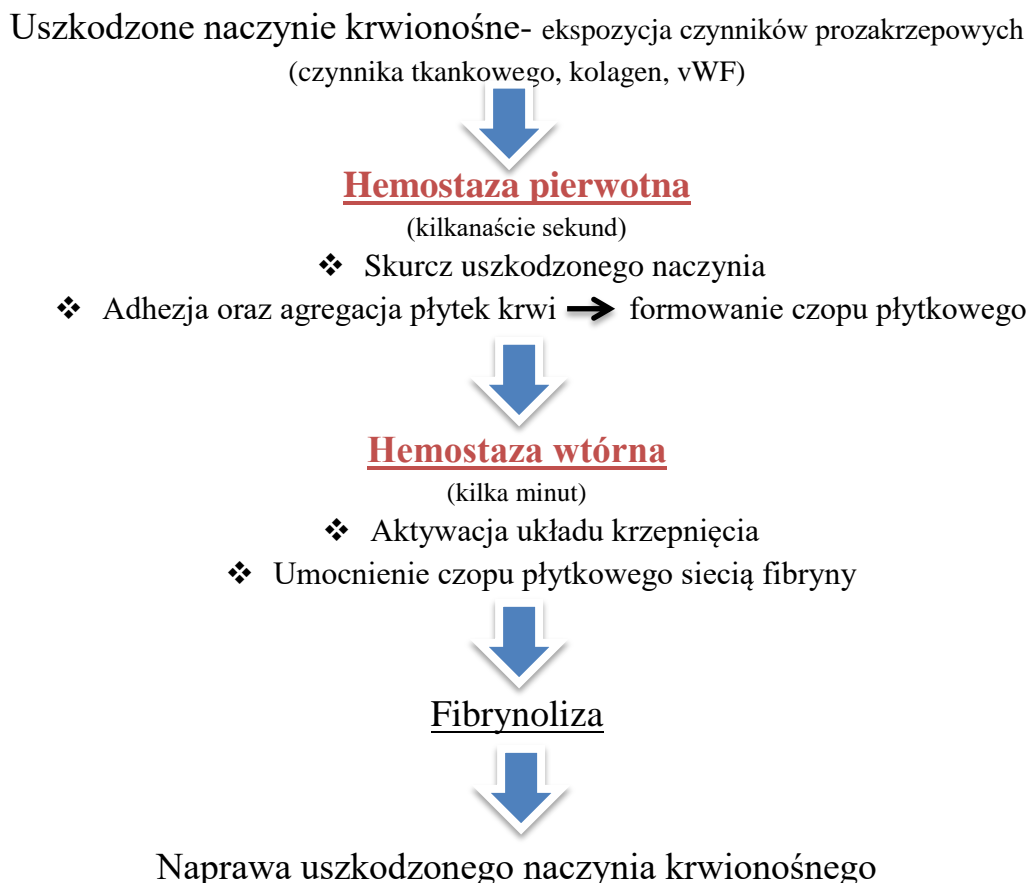
Dostępne wytyczne ESC prezentują zalecenia dotyczące oznaczenia stężenia hs-cTn w przypadku podejrzenia występowania ACS bez uniesienia odcinka ST w celu diagnostyki i stratyfikacji ryzyka. Wówczas zalecany jest pomiar hs-cTn bezpośrednio po przyjęciu pacjenta do szpitala oraz analiza otrzymanych wyników do 60 min od pobrania materiału do badania (klasa zaleceń I, poziom wiarygodności danych B). Zalecany jest również pomiar stężenia hs-cTn w celu oceny rokowania pacjenta (klasa zaleceń I, poziom wiarygodności danych B) [67].

Ocena stężenia hs-cTn zalecana jest we wstępnym rozpoznaniu ACS z uniesieniem odcinka ST. Jak wskazują wytyczne ESC [68] zalecane jest jak najszybsze pobranie krwi od pacjenta w celu oznaczenia biomarkerów, jednak procedura ta nie może opóźnić leczenia reperfuzyjnego (klasa zaleceń I, poziom wiarygodności danych C) [68].

## **1.6 Hemostaza**

Pojęcie hemostazy obejmują zespół procesów fizjologicznych mających na celu zatrzymanie krwawienia powstałego w skutek przerwania ciągłości naczyń krwionośnych.

Hemostazę można podzielić na pierwotną i wtórną. Uproszczony przebieg hemostazy przedstawia Rycina 11.



**Ryc. 11.** Uproszczony schemat procesu hemostazy.

Do głównych czynników biorących udział w procesie hemostazy zaliczamy:

- ✚ Ścianę naczyń krwionośnych
- ✚ Płytki krwi
- ✚ Układ krzepnięcia
- ✚ Fibrylizę

### 1.6.1 Ściany naczyń krwionośnych

Zwężenie naczyń krwionośnych jest początkowym etapem procesu hemostazy, w odpowiedzi na przerwanie ciągłości naczyń krwionośnych. Za skurcz naczyń odpowiada w głównej mierze endotelina-1. Jest to peptyd syntetyzowany przez komórki śródbłonna

naczyń krwionośnych. Istotnymi czynnikami indukującymi skurcz uszkodzonych naczyń są również substancje uwalniane z aktywowanych płytek krwi do, których zalicza się serotoninę, tromboksan A<sub>2</sub> czy ADP. Skurczone naczynie ogranicza wypływ krwi poza naczynie. Co więcej, uszkodzony śródbłonek odśtania trombogenną macierz w skład której wchodzi: kolagen, czynnik von Willebranda (vWF) oraz czynnik tkankowy (TF). Ekspozycja płytek krwi na prozakrzepowe składniki macierzy podśródbłonkowej zapewnia wejście do drugiej fazy hemostazy pierwotnej tj. adhezji płytek krwi [69].

## **1.6.2 Płytki krwi**

### **1.6.2.1 Płytki krwi - informacje ogólne**

Płytki krwi powstają w szpiku kostnym poprzez fragmentację cytoplazmy megakariocytów. Megakariocyty zlokalizowane są w okolicy zatok naczyniowych szpiku kostnego, do których bezpośrednio uwalniają płytki krwi. Każdy megakariocyt może wytworzyć 5000-10000 płytek krwi. Średnica dojrzałej płytki krwi wynosi około 2-3 μm. Żywotność płytek wynosi od 5 do 9 dni. Około 2/3 płytek krwi znajduje się w krwiobiegu, natomiast pozostałe 1/3 ulega sekwestracji w śledzionie. W fazie spoczynkowej płytka krwi ma kształt dyskoidalnym, natomiast na skutek aktywacji dochodzi do reorganizacji struktury przestrzennej płytki krwi w efekcie czego płytka zmienia kształt na nieregularny z licznymi wypustkami. Wartość referencyjna u osoby dorosłej płytek krwi zawiera się w przedziale 150–400 G/l (150-400 x 10<sup>9</sup>/l) krwi. Przeciętny zdrowy dorosły może wyprodukować 10<sup>11</sup> płytek dziennie. Płytki krwi, których żywotność dobiega końca (7-9 dni) są niszczone przez fagocytozę w śledzionie i wątrobie [70].

### **1.6.2.2 Budowa płytek krwi**

Błona komórkowa płytek krwi posiada strukturę dwuwarstwową składającą się z białek i lipidów. Dominującymi lipidami są fosfolipidy, które tworzą podstawową strukturę oraz cholesterol. Cząsteczki cholesterolu stabilizują strukturę błony komórkowej przez co błona zachowuje swoją płynność. Fosfolipidy tworzą podwójną warstwę (zewnątrzną i wewnętrzną), której polarne głowy są skierowane w stronę środowiska hydrofilowego – zewnętrzne otoczenie płytki oraz cytoplazmy wewnątrz. Łańcuchy kwasów tłuszczowych orientują się ku sobie (prostopadle do płaszczyzny błony), tworząc hydrofobową barierę w warstwie wewnętrznej. Fosfolipidy zwłaszcza fosfatydyloinozitol wspomagają aktywację płytek krwi poprzez dostarczanie kwasu arachidonowego (nienasyconego kwasu

tłuszczowego), który podczas aktywacji płytek zostaje przekształcony w prostaglandyny oraz tromboksan  $A_2$ . Fosfatydyloseryna oraz fosfatydyloetanolamina po aktywacji płytki krwi przemieszczają się na zewnętrzną powierzchnię, tworząc ujemnie naładowaną powierzchnię fosfolipidową, na której gromadzą się enzymy układu krzepnięcia, zwłaszcza kompleks VIII i IX oraz kompleks X i V.

W błonie zakotwiczone są glikoproteiny i proteoglikany, wspierają one powierzchniowe glikozaminoglikany, oligosacharydy i glikolipidy. Zewnętrzna powierzchnia błony komórkowej płytki krwi pokryta jest płaszczem nazwanym – glikokaliksem, zawierającym w sobie zewnętrzne końce glikoprotein oraz glikolipidów błonowych, a także może absorbować do swojej powierzchni białka osocza (np. albuminę, fibrynogen) [71].

Błona komórkowa tworzy wgłębienia, które penetrują do wnętrza cytoplazmy płytek krwi, przez co tworzy swój unikalny system kanalikowy połączony z powierzchnią. Główną rolą otwartego systemu kanalików jest umożliwienie przenikania cząsteczek ze środowiska zewnętrznych do płytek krwi, a także uwolnienie zawartości ziarnistości płytek krwi na zewnątrz podczas procesu aktywacji [70].

Pod błoną komórkową w cytoplazmie płytki krwi zlokalizowany jest wysoce wyspecjalizowany cytoszkielet, dzięki któremu płytka krwi utrzymuje swoją strukturę w fazie spoczynku. Natomiast zmienia kształt w fazie aktywacji. Składa się on z trzech głównych elementów: szkieletu błonowego opartego na spektrynie, cytoszkieletu aktynowego oraz obwodowej wiązki mikrotubul [70][71].

Kolejną strukturą znajdującą się w cytoplazmie płytki krwi jest układ kanalików gęstych (pozostałość szorstkiego retikulum endoplazmatycznego). Główną funkcją tej struktury jest magazynowanie  $Ca^{2+}$  oraz enzymów biorących udział w aktywacji płytek krwi. Enzymy te obejmują m.in. fosfolipazę  $A_2$ , cyklooksygenazę oraz syntetazę tromboksanu.

Ziarnistości  $\alpha$  są to struktury występujące w cytoplazmie płytek krwi (średnio 50-80 w każdej płytce). Zawartość ziarnistości stanowią białka o zróżnicowanych funkcjach, niektóre trafiły tam na drodze endocytozy, natomiast pozostałe były syntetyzowane w megakariocytach. Podczas procesu aktywacji płytki ziarnistości  $\alpha$  stają się integralną częścią błony komórkowej, a zawartość ulega uwolnieniu do otoczenia płytki krwi, gdzie uczestniczy w adhezji i agregacji

płytek krwi oraz wspomaga kaskadę krzepnięcia [71]. Zawartość ziarnistości przedstawia Tabela 9.

**Tabela 9.** Zawartość ziarnistości występujących w płytkach krwi (wg [72][73])

<p><b>Ziarnistości <math>\alpha</math></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Białka swoiste dla płytek krwi: czynnik płytkowy 4, <math>\beta</math>- tromboglobulina</li> <li>• Białka adhezyjne: fibronektyna, (vWF), trombospondyna</li> <li>• Czynniki krzepnięcia krwi i fibrynolizy: fibrynogen, czynnik krzepnięcia V i XI, wielkocząsteczkowy kininogen, inhibitor C1-elastazy, białko S, tkankowy aktywator plazminogenu (tPA), inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1)</li> <li>• Białka specyficzne dla błony ziarnistość <math>\alpha</math>: selektyna P, białko-33, osteonektyna</li> <li>• Białkowe receptory błonowe: GP IIb/IIIa, GP Ib/IX/V, GP IV</li> <li>• Mitogeny swoiste dla płytek krwi: płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu komórek śródbłonna naczyniowego/czynnik przepuszczalności naczyń (VEGF/VPF)</li> </ul>
<p><b>Ziarnistości elektronowo gęste <math>\delta</math></b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nukleotydy adeninowe (ATP i ADP) i guaninowe (GTP i GDP).</li> <li>• Serotonina</li> <li>• Jony magnezu i wapnia.</li> <li>• Polifosforany</li> </ul>
<p><b>Lizosomy</b></p>	<p>➤ Kwaśne hydrolazy, katepsyna D i E, karboksypeptydazy, kolagenazy, kwaśne fosfatazy, glikohydrolazy</p>

vWF- czynnik von Willebranda; ATP- adenozyntrifosforan, ADP- adenozyndifosforan, GTP- guanozyntrifosforan; GDP- guanozyndifosforan;

W cytoplazmie płytek krwi występują również mniej liczne ziarnistość tj. ziarnistości elektronowo gęste  $\delta$ , lizosomy oraz zawierające katalazę peroksysomy. Ziarnistości gęste pojawiają się później niż ziarnistości  $\alpha$  w różnicowaniu megakariocytów. Przechowują hemostatycznie aktywne cząsteczki, które są wydzielane podczas aktywacji płytek krwi [70] [71].

### 1.6.2.3 Płytki krwi- receptory błonowe

Receptory to białka powierzchniowe, które umożliwiają wejście komórek w interakcji z określonymi cząsteczkami, aby odpowiednio zareagować. Płytki krwi są najmniejsze spośród elementów morfotycznych krwi, ale odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu hemostazy zwłaszcza jej receptory powierzchniowe. Dlatego tak istotną kwestią jest poznanie biologii oraz możliwości uchwytu terapeutycznego tych cząsteczek. Na płytkach krwi znajdują się różne receptory, które biorą udział nie tylko w procesie krzepnięcia krwi, ale także w innych procesach m.in. w odpowiedzi immunologicznej, rozwoju nowotworów, a także ich przerzutów oraz w procesach neurodegeneracyjnych [74][75].

#### ➤ Receptory integrynowe

Integryny to białka pełniące różne funkcję do których zaliczamy udział w procesie adhezji oraz są to cząsteczki sygnalizacyjne obecne na wielu typach komórek. Integryny w stanie spoczynkowym płytki krwi wykazują niskie powinowactwa w stosunku do swoich agonistów. Sytuacja ta zmienia się w wyniku aktywacji komórki. Dochodzi wówczas do zmiany organizacji struktur błonowych, co wiąże się z przesunięciem receptorów do stanu wysokiego powinowactwa. Strukturalnie receptory integrynowe są to nie kowalencyjnie związane heterodimery podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ . Płytki krwi mają tzw. trzy rodziny integryn:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  i  $\beta 3$ , których charakterystyka przedstawia Tabela 10.

**Tabela 10.** Podział receptorów integrzynowych (wg [74][75]).

Rodzina	Typ receptora	Charakterystyka
$\beta 1$	$\alpha 2\beta 1$ / GPIa-IIa	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Receptor płytkowy dla kolagenu;</li> <li>▪ Stabilizują wzrost skrzepliny i promuje aktywność prokoagulacyjną;</li> <li>▪ Inicjuje syntezę białek płytkowych, biorących udział w procesie aktywacji, po związaniu z kolagenem;</li> </ul>
	$\alpha 5\beta 1$	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Receptor ułatwiający adhezję płytek krwi do fibronektyny;</li> </ul>
	$\alpha 6\beta 1$	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Receptor integrzynowy pośredniczący w adhezji płytek krwi do lamininy (znajdującej się w błonach podstawnych oraz macierzy zewnątrzkomórkowej);</li> <li>▪ Przekazywanie sygnału <math>\alpha 6\beta 1</math> do płytek krwi za pośrednictwem kinazy fosfoinozytydowej 3 indukuje zmiany morfologiczne w płytkach krwi;</li> </ul>
$\beta 2$	$\alpha L\beta 2$ /CD102	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Częsteczka adhezji międzykomórkowej 2 (ICAM-2, intercellular adhesion molecule 2 );</li> <li>▪ Jedyny znany członek rodziny integrzyn <math>\beta 2</math>;</li> <li>▪ Ma około 3000 kopii na powierzchni płytek krwi oraz systemie kanalików otwartych;</li> <li>▪ Częsteczka pośrednicząca w interakcji płytek krwi z leukocytami;</li> </ul>
$\beta 3$	$\alpha IIb\beta 3$ /GPIIb-IIIa	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Receptor obecny tylko na płytkach krwi;</li> <li>▪ Najliczniej reprezentowany receptor pośredniczący w adhezji płytek krwi (w spoczynku na powierzchni płytek krwi ok. 80 000-100 000 cząsteczek, dodatkowo 20 000-40 000 cząsteczek <math>\alpha IIb\beta 3</math> rozlokowanych jest w ziarnistościach <math>\alpha</math>, ziarnistościach gęstych oraz na błonach systemu otwartego kanalików. Receptory te ulegają translokacji do błony komórkowej w wyniku procesu aktywacji);</li> <li>▪ Do ligandów receptora GPIIb-IIIa należą: fibrynogenem,</li> </ul>



		fibryną, vWF, fibronektyną, witronektyną oraz trombospondyną;
	$\alpha V\beta 3$	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Płytki krwi wyrażają na swojej powierzchni 50-100 receptorów <math>\alpha V\beta 3</math>;</li> <li>▪ W obecności magnezu lub manganu receptory <math>\alpha V\beta 3</math> pośredniczą w adhezji płytek do witronektyny, fibrynogenu, vWF, protrombiny i trombospondyny;</li> <li>▪ Aktywowany <math>\alpha V\beta 3</math> oddziałuje z osteopontyną występującą w blaszkach miażdżycowych;</li> </ul>

vWF- czynnik von Willebranda;

➤ Receptory bogate w leucynę

Receptory bogate w leucynę zawierają białkowy motyw strukturalny składający się z powtarzających się 20-30 aminokwasów (LPR, Leucine-rich repeat) które są bogate w hydrofobowy aminokwas leucynę. Motywy te biorą udział w tworzeniu interakcji białko-białko.

- Receptor GPIb-IX-V ( ok. 50 000 kopii) stanowi drugi co do częstości receptor płytkowy po GPIIb-IIIa. Kompleks GPIb-IX-V składa się z glikoprotein Ib $\alpha$ , Ib $\beta$ , IX i V. Podjednostka GPIb $\alpha$  jest połączona wiązaniem dwusiarczkowym z GPIb $\beta$  i niekowalencyjnym wiązaniem z GPIX i GPV w stosunku 2:2:2:1. Specyficznymi ligandami dla tego receptora są vWF, integryna leukocytów  $\alpha M\beta 2$  oraz selektyna P.
- Receptory Toll-podobne (TLR) są obecne na powierzchni płytek krwi w mniejszych ilościach w porównaniu z innym receptorem należącym do tej rodziny. TLR to białka przezbłonowe składające się z domeny zewnątrzkomórkowej LRP, regionu transbłonowego i domeny Toll-IL-1R. Płytki krwi oraz megakariocyty syntetyzują białko dla różnych TLR (np. TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-6, TLR-7, TLR-8 i TLR-9). Receptory TLR odgrywają ważną rolę w odporności wrodzonej dzięki ich zdolności do identyfikacji składowych pochodzenia bakteryjnego, wirusowego, a ponadto pierwotniaków i grzybów, co więcej są istotnym elementem biorącym udział w usuwaniu tych

patogenów. Receptor płytkowy TLR-4 odpowiada za interakcję płytek krwi z neutrofilami, powodując aktywację neutrofilii.

- Metaloproteinazy macierzy (MMP) odgrywają istotną rolę w procesie adhezji i agregacji płytek krwi. Do cząsteczek biorących udział w tych procesach zaliczamy MMP-1, 2, 3, 9 i 14. W procesie, w którym pośredniczą GPVI (receptor dla kolagenu) oraz  $\alpha 2\beta 1$ . MMP-1 wzmacnia aktywację płytek krwi indukowaną kolagenem.

#### ➤ Selektyny

Selektyny jest to grupa receptorów, których działanie upatruje się głównie w procesie adhezji płytek. Receptory te są obecne nie tylko na płytkach krwi, ale także na komórkach śródbłonna i limfocytach. Do najlepiej zbadanych członków tej rodziny receptorów zaliczamy selektynę P oraz receptor lektynopodobny typu C-2 (CLEC-2).

- CLEC-2 jest transbłonowym receptorem płytkowym dla podoplaniny oraz rodocytyny (agretyny), które mają zdolność wywoływania agregacji płytek. Podoplanina występuje na komórkach nowotworowych, komórkach limfatycznych i śródbłonkowych. Rodocytyna to białko nie występujące fizjologicznie w organizmie człowieka, znajduje się natomiast w jady węża (żmij małajskiej), który ma zdolność agregacji płytek krwi.
- Selektyna P (CD62P) jest to glikoproteiną o masie 140 kDa obecną w ziarnistościach  $\alpha$  w fazie spoczynkowej płytek krwi. Po aktywacji przemieszcza się do błony komórkowej. Aktywacja płytek krwi powoduje ekspresję powierzchniową około 13 000 cząsteczek selektyny P. Ekspresja selektyny P na krążących płytkach krwi jest markerem aktywacji płytek krwi. Selektyna P jest odpowiedzialna za przyłączanie neutrofilii oraz monocytów do płytek krwi i komórek śródbłonna naczyniowego. Rekrutuje również pochodzące z monocytów mikrocząstki prokoagulacyjne, które zawierają ligand glikoproteiny P-selektyny-1 i TF.

### ➤ Tetraspaniny

Grupa białek błonowych zawierająca cztery domeny transbłonowe. Są uważane za najważniejsze przetworniki sygnału w błonie komórkowej. Ta grupa obejmuje CD63, CD9 i CD53. CD63 jest najważniejszym członkiem tej rodziny.

- CD63 /glikoproteina 3 związana z błoną lizosomalną jest to białko błony lizosomalnej, które pojawia się na powierzchni aktywowanych płytek krwi. CD63 moduluje rozprzestrzenianie się płytek krwi. CD63 jest kolejnym po selektynie P markerem aktywacji płytek *in vivo*.

### ➤ Receptory purynergiczne

Płytki krwi posiadają trzy receptory  $P_2$  dla nukleotydów adeninowych:  $P_2Y_1$  i  $P_2Y_{12}$  oddziałujące z ADP oraz receptor  $P_2X_1$  oddziałujący z ATP. Interakcja nukleotydów adeninowych z ich receptorami płytkowymi odgrywa ważną rolę w trombogenezie [76].

- $P_2Y_1$  (42 kDa, zawierają 373 reszty aminokwasowe) cząsteczka występująca wielu tkankach m. in. sercu, naczyniach krwionośnych, komórkach mięśni gładkich, tkance nerwowej, w tym w płytkach krwi. Receptor  $P_2Y_1$  jest niezbędny do indukowanej przez ADP agregacji płytek. ADP jest silniejszym agonistą niż ATP. ATP jest częściowym agonistą receptora  $P_2Y_1$ , przy niskich poziomach ekspresji receptora działa jako antagonist.  $P_2Y_1$  stanowi około 20–30% wszystkich miejsc wiązania ADP na powierzchni płytek krwi.
- $P_2Y_{12}$  jest to receptor występujący na płytkach krwi, a ponadto znajduje się na komórkach mięśni gładkich, komórkach śródbłona oraz komórkach glejowych. Receptor  $P_2Y_{12}$  występuje głównie na powierzchni płytek krwi wśród receptorów purynergicznych jako homooligomer.  $P_2Y_{12}$  jest receptorem dla ADP. ADP i jego analogi stymulują receptor  $P_2Y_{12}$ , podczas gdy ATP i jego analogi trifosforanowe działają jako jego antagoniści. Pacjenci z wrodzoną wadą  $P_2Y_{12}$  wykazują łagodną lub umiarkowaną skazę krwotoczną ze stanami krwawienia śluzówkowo-skórnego oraz pooperacyjną i pourazową nadmierną utratą krwi. Receptor  $P_2Y_{12}$  stał się punktem uchwytu w terapii przeciwplatekowej.

- $P_2X_1$  jest receptorem kanału jonowego bramkowanego ligandem, którym jest ATP i hamowany przez ADP. Wiązanie ATP z receptorem  $P_2X_1$  prowadzi do napływu wapnia do płytek krwi co w konsekwencji powoduje przejściową zmianę kształtu płytek krwi, degranulację, tworzenie pseudopodów i aktywację płytek. We wczesnych stadiach uszkodzenia naczyń, w obecności niskiego stężenia kolagenu, ATP przyczynia się do zwiększonej agregacji poprzez receptor  $P_2X_1$  [77].

➤ Receptory prostaglandyn i tromboksanu

Prostaglandyny to produkty pochodzenia lipidowego, które regulują wiele funkcji fizjologicznych ośrodkowego układu nerwowego, sercowo-naczyniowego, pokarmowego, moczowo-płciowego, hormonalnego, oddechowego i odpornościowego. Płytki krwi mają receptory dla prostaglandyn, które pełnią ważne funkcje modulacyjne.

- TP lub TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> jest receptorem dla tromboksanu A<sub>2</sub>. Receptor ten jest szeroko reprezentowanym w układzie sercowo-naczyniowym. Receptory TP (TP $\alpha$  i TP $\beta$ ) są kodowane przez ten sam gen, ale różnią się od siebie, ponieważ powstają w wyniku alternatywnego splicingu i mają różne C-końcowe regiony wewnątrz cytoplazmatyczne. TP $\alpha$  oraz TP $\beta$  znajdują się w płytkach krwi, natomiast w komórkach śródbłonna stwierdzono obecność jedynie TP $\beta$ . Receptory te aktywują fosfolipazę A<sub>2</sub> i fosfolipazę C poprzez transdukcję sygnału przez białko G. Po stymulacji przez agonistów receptory TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> wzmacniają aktywację płytek krwi w mechanizmie autokrynnym.
- Prostaglandin E<sub>2</sub> receptors (PGE<sub>2</sub>)- biosynteza PGE<sub>2</sub> jest wzmacniana przez mediatory stanu zapalnego w komórkach mięśni gładkich naczyń i makrofagach. PGE<sub>2</sub> inicjują aktywację płytek przy niskich stężeniach ADP i kolagenu, podczas gdy wyższe stężenia tych agonistów hamują aktywację płytek, w której pośredniczy PGE<sub>2</sub>.
- Receptor prostacykliny (PGI<sub>2</sub>) jest pochodną kwasu arachidonowego, uwalnianą przez komórki śródbłonna naczyniowego. Prostacyklina jest skutecznym środkiem rozszerzającym naczynia krwionośne, inhibitorem agregacji płytek krwi i moderatorem proliferacji-migracji-różnicowania komórek mięśni gładkich naczyń. Receptory te oddziałują z białkami G, aby

aktywować cyklozę adenylową i wiązać prostacyclinę, utrzymując w ten sposób płytki krwi w stanie spoczynku.

➤ Receptory nadrodziny immunoglobulin

Receptory immunoglobulinowe (IgSF, *immunoglobulin superfamily*) to duża grupa białek powierzchniowych zaangażowanych w rozpoznawanie, wiązanie i adhezję komórek. Struktura molekularna tych białek jest podobna do struktury immunoglobulin. Członkowie IgSF obejmują receptory powierzchniowe komórki, koreceptory i cząsteczki kostymulujące. Nadrodzina receptorów płytkowych immunoglobulin składa się z siedmiu członków.

- GPVI to główny receptor dla kolagenu. FcRγ jest dimerem, który tworzy na powierzchni płytki kompleks o wysokim powinowactwie z dwiema cząsteczkami GPVI. Interakcja między GPVI a kolagenem może być zaangażowana w inicjację tworzenia skrzepliny przy niskich lub wysokich szybkościach ścinania.
- FcγRIIA (CD32) jest kolejnym członkiem nadrodziny immunoglobulin. Występuje w bliskim sąsiedztwie receptora GPIb-IX-V. Sieciowanie FcγRIIA inicjuje fosforylację tyrozyny, metabolizm fosfoinozytolu, aktywację fosfolipazy C, sygnalizację wapniową i rearanżację cytoszkieletu. Pośredniczy również w przekazywaniu sygnału prowadzącego do wiązania vWF z GPIb.
- FcεRI (CD23) powodują uwalnianie serotoniny oraz pośredniczą w adhezji płytek krwi do uszkodzonego śródbłonka.
- JAM (*junctional adhesion molecules*) to rodzina glikoprotein charakteryzująca się dwoma jednostkami immunoglobulin w domenie zewnątrzkomórkowej. Białka JAM oprócz płytek krwi są obecne w połączeniach międzykomórkowych śródbłonka i komórek nabłonka, a także na powierzchni leukocytów. Białka JAM regulują interakcje leukocytów, płytek krwi, komórek śródbłonka i tworzenie ścisłych połączeń w komórkach nabłonka i śródbłonka. Białka JAM odgrywają ważną rolę w aktywacji płytek krwi. Wyróżnia się trzy typy receptora JAM, tj. JAM-1, JAM-2 i JAM-3. Aktywują płytki krwi poprzez sieciowanie z FcγRIIA.
- PECAM-1 (*Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*)/CD31 jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 130 kDa. PECAM-1 znajduje się na powierzchni płytek krwi,

granulocytów i monocytów. Platelet PECAM-1 służy jako regulator reaktywności płytek krwi.

- TREM-Like transcript-1- znajduje się w ziarnistościach  $\alpha$  płytek krwi. Domena zewnętrzna tego receptora jest podobna do rodziny receptorów komórek szpikowych 'triggering receptors on myeloid cells' (TREM). Sieciowanie TREM-Like transcript-1 z Fc $\epsilon$ RI zwiększa sygnalizację wapniową.

#### ➤ Receptory lipidowe

Receptory czynnika aktywującego płytki (PAF, *platelet activating factor*) zbudowane są z fosfolipidów. Liczba receptorów PAF na powierzchni płytek krwi wynosi około 300. Receptory te pośredniczą w stanach zapalnych, anafilaksji, agregacji płytek oraz degranulacji.

#### ➤ Receptor serotoninowy

Receptor 5-hydroksytryptaminowy typu 2A (5-HT<sub>2A</sub>) oraz typu 3A (5-HT<sub>3A</sub>) został znaleziony na błonie płytek krwi. Stwierdzono, że aktywacja płytek krwi powoduje uwolnienie zmagazynowanej w ziarnistościach elektronowo gęstej serotoniny, która stymuluje agregację płytek. Jednak sama serotonina nie powoduje agregacji płytek krwi, ale wzmacnia agregację, indukowaną przez innych agonistów.

#### ➤ Receptory trombiny

Receptory, których agonistom jest trombina należą do grupy receptorów aktywowanych proteazą (PAR, *protease-activated receptors*). W organizmie człowieka występują cztery podtypy receptorów PAR, które się szeroko reprezentowane w tkankach.

- ❖ Receptory PAR-1, PAR-3 oraz PAR-4 są aktywowane przez trombinę.
- ❖ Receptor PAR-2 jest aktywowany przez trypsynę i proteazy trypsynopodobne.

Płytek krwi ulegają aktywacji trombiną za pośrednictwem receptorów PAR-1 i PAR-4. PAR-1 działa jako główny receptor trombiny na ludzkich płytkach krwi, ponieważ oddziałuje z niewielkimi stężeniami trombiny, podczas gdy PAR-4 wymaga wyższego stężenia do aktywacji. Związanie ligandu z receptorem PAR-1 powoduje aktywację heterotrimerycznych białek G ( $G_{\alpha 12/13}$ ,  $G_{\alpha q}$  i  $G_{\alpha i/z}$ ), które łączą kilka wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych z różnymi fenotypowymi efektami dla płytek krwi. Zaliczamy do nich:

wytwarzanie TXA<sub>2</sub>, uwalnianie ADP, uwalnianie serotoniny oraz epinefryny, aktywację/mobilizację P-selektyny i ligandu CD40, aktywację integryn i w końcu agregację płytek krwi [78].

### 1.6.3 Układ krzepnięcia

Istotą kaskady krzepnięcia jest przekształcenie rozpuszczalnego białka- fibrynogenu w sieć przestrzenną fibryny, która stabilizuje hemostatyczny czop płytkowy. Tabela 11 przedstawia charakterystykę czynników biorących udział w kaskadzie krzepnięcia. Do podstawowych czynników biorących udział w procesie krzepnięcia zaliczamy:

- ✚ 12 białek osocza
- ✚ 1 białko integralne błony komórkowych
- ✚ Fosfolipidy błonowe płytek krwi
- ✚ Ca<sup>2+</sup>

**Tabela 11.** Osoczowe czynniki krzepnięcia [wg [79][80)].

Czynnik	Funkcja	Stężenie w osoczu (mg/l)	Masa cząsteczkowa (kD)
Fibrynogen (czynnik I)	Prekursor fibryny	3000	340
Protrombina (czynnik II)	Aktywacja I, V, VII, VIII, XI, XIII, białka C, płytek krwi	100	72
Czynnik V (proakceleryna)	Kofaktor kompleksu X-protrombinaza	10	330
Czynnik VII (prokonwertyna)	Aktywuje czynniki IX, X	0,5	50
Czynnik VIII (czynnik antyhemofilny A)	Kofaktor kompleksu IX-tenaza	0,1	330

Czynnik IX (czynnik antyhemofilowy B, czynnik Christmаса)	Aktywuje X: tworzy kompleks tenaza z czynnikiem VIII	5	160
Czynnik X (czynnik Stuarta)	Kompleks protrombinazy z czynnikiem V: aktywuje czynnik II	10	56
Czynnik XI (PTA, <i>plasma thromboplastin antecedent</i> )	Aktywuje czynnik IX	5	160
Czynnik XII (czynnik Hegemana)	Aktywuje czynnik XI, VII i prekalikreinę	30	80
Czynnik XIII	Czynnik stabilizujący fibrynę	60	320
Czynnik tkankowy	Kofaktor czynnika VIIa	0,1	45
Czynnik von Willebranda	Wiąże się z czynnikiem VIII, pośredniczy w adhezji płytek	10	-

### 1.6.3.1 Kaskada krzepnięcia

#### Faza inicjacji

Proces krzepnięcia zostaje rozpoczęty z chwilą pojawienia się TF we krwi w następstwie uszkodzenia lub aktywacji śródbłonna naczyniowego. TF tworzy kompleks z czynnikiem VII lub czynnikiem VIIa, aby aktywować czynnik IX i czynnik X. Czynnik X powoduje zmianę protrombiny w trombinę. Wytwarzanie trombiny w tej reakcji jest jednak znacznie ograniczone. Kompleks TF-VIIa-Xa jest szybko rozkładany przez inhibitor szlaku TF (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*).

#### Faza amplifikacji

Ponieważ ilość wytworzonej trombiny nie wystarcza, aby utworzyć stabilną fibrynę jest jednak wystarczająca do aktywacji płytek krwi oraz oddzielenie czynnika VIII od vWF.



Ponadto trombina, która jest generowana w fazie inicjacji, dalej aktywuje czynnik V i czynnik VIII, który służy jako kofaktor w kompleksie protrombinazy i przyspiesza aktywację odpowiednio trombiny przez czynnik X i czynnik Xa przez czynnik IXa.

#### Faza propagacji

Akumulacja kompleksów enzymatycznych tenazy i protrombinazy na powierzchni płytek krwi wspomaga silne wytwarzanie trombiny i aktywację płytek. Zapewnia to ciągłe wytwarzanie trombiny, a następnie fibryny tworząc wystarczająco spójny skrzep.

#### Stabilizacja

Trombina w raz z  $\text{Ca}^{2+}$  prowadzi do aktywacji czynnika XIII (czynnika stabilizującego fibrynę), który nabiera właściwości transglutaminazy. Czynnik XIIIa kowalencyjnie łączy monomery fibryny i zapewnia wytrzymałość i stabilność fibrynie wbudowanej w czop płytkowy. Ponadto trombina aktywuje aktywowany trombiną inhibitor fibrynolizy (TAFI, *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*), który chroni skrzep przed fibrynolizą [79][80].

#### **1.6.3.2 Endogenne inhibitory krzepnięcia**

Po rozpoczęciu kaskady krzepnięcia inne substancje- naturalne antykoagulanty, działają jak hamulce ograniczające krzepnięcie do ograniczonego obszaru uszkodzenia. Zapobiegają w ten sposób niekontrolowanemu rozrostowi skrzepów, które mogą osiągnąć na tyle duże rozmiary, aby zablokować normalny przepływ krwi [81]. Do naturalnych inhibitorów krzepnięcia należą:

- ✓ Antytrombina (AT) - białko będące inhibitorem proteazy serynowej, które wiąże i dezaktywuje trombinę, czynniki IXa, Xa, XIa i XIIa. W obecności heparyny zwiększa się aktywność enzymatyczna AT o około 1000 razy. AT jest aktywowana przez wiązanie siarczanu heparyny obecnego na powierzchni komórek śródbłonna. AT wiąże czynniki krzepnięcia w stosunku 1:1, a kompleks ten jest usuwany przez komórki układu siateczkowo-śródbłonowego.

Inne inhibitory trombiny to kofaktor heparyny II,  $\alpha_2$ -makroglobulina,  $\alpha_1$ -antytrypsyna oraz inhibitor C1-esterazy [79][80].

- ✓ Układ inhibitorowy białka C jest to składający się z czterech elementów szlak odpowiedzialny za hamowanie fazy propagacji krzepnięcia. Do składowych układu inhibitorowego białka C zalicza się:
  - I. Białko C - proteaza serynowa o silnych właściwościach przeciwzakrzepowych, profibrynolitycznych oraz przeciwzapalnych. Aktywatorem białka C jest trombina, która tworzy aktywowane białko C (APC) i działa poprzez hamowanie aktywowanych czynników V i VIII.
  - II. Trombomodulina – receptor transbłonowy komórek śródbłonka dla trombiny. Zapobiega tworzeniu się skrzepu w nieuszkodzonym naczyniu poprzez wiązanie z trombiną.
  - III. Śródbłonkowy receptor białka C- kolejny receptor transbłonowy, którego działanie wspomaga aktywację białka C.
  - IV. Białko S- glikoproteina zależna od witaminy K, syntetyzowana przez komórki śródbłonka oraz hepatocyty. Występuje w osoczu w postaci wolnej stanowiącej około 40% oraz w formie związanej z białkiem wiążącym C4b (około 60%). Działanie przeciwzakrzepowe jest wynikiem działania formy wolnej białka S, podczas gdy forma związana działa jako inhibitor układu dopełniacza. Białko S działa jako kofaktor APC w inaktywacji czynników Va oraz VIIIa. Powoduje również bezpośrednie odwracalne hamowanie kompleksu protrombinazy.
- ✓ TFPI- to polipeptyd wytwarzany przez komórki śródbłonka. Działa jako naturalny inhibitor szlaku zależnego od TF poprzez hamowanie kompleksu TF-VIIa.
- ✓ Białko Z w kompleksie z inhibitorem proteaz- składnik układu przeciwzakrzepowego wytwarzanego w wątrobie przy udziale witaminy K. Hamuje czynnik Xa w reakcji wymagającej białka Z i wapnia [79].

#### **1.6.4 Fibrynoliza**

Fibrynoliza to proces którego istotą jest rozpuszczenie zakrzepu. Podobnie jak kaskada krzepnięcia, fibrynoliza jest ściśle kontrolowana przez szereg kofaktorów,

inhibitorów oraz receptorów. Tabela 12 przedstawia podstawowe elementy uczestniczące w procesie fibrynolizy [82]. Głównym enzymem uczestniczącym w lizie fibryny jest plazmina (proteaza serynowa), powstająca z nieaktywnego prekursora- plazminogenu w wyniku działania aktywatorów: tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) oraz aktywator plazminogenu typu urokinazy (u-PA) [83]. Dodatkowo za silnych egzogennych aktywatorów plazminogenu uważa się białka bakteryjne streptokinazę oraz stafylokinazę, pochodzące od paciorkowców i gronkowców [80]. t-PA jest syntetyzowany i uwalniany przez komórki śródbłonna, natomiast u-PA jest produkowany m.in. przez monocyty, makrofagi i nabłonek dróg moczowych. Oba aktywatory mają krótkie okresy półtrwania w krążeniu (4–8 minut). u-PA ma mniejsze powinowactwo do plazminogenu niż t-PA, ponadto nie wymaga fibryny jako kofaktora. W warunkach fizjologicznych u-PA działa głównie w miejscach pozanaczyniowych. Receptor u-PA jest niezbędny do aktywacji plazminogenu związanego na powierzchni komórki [83]. Zarówno t-PA jak i u-PA są usuwane przez wątrobę. Plazmina zwiększa aktywność aktywatorów, przekształcając jednołańcuchowe t-PA i u-PA w ich dwułańcuchowe odpowiedniki, przez co wywiera dodatnie sprzężenie zwrotne na własną aktywację [81].

**Tabela 12.** Główne czynniki biorące udział w procesie fibrynolizy (wg [80][83]).

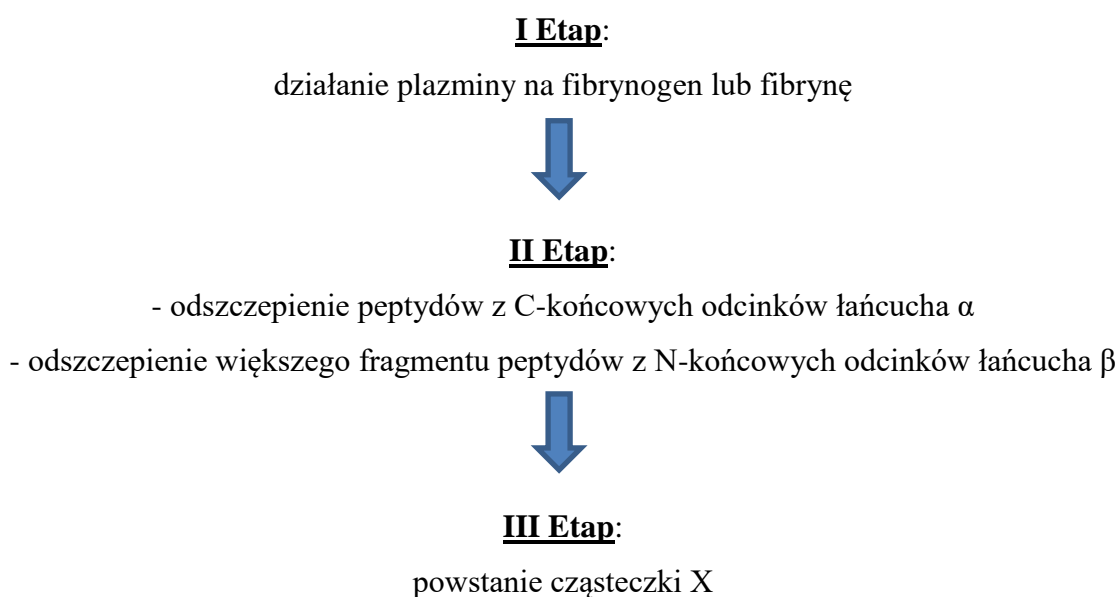
Czynnik	Funkcja	Masa cząsteczkowa (kDa)
Plazminogen	Glikoproteina, proenzym plazminy	92
Plazmina	Główny enzym rozkładający fibryne	85
t-PA	Aktywator plazminogenu	70
u-PA	Aktywator plazminogenu	53
PAI-1	Inhibitor aktywatora plazminogenu	50
PAI-2	Inhibitor aktywatora plazminogenu	60
$\alpha$ 2-AP	Główny fizjologiczny inhibitor plazminogenu	
TAFI	Enzym o właściwościach prokarboksypeptydazy	61

t-PA- tkankowy aktywator plazminogenu; u-PA- aktywator plazminogenu typu urokinazy; PAI-1- inhibitor 1 aktywatora plazminogenu; PAI-2- inhibitor 2 aktywatora plazminogenu;  $\alpha$ 2-AP-  $\alpha$ 2-antyplazmina; TAFI- inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną;

Inhibitory fibrynolizy pełnią istotną funkcję w zapobieganiu nadmiernej nieregulowanej aktywności plazminy lub aktywatorów plazminogenu. Krążąca plazmina oraz t-PA i u-PA są neutralizowane przez inhibitory proteazy serynowej lub serpiny. Serpiny wiążą się kowalencyjnie z docelowymi enzymami, a następnie są usuwane z krążenia. Do najważniejszych inhibitorów fibrynolizy zaliczamy: inhibitor aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1), inhibitor aktywatora plazminogenu-2 (PAI-2) oraz  $\alpha$ 2-antyplazmine ( $\alpha$ 2-AP).  $\alpha$ 2-AP wiąże się z plazminą w stosunku 1:1, po czym obie cząsteczki stają się nieaktywne. W sytuacji gdy plazmina jest związana z fibryną, nie dochodzi do oddziaływań z  $\alpha$ 2-AP. t-PA i u-PA są hamowane przez PAI-1, który jest uwalniany do krwi głównie z komórek śródbłonna oraz płytek krwi. Inne nieserpinowe inhibitory plazminy obejmują  $\alpha$ 2-makroglobulinę, inhibitor C1-esterazy i elementy szlaku kontaktowego kaskady krzepnięcia.

TAFI jest nieserpinowym inhibitorem fibrynolizy, który jest aktywowany przez trombinę związaną z trombomoduliną. TAFI to prokarboksypeptydaza B2, która usuwa z fibryny C-końcowe reszty lizyny i argininy, zmniejszając w ten sposób liczbę dostępnych miejsc wiązania plazminogenu i t-PA, spowalniając wytwarzanie plazminy i stabilizując skrzep [82].

Plazminogen zostaje aktywowany i przekształca się w plazminę, która zaczyna degradować skrzeplinę. W wyniku rozkładu fibrynogenu oraz fibryny powstają różnej wielkości cząsteczki białkowe- produkty degradacji fibrynogenu (FDP, *fibrin degradation product*), schemat procesu przedstawia Rycina 12.



- przecięcie trzech łańcuchów polipeptydowych w pierwszej podjednostce cząsteczki X



**IV Etap:**

powstaje fragment Y oraz fragment D

- działanie plazminy na fibrynogen- fragment D (monomer)

- działanie plazminy na fibrynę ustabilizowaną czynnikiem XIIIa- powstanie fragment D (dimer) D-dimer



**V Etap:**

działanie plazminy na fragment Y

- powoduje ponowne przecięcie trzech łańcuchów polipeptydowych w drugiej podjednostce, w wyniku czego powstaje

- fragment D lub cząsteczka D-dimeru
- fragment E [82][84].

**Ryc. 12.** Uproszczone etapy oddziaływania plazminy z fibryną oraz fibrynogenem- powstanie FDP.

## **2. Cel pracy**

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu lewosimendanu na układ krzepnięcia oraz zmiany stężenia biomarkerów sercowo-naczyniowych u pacjentów z niewydolnością serca.

Cel ten zrealizowano poprzez:

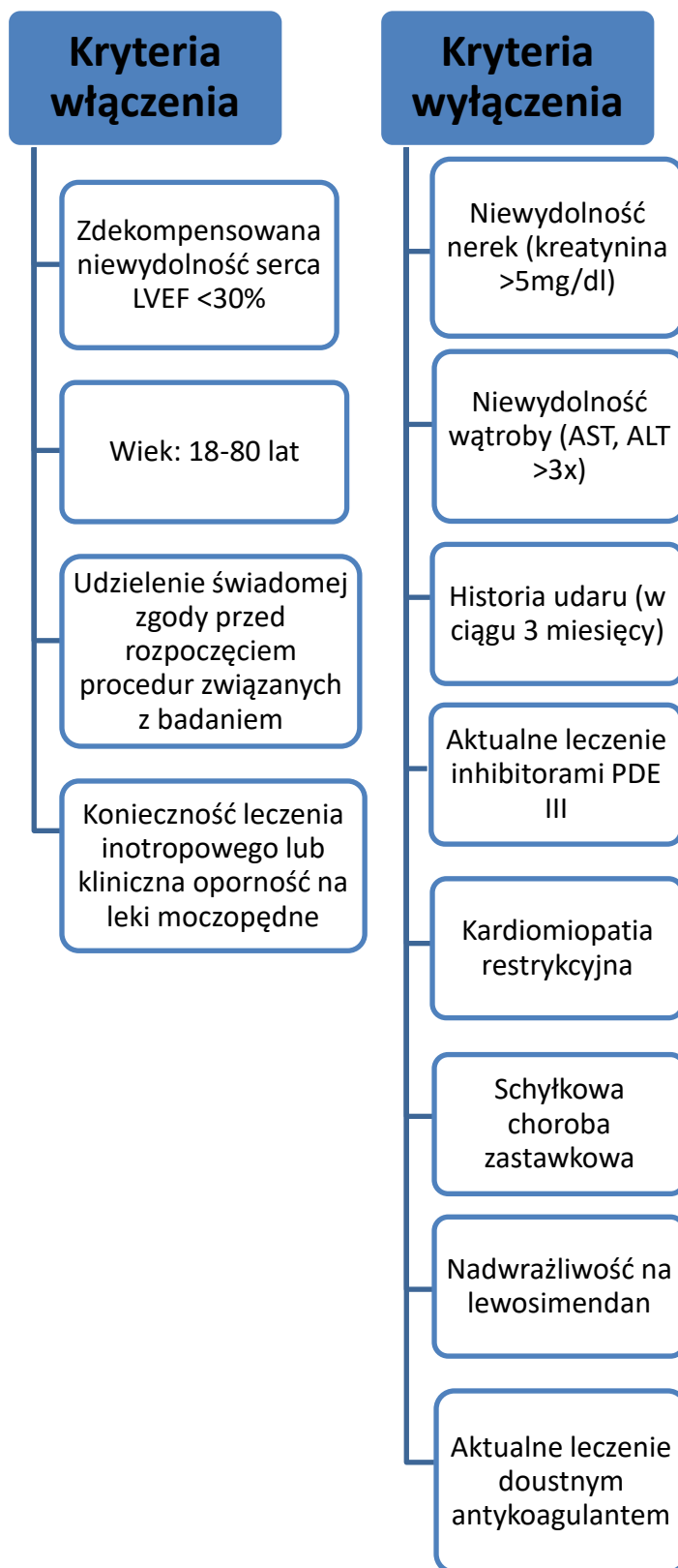
- I. Ustalenie wpływu lewosimendanu oraz jego aktywnych metabolitów na hemostazę, w tym czynność płytek krwi oraz tworzenie skrzepliny u pacjentów z niewydolnością serca.
- II. Określenie czy stan kliniczny pacjenta wpływa na mechanizm działania lewosimendanu związany z układem krzepnięcia.
- III. Ocenę zależności pomiędzy stężeniem biomarkerów sercowo-naczyniowych a wpływem lewosimendanu.

### **3. Pacjenci, materiały i metody**

#### **3.1. Charakterystyka badanej grupy pacjentów**

Badaniem objęto pacjentów Kliniki Kardiologii i Chorób Wewnętrznych Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy. W badaniu wzięło udział 25 pacjentów, w wieku od 40 do 80 lat z rozpoznaniem dekompensacji przewlekłej niewydolności serca.

Kryteria włączenia oraz wyłączenia z badania przedstawia Rycina 13.



Ryc. 13. Kryteria włączenia i wyłączenia z badania.



Wszyscy pacjenci wymagali wsparcia inotropowego. Lewosimendan podawano w ciągłym wlewie dożylnym przez 24 godziny według schematu: 0,2 µg/kg/min przez 1 godzinę, a następnie 0,1 µg/kg/min przez 23 godziny.

### 3.2 Materiał do badania

Badanym materiałem była krew żylna pobrana przy użyciu zamkniętego systemu próżniowego z żyły łokciowej.

Próbki krwi pełnej pobierano w siedmiu punktach czasowych, według następującego schematu przedstawionego na Rycinie 14:



**Ryc. 14.** Punkty czasowe, w których pobierano materiał do badań.

Zestawy do pobierania materiału zawierały próbki z szeregiem antykoagulantów w zależności od punktu czasowego, w którym były pobrane:

- Punkty czasowe (A), (D), (G)- zestaw 6 próbek
  - 3x 4,5ml (BD Vacutainer® 9NC 0,5 ml 0,105M buffered trisodium citrate)
  - 1x 4ml (VACUETTE® NH sodium heparin tubes)
  - 1x 3ml (Multiplate® Hirudin Blood Tube (Double-Wall))
  - 1x 4ml (VACUETTE® TUBE 4 ml K2E K2EDTA)
- Punkt czasowy (B)- zestaw 4 próbek
  - 1x 4,5ml (BD Vacutainer® 9NC 0,5 ml 0,105M buffered trisodium citrate)

- 1x 3ml (Multiplate<sup>®</sup> Hirudin Blood Tube (Double-Wall))
- 1x 4ml (VACUETTE<sup>®</sup> TUBE 4 ml K2E K2EDTA)
- 1x 6ml (BD Vacutainer<sup>®</sup> CLOT ACTIVATOR TUBE)
- Punkty czasowe (C), (E), (F)- zestaw 3 probówek
  - 1x 4,5ml (BD Vacutainer<sup>®</sup> 9NC 0,5 ml 0,105M buffered trisodium citrate)
  - 1x 3ml (Multiplate<sup>®</sup> Hirudin Blood Tube (Double-Wall))
  - 1x 4ml (VACUETTE<sup>®</sup> TUBE 4 ml K2E K2EDTA)

Probówki z materiałem pobranym na EDTA (kwas wersenowy, *ethylenediaminetetraacetic acid*) odwirowano przez 15 minut w 3000 obrotów/minutę w celu uzyskania osocza, które następnie zabezpieczono i przechowywano w temperaturze -80°C w Pracowni Biotechnologii Eksperymentalnej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Po zakończeniu rekrutacji pacjentów z zabezpieczonego, uprzednio rozmrożonego materiału wykonano badanie farmakokinetyki lewosimendanu oraz jego metabolitów.

Oznaczenie podstawowych parametrów laboratoryjnych, które obejmowało: morfologię krwi obwodowej, jonogram, CRP, kreatyninę oraz stężenie biomarkerów sercowo-naczyniowych: galektyny-3, BNP, a także hs-cTnI wykonano w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy.

Część oznaczeń obejmujących analizę funkcji płytek oraz układu krzepnięcia wykonano natychmiast po pobraniu materiału od pacjenta w krwi pełnej w Pracowni Biotechnologii Eksperymentalnej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

### **3.3 Metody oznaczeń**

#### **3.3.1 Badanie funkcji płytek oraz układu krzepnięcia**

##### **3.3.1.1 Agregometria impedancyjna**

Agregometr impedancyjny (Multiplate–Dynabyte wielokanałowy analizator funkcji płytek krwi, Roche Diagnostics, Francja) to rekomendowane urządzenie stosowane w warunkach szpitalnych jako przyłózkowa metoda oceny funkcji płytek krwi [85]. W

niniejszym badaniu analizę funkcji płytek z wykorzystaniem analizatora Multiplate wykonano we wszystkich punktach czasowych. Materiałem badanym była krew pełna pobrana do probówki zawierającej hirudynę. Wykonano następujące testy:

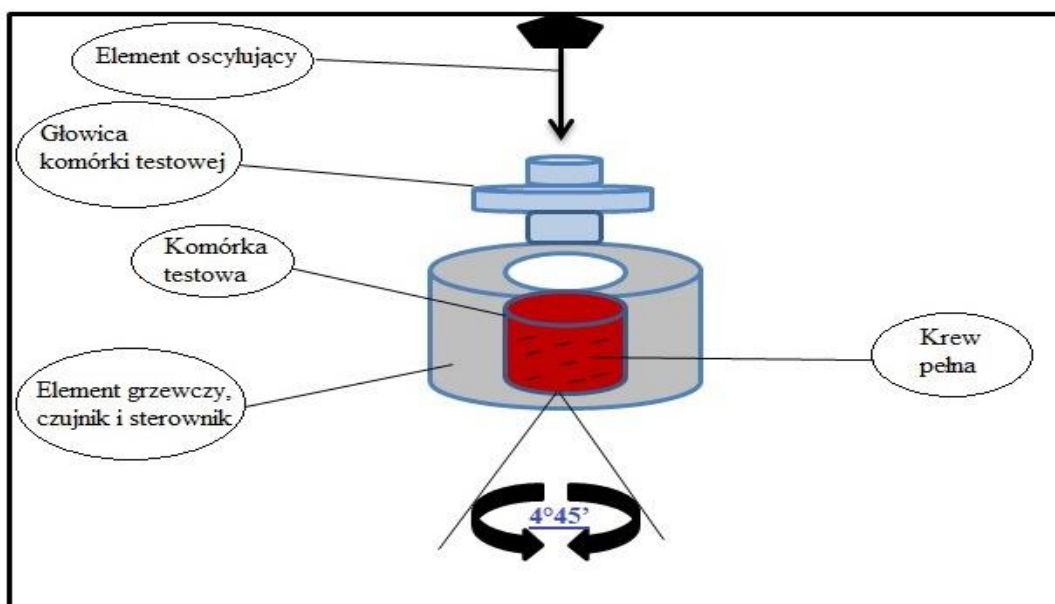
- ADPtest: Odczynnik zawiera ADP, który uruchamia szereg receptorów na powierzchni płytek, w tym receptor  $P_2Y_{12}$ , który jest uważany za najważniejszy receptor ADP na powierzchni płytek krwi.
- ASPItest: Odczynnik zawiera kwas arachidonowy, który jest konwertowany przez cyklooksigenazę do tromboksanu  $A_2$ .
- COLtest: Odczynnik zawiera kolagen, który aktywuje receptor kolagenu prowadząc do uwolnienia endogennego kwasu arachidonowego, który przekształcany jest w tromboksan  $A_2$  i aktywuje płytki krwi.
- TRAPtest: Odczynnik zawiera peptyd aktywujący receptor trombinowy-6 (TRAP-6, *thrombin receptor activator for peptide 6*), który jest silnym agonistą płytkowym i stymuluje agregację płytek poprzez receptor trombinowy PAR-1.
- RISTOtest: Odczynnik zawiera ristocetynę. Jest to substancja przeciwbakteryjna, która tworzy kompleksy z vWF. W utworzonym kompleksie vWF zmienia swoją konformację w sposób umożliwiający wiązanie się z płytkami krwi. Wiązanie kompleksów ristocetyny-vWF prowadzi do agregacji płytek krwi, jak również do ich aktywacji. Aktywacja ta opiera się na wiązaniu vWF z receptorem GpIb.

#### Przebieg testu:

Badanie wykonano w jednorazowej kuwecie pomiarowej wyposażonej w dwie elektrody. Dodanie odpowiedniego aktywatora w zależności od wykonywanego testu do rozcieńczonej próbki krwi pełnej (1:1 krew i 0,9% NaCl) mobilizuje płytki do przemieszczania się w kierunku elektrod, a następnie agregacji, co zostaje zarejestrowane przez układ pomiarowy urządzenia jako zmiana rezystancji (impedancji). Następnie sygnał elektryczny jest automatycznie przekształcany w postać graficzną, gdzie różnice rezystancji zamieniane są na jednostki pola pod krzywą (AUC, *area under the curve*). Ostatecznym wynikiem pomiaru funkcji płytek jest średnia dla dwóch elektrod [86].

### 3.3.1.2 Tromboelastografia

Tromboelastograf TEG<sup>®</sup> (Haemonetics Corp., Braintree, MA, USA) to urządzenie służące do monitorowania procesu krzepnięcia w sposób ciągły, dzięki czemu otrzymuje się parametry odnoszące się, do każdej fazy procesu krzepnięcia (od tworzenia agregatu płytkowego, przez proces jego wzmocnienia włóknami fibryny aż do fibrynolizy). Badania przeprowadzono w pojemnikach testowych (komórkach testowych). Schemat układu pomiarowego przedstawia Rycina 15. Analizę wykonano we krwi pełnej pobranej do probówki z podłożem zawierającym cytrynian sodu oraz heparynę w zależności od rodzaju wykonywanego testu. Wszystkie testy zostały wykonane zgodnie z instrukcją producenta.



Ryc. 15. Schemat układu pomiarowego tromboelastografu TEG<sup>®</sup>.

- Test Kaolinowy- test aktywacji szlaku wewnętrznego CK

Test Kaolinowy jest jakościowym testem diagnostycznym *in vitro* stosowanym w analizatorze hemostazy TEG<sup>®</sup> do monitorowania procesu krzepnięcia na drodze wewnętrznej w próbkach pełnej krwi. Test Kaolinowy wykonano we wszystkich punktach czasowych.

#### Przebieg testu:

Do pojemnika z odczynnikiem aktywacyjnym dodano 1000 µl krwi pełnej pobranej do probówki zawierającej 0,109 mol/l (3,2%) cytrynianu sodu. Następnie do komórki testowej

dodano 20  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (w celu częściowej rekalcytacji). W kolejnym kroku przeniesiono 340  $\mu\text{l}$  wcześniej przygotowanej mieszaniny (krew + kaolin) do komórki testowej. Zawartość pojemnika testowego wprowadzono w ruch oscylacyjny i obserwowano proces powstawiania skrzepu. Sygnał elektryczny powstaje w wyniku konwersji drgań przez transformator. Wyniki prezentowane są w formie graficznej, z której można odczytać następujące wartości:

- czas reakcji (R)- oznacza czas, który upłynął od zainicjowania testu do rozpoczęcia formowania się skrzepu (zakres referencyjny: 2-8 min);
  - kinetyka skrzepu (K)- czas który upłynął do momentu, gdy skrzep osiąga odpowiednią spoistość co jest szybkością tworzenia skrzepu (zakres referencyjny: 1-3 min);
  - kąt ( $\alpha$ )-Angle- oznacza szybkość odkładania i sieciowania fibryny. Kąt odnosi się do wartości K i mierzy tempo wzrostu i wzmocnienia skrzepu (zakres referencyjny: 55-78 deg);
  - maksymalna amplituda (MA)- jest to punkt będący odzwierciedleniem maksymalnej spoistości oraz jędrności skrzepu (zakres referencyjny: 51-69 mm);
  - liza po 30 min (LY30)- to procent zlizowanego skrzepu po 30 min od osiągnięcia maksymalnej spoistości (zakres referencyjny: 0-8 %) [87].
- TEG<sup>®</sup> Platelet Mapping™ assay (ADP oraz AA)

Test mapowania płytek krwi TEG<sup>®</sup> jest jakościowym testem diagnostycznym *in vitro* stosowanym do oceny czynności płytek krwi u pacjentów, którzy otrzymywali leki hamujące aktywność płytek krwi. Najważniejszymi parametrami uzyskanymi w teście są: (% Inhib) oraz (% Agg). (% Inhib)- wskazuje na zmniejszenie udziału płytek krwi w ogólnej sile skrzepu. Odsetek płytek krwi, które nie uległy zahamowaniu (% Agg), określa się po przez porównanie udziału niehamowanych płytek krwi z wyjściowym udziałem płytek krwi.

Test mapowania płytek obejmuje 3 komórki testowe. Połączenie uzyskanych z nich wyników umożliwia określanie (% Inhib) oraz (% Agg). Test mapowania płytek krwi TEG<sup>®</sup> wykonano w trzech punktach czasowych (0h, 12h oraz 72h).

- I. Komórka testowa określa ogólny udział płytek krwi w sile skrzepu.

- II. Komórka testowa określa skrzep bez płytek (blokada trombiny; specjalny aktywator umożliwiający tworzenie skrzepu opartego na włóknach fibryny)
- III. Komórka testowa określa wpływ agonisty (ADP oraz AA) na udział płytek krwi w spoistości tworzonego skrzepu.

### **3.3.1.3 System całościowej analizy formowania skrzepu**

System całościowej analizy formowania skrzepu (T-TAS, *Total Thrombus Formation Analysis System*; Fujimori Kogyo Co., Tokio, Japonia) to zautomatyzowany system wykorzystujący mikrochipy z komorą przepływową do ilościowej oraz jakościowej analizy procesu powstawania skrzepliny w warunkach przepływu krwi pełnej. Urządzenie to umożliwia ocenę zaburzeń czynności płytek krwi oraz układu krzepnięcia w warunkach imitujących w najwyższym stopniu z dostępnych metod warunki fizjologiczne.

Istnieją dwa rodzaje mikrochipów (komór przepływowych):

- ❖ PL-chip
- ❖ AR-chip

PL-chip jest przeznaczony do analizy tworzenia się skrzepliny płytkowej w warunkach przepływu na pokrytym kolagenem torze analitycznym składającym się z kanałów mikrokapilarnych imitujących przepływ turbulentny. Tworzenie się skrzepliny płytkowej jest bezpośrednim wskaźnikiem pierwotnej funkcji hemostatycznej pacjenta. Test przeprowadza się w warunkach imitujących przepływ tętniczy przy użyciu antykoagulantu (hirudyna), który hamuje trombinę oraz czynnik Xa. Blokując w ten sposób kaskadę krzepnięcia umożliwia się chipowi PL specyficzny pomiar tylko tworzenia się skrzepliny płytkowej. Podczas testu przepływająca krew jest wystawiona na tętnicze naprężenia ścinające (dzięki obecności kanałów mikrokapilarnych) w obecności powierzchni pokrytej kolagenem, co powoduje przyłączanie płytek krwi do kolagenu za pośrednictwem vWF i aktywację płytek.

AR-chip został zaprojektowany do ilościowej analizy procesu powstawania tzw. „białego skrzepu”, w którym uczestniczy połączona aktywacja płytek krwi i układu krzepnięcia w warunkach przepływu żylnego. Z tego względu komora przepływowa imitująca naczynie krwionośne jest pokryta kolagenem oraz czynnikiem tkankowym, które aktywują płytki krwi.

Dzięki czemu AR-chip umożliwia ocenę zdolności współpracy płytek krwi i układu krzepnięcia w tworzeniu skrzepliny.

Uzyskana podczas analizy przepływu krzywa ciśnienia odzwierciedla szybkość tworzenia skrzepliny, twardość skrzepliny, krzepliwość oraz czynność płytek krwi [88].

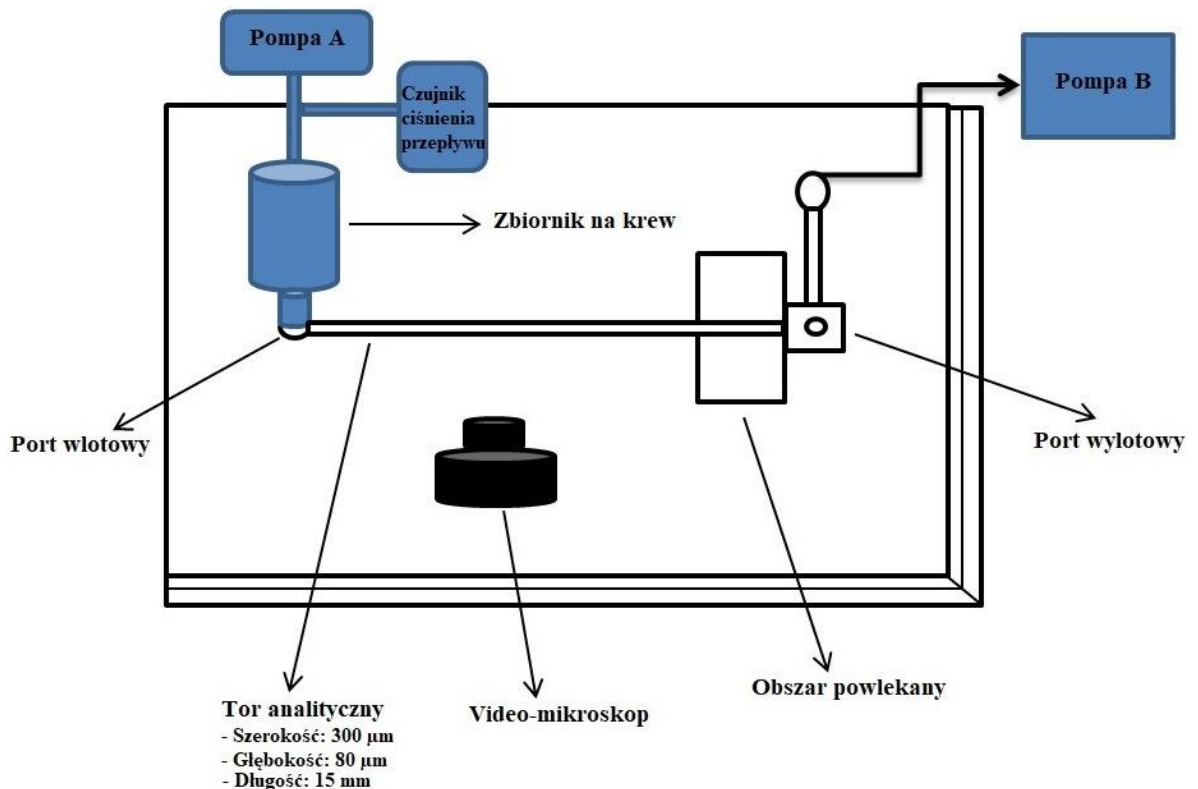
Test obejmował procedurę z wykorzystaniem chip'a AR. Próbki krwi pełnej pobrano do probówek z podłożem zawierającym cytrynian sodu. Powyższą analizę wykonano w trzech punktach czasowych (0h, 12h oraz 72h).

#### Przebieg testu:

480  $\mu\text{l}$  krwi pełnej z antykoagulantem zmieszano z 20  $\mu\text{l}$  0,3 M  $\text{CaCl}_2$  zawierającego 1,25  $\mu\text{g/ml}$  CTI (inhibitor trypsyny kukurydzianej, *Corn trypsin inhibitor*) bezpośrednio przed przeniesieniem do zbiornika na krew. Zbiornik powleczony jest powłoką przeciwzakrzepową (poli-2-metoksyetyloakrylan), a dodatkowo krew połączono z mieszaniną  $\text{CaCl}_2/\text{CTI}$  co zapobiega krzepnięciu krwi w zbiorniku podczas analizy, która trwa do 30 min. Ze zbiornika krew jest wtłaczana precyzyjną pompą A (HS210; Uniflows, Tokio, Japonia) do komory przepływowej przez port wlotowy. Schemat układu pomiarowego przedstawia Rycina 16. Proces formowania skrzepliny jest monitorowany przez zmiany ciśnienia przepływu w kapilarze za pomocą czujnika ciśnienia umieszczonego pomiędzy pompą HS210 a zbiornikiem. Dodatkowo cały proces przepływu oraz formowania skrzepliny jest w sposób ciągły rejestrowany przez wideomikroskop ( $\times 10$ ) umieszczony pod komorą przepływową. Pompa B służy do infuzji 25 mM EDTA (pH 10,5) z szybkością 80  $\mu\text{l}/\text{min}$ , aby zapobiec wykrzepianiu krwi w otworze wylotowym. Szybkość przepływu krwi pełnej po rekalcytacji ustalono na 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , co odpowiada początkowej szybkości ścinania ściany 600  $\text{s}^{-1}$ , w oparciu o trójwymiarową analizę przepływu przy użyciu oprogramowania Fluent (ANSYS Co. Ltd., Tokio, Japonia). Po rozpoczęciu przepływu krwi przez tor analityczny płytki krwi i zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia są jednocześnie aktywowane przez kolagen i TF. Narastający skrzep na powierzchni komory przepływowej powoduje stopniową okluzję, czego konsekwencją jest zwiększające się ciśnienie przepływu.

Analizę wzorca ciśnienia przepływu podczas formowania skrzepu ułatwia wykorzystanie dostępnych parametrów:

- T10 (czas do osiągnięcia ciśnienia 10 kPa)- czas, który upływał do momentu uzyskania ciśnienia przepływu na poziomie 10 kPa w odniesieniu do wartości bazowej. Ciśnienie bazowe jest mierzone jako średnia z ciśnień przepływu w 50-70 s.
- OT (czas okluzji)- czas, który upływa do wzrostu ciśnienia przepływu powyżej 80 kPa od wartości bazowej, co odpowiada prawie całkowitemu zamknięciu kapilary przepływowej przez skrzeplinę.
- T10–80 (czas od 10 do 80 kPa) to okres czasu między T10 a OT, określa tempo wzrostu skrzepliny.
- AUC<sub>30</sub> ( pole pod krzywą po upływie 30 min) pole pod krzywą ciśnienia przepływu (poniżej 80 kPa) przez czas 30 min od rozpoczęcia testu. AUC<sub>30</sub> służy do ilościowej analizy formowania skrzepliny, gdy OT nie jest osiągnięte w trakcie badania [89].



Ryc. 16. Schemat mikrochip'u AR.



### **3.3.2 Farmakokinetyka lewosimendanu i jego metabolitów**

Stężenie lewosimendanu oraz jego aktywnych metabolitów (OR-1896 i OR-1855) w osoczu krwi oceniano metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w próbkach uzyskanych we wszystkich 7 punktach czasowych. Próbki krwi pacjentów pobrane do probówek zawierających EDTA były odwirowywane, a następnie osocze przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po zebraniu wszystkich prób przeprowadzono analizę, w celu zapewnienia tych samych warunków badania dla wszystkich oznaczanych próbek. Analizowane substancje wyekstrahowano roztworem metanolu o temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ . Pomiarów wykonano przy użyciu systemu Shimadzu UPLC Nexera X2 składającego się z pomp LC-30AD, autosamplera SIL-30AC, pieca kolumnowego CTO-20AC, zespołu zaworowego FCV-20-AH2 i odgazowywacza DGU-20A5R sprzężonego z potrójną masą kwadropolową Shimadzu 8030 ESI spektrometr. Granice oznaczenia ilościowego wynosiły  $4,69\text{ ng/ml}$  zarówno dla lewosimendanu, jak i metabolitów OR-1896 i OR-1855.

### **3.3.3 Biomarkery sercowo-naczyniowe**

#### **3.3.3.1 Galektyna -3**

Oznaczenia stężenia galektyny-3 wykonano w osoczu pobranym do probówek zawierających antykoagulant EDTA z wykorzystaniem zestawu Alinity i Galectin-3 Reagent Kit na analizatorze Architect i1000sr (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Niemcy). Jest to dwustopniowy test immunochemiczny z użyciem mikrocząstek i znacznika chemiluminescencyjnego (CMIA, *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*).

Zasada tej metody polega na:

1. Mieszaniu próbki osocza z paramagnetycznymi mikrocząstkami opłaszczonymi przeciwciałami M3/38 przeciwko galektynie-3.
2. Inkubacji i płukaniu mikrocząstek opłaszczonych przeciwciałami i związaną z nimi galektyną-3.
3. Utworzenie mieszaniny reakcyjnej poprzez dodanie koniugatu zawierającego znakowane akrydyną przeciwciała 87B5 przeciwko galektynie-3.
4. Kolejny cykl inkubacji i płukania po którym dodawany jest roztwór przygotowawczy Pre-Trigger Solution oraz roztwór wyzwalający reakcję Trigger Solution.

Natężenie sygnału powstałego w reakcji chemiluminescencji mierzone jest we względnych jednostkach światła (RLU, relative light unit). Stężenie galektyny-3 w badanej próbce ocenia się na podstawie wartości RLU zmierzonej przez układ pomiarowy. Analityczny zakres pomiarowy danej metody wynosi 4,0 do 114,0 ng/ml. Limit detekcji testu wynosi 0,9 ng/ml. 97,5 percentyl wynosi: dla kobiet- 28,7 ng/ml oraz dla mężczyzn- 26,1 ng/ml.

### **3.3.3.2 Sercowa troponina I**

Oznaczenia stężenia cTnI w osoczu pobranym do próbek zawierających EDTA wykonano z wykorzystaniem zestawu Alinity i STAT High Sensitive Troponin-I Reagent Kit na analizatorze Alinity i (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Niemcy). Jest to dwustopniowy test immunochemiczny z użyciem mikrocząstek i znacznika chemiluminescencyjnego.

Zasada tej metody polega na:

1. Mieszaniu próbki osocza z paramagnetycznymi mikrocząstkami opłaszczonymi przeciwciałami przeciwko TnI.
2. Inkubacji i płukaniu mikrocząstek opłaszczonych przeciwciałami i związaną z nimi cTnI.
3. Utworzenie mieszaniny reakcyjnej poprzez dodanie koniugatu zawierającego znakowane akrydyną przeciwciała przeciwko TnI.
4. Kolejny cykl inkubacji i płukania po którym dodawany jest roztwór przygotowawczy Pre-Trigger Solution oraz roztwór wyzwalający reakcję Trigger Solution .

Natężenie sygnału powstałego w reakcji chemiluminescencji mierzone jest w RLU. Stężenie cTnI w badanej próbce ocenia się na podstawie wartości RLU zmierzonej przez układ pomiarowy. Analityczny zakres pomiarowy danej metody wynosi 3,2 - 50 000,0 ng/l. Limit detekcji testu wynosi 1,3 ng/l. Punkt decyzyjny 99 percentyl dla kobiet wynosi: 16 ng/l, dla mężczyzn: 34 ng/l.

### **3.3.3.3 Peptyd natriuretyczny typu B**

Oznaczenie stężenia BNP w osoczu pobranym do próbek zawierających EDTA wykonano z wykorzystaniem zestawu Alinity i BNP Reagent Kit na analizatorze Alinity i (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Niemcy). Jest to dwustopniowy test immunochemiczny z użyciem mikrocząstek i znacznika chemiluminescencyjnego.

Zasada tej metody polega na:

1. Mieszaniu próbki osocza z paramagnetycznymi mikrocząstkami opłaszczonymi przeciwciałami anti-BNP.
2. Inkubacja i opłukanie mikrocząstek opłaszczonych przeciwciałami i związanym z nimi BNP.
3. Utworzenie mieszaniny reakcyjnej poprzez dodanie koniugatu zawierającego znakowane akrydyną przeciwciała anti-BNP.
4. Kolejny cykl inkubacji i płukania po którym dodawany jest roztwór przygotowawczy Pre-Trigger Solution oraz roztwór wyzwalający reakcję Trigger Solution .

Natężenie sygnału powstałego w reakcji chemiluminescencji mierzone jest w RLU. Stężenie BNP w badanej próbce ocenia się na podstawie wartości RLU zmierzonej przez układ pomiarowy. Przedział pomiarowy testu Alinity i BNP wynosi od 10 do 5000 pg/ml. Limit detekcji testu wynosi 1,7 pg/ml. Zakres referencyjny: < 100 pg/ml.

### **3.3.4 Pozostałe parametry laboratoryjne**

#### **3.3.4.1 CRP**

Oznaczenie stężenia CRP w surowicy wykonano z wykorzystaniem zestawu Alinity c CRP Vario Reagent Kit na analizatorze Alinity c (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Niemcy). Jest to test immunochemiczny, w którym wykorzystywane są lateksowe cząsteczki, służącym do dokładnego i precyzyjnego pomiaru stężenia CRP.

Zasada metody:

Podstawą metody jest reakcja antygen-przeciwciało pomiędzy białkiem CRP obecnym w badanej próbce surowicy a przeciwciałem przeciwko białku CRP zaadsorbowanym na cząsteczkach lateksu obecnym w odczynniku. Na skutek reakcji antygen-przeciwciało zachodzi proces aglutynacji. Proces aglutynacji jest wykrywany jako zmiana absorbancji mierzona przy długości fali 572 nm. Szybkość zmiany absorbancji jest proporcjonalna do ilości CRP obecnego w badanej próbce.

Przedział pomiarowy testu Alinity c CRP Vario dla metody ultraczułej wynosi od 0,40 do 160,00 mg/l. Limit detekcji testu wynosi 0,40 mg/l. Zakres referencyjny: ≤ 5 mg/l.

### **3.3.4.2 Kreatynina**

Oznaczenie stężenia kreatyniny w surowicy wykonano z wykorzystaniem zestawu Alinity c Creatinine (Enzymatic) Reagent Kit na analizatorze Alinity c (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Niemcy). Jest to test enzymatyczny stosowany do ilościowego oznaczania kreatyniny.

Zasada metody:

Metoda ta obejmuje szereg reakcji enzymatycznych. W pierwszym etapie dochodzi do reakcji hydrolizy kreatyniny przy udziale kreatyninazy do kreatyny. Kolejnym krokiem jest hydroliza kreatyny przy udziale kreatynazy do sarkozyny oraz mocznika. Trzecim etapem jest reakcja utlenienia sarkozyny pod wpływem oksydazy sarkozyny do glicyny i formaldehydu, z równoczesnym wytworzeniem nadtlenu wodoru. Powstały nadtlenek wodoru reaguje z 4-aminoantypiryną oraz N-etylo-N-sulfopropyl-m-toluidyną w obecności peroksydazy, dając w rezultacie barwnik chinonoiminowy. Ostatnim etapem jest ocena zmiany absorbancji przy długości fali 548 nm. Zmiana absorbancji jest proporcjonalna do stężenia kreatyniny w próbce.

Przedział pomiarowy testu Alinity c Creatinine (Enzymatic) wynosi od 0,10 do 40,00 mg/dL. Limit detekcji testu wynosi 0,04 mg/dl. Zakres referencyjny: mężczyźni- od 0,73 do 1,18 mg/dl; kobiety- od 0,55 do 1,02 mg/dl.

### **3.3.4.3 Jonogram**

Oznaczenie stężenia sodu, potasu oraz chlorków w surowicy wykonano z wykorzystaniem zestawu Alinity c ICT Sample Diluent na analizatorze Alinity c (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Niemcy).

Zasada metody:

Metoda opiera się o wykorzystanie jonoselektywnych elektrod (ISE) do oznaczania jonów, które wykorzystują membrany wybiórcze dla poszczególnych jonów. Równanie Nernsta przedstawia napięcie elektryczne powstające na membranie pomiędzy elektrodą odniesienia i elektrodą pomiarową. Mierzone napięcie jest porównywane z uprzednio określonym napięciem kalibratora i zamieniane na stężenie jonów.

Przedział pomiarowy testu Alinity c Sodium wynosi od 100 do 200 mmol/l. Przedział pomiarowy testu Alinity c Potassium wynosi od 1,0 do 10,0 mmol/l. Przedział pomiarowy testu Alinity c Chloride wynosi od 50 do 150 mmol/l. Zakres referencyjny u osób dorosłych: sód- od 136 do 145 mmol/l; potas-od 3,5 do 5,1 mmol/l; chlorki- od 98 do 107 mmol/l.

#### **3.3.4.4 Morfologia**

Oznaczenie morfologii krwi obwodowej z krwi pełnej pobranej do probówek zawierających EDTA wykonano z wykorzystaniem analizatora Sysmex: XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japonia).

Wykorzystano następujące technologie do oznaczenia poszczególnych parametrów:

- WBC (leukocyty, *white blood cells*)- Cytometria przepływowa
- RBC (erytrocyty, *red blood cells*) oraz płytki krwi- Impedancja z ogniskowaniem hydrodynamicznym
- HGB (hemoglobina, *hemoglobin*)- Metoda fotometryczna, bezcyjankowa z wykorzystaniem SLS (laurylosiarczan sodu, *sodium lauryl sulfate*).

#### **3.4 Statystyka**

Analizę statystyczną wykonano za pośrednictwem pakietu statystycznego Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc, Palo Alto, USA). Porównanie zmian pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi badanych parametrów dokonywano przy pomocy testu ANOVA Friedmana i współczynnik zgodności Kendalla w przypadku wielu prób oraz testem kolejności par Wilcoxon w sytuacji porównywania pary wyników. Wszystkie analizy poprzedziło badanie normalności rozkładu, który oceniono testem Shapiro-Wilka.

Korelację wybranych parametrów oceniano przy użyciu testu korelacji rang Spearmana.

Dane dotyczące charakterystyki badanej populacji dla zmiennych ilościowych przedstawiono w postaci mediany oraz zakresu międzykwartylowego (Q1- pierwszy kwartyl; Q3- trzeci kwartyl). Natomiast dla zmiennych jakościowych jako wartości liczbowe oraz procentowe.

Za istotność statystyczną przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

## 4. Wyniki

### 4.1 Charakterystyka grupy badanej

W badaniu wzięło udział 25 pacjentów, 4 kobiety i 21 mężczyzn, wymagających leczenia inotropowego z powodu dekomensacji przewlekłej niewydolności serca. Ogólną charakterystykę grupy badanej przedstawiono w Tabeli 13. Wartości mediany parametrów morfologii krwi: WBC oraz płytki krwi jak również stężenie kreatyniny,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  mieściły się w granicach wartości referencyjnych. Wartości RBC, HGB oraz eGFR były obniżone. Z kolei mediana stężeń CRP, a także biomarkerów sercowo-naczyniowych tj. BNP oraz hs-cTnI wykroczała poza granice referencyjne.

**Tabela 13.** Ogólna charakterystyka grupy badanej.

Charakterystyka	Grupa badana (n= 25)
Płeć (męska)	21 (84%)
Wiek (lata)	66,5 ± 13,39
Leki przeciwkrzepliwe/przeciwpłytkowe:	
• ASA	80%
• Heparyna drobnocząsteczkowa	88%
• Antagonista witaminy K	8%
• Inhibitor $\text{P}_2\text{Y}_{12}$	4%
<b>Parametry laboratoryjne</b>	
Morfologia krwi:	
• RBC	4,11 (4,02-4,19)
• WBC	6,31 (5,68-6,97)
• Płytki krwi	155,00 (144,00-186,00)
• HGB	11,40 (9,90-13,10)
eGFR	58,00 (35,00- 88,50)
Kreatynina	1,24 (0,98-1,57)
CRP	17,81 (11,84-38,44)

BNP	1081,81 (549,15-1703,09)
hs-cTnl	32,85 (20,00-72,70)
Galektyna-3	21,9 (18,8-26,50)
Jonogram:	
Na <sup>+</sup>	136,50 (135,10-139,40)
K <sup>+</sup>	3,80 (3,30-4,20)
Cl <sup>-</sup>	99,75 (98,60-102,20)
<b>Funkcja płytek krwi</b>	
Agregometria impedancyjna:	
ADPtest	64,00 (39,00-86,00)
ASPItest	64,00 (40,00-91,00)
COLtest	44,00 (30,00-60,00)
TRAPtest	86,00 (62,00-100,00)
RISTOtest	73,00 (50,00-108,00)
Tromboelastografia:	
MAP-Inh ADP	13,90 (7,80-26,30)
MAP-Inh AA	6,60 (0,00-28,10)
<b>Analiza układu hemostazy</b>	
T-TAS:	
T <sub>10</sub>	7,90 (6,65-11,45)
AUC <sub>30</sub>	1497,40 (776,00-1709,20)
OT	9,55 (8,03-14,27)

Tromboelastografia:	
R	6,45 (5,90-7,90)
K	2,15 (1,60-2,40)
Angle	60,70 (51,60-67,70)
MA	63,90 (61,30-71,65)
LY30	0,60 (0,05-2,35)

Wyniki przedstawiono w postaci mediany oraz rozstępu międzykwartylowego (Q1-Q3) oraz jako liczbę (%); wiek przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe. ASA- kwas acetylosalicylowy; Na<sup>+</sup>- jony sodu; K<sup>+</sup>- jony potasu; Cl<sup>-</sup>- jony chloru; eGFR- szacunkowa wielkość przesączania kłębuszkowego; RBC- erytrocyty; WBC- leukocyty; HGB- hemoglobina; CRP-białko C-reaktywne; BNP- peptyd natriuretyczny typu B; hs-cTnI- sercowa troponina I oznaczana metodą o wysokiej czułości.

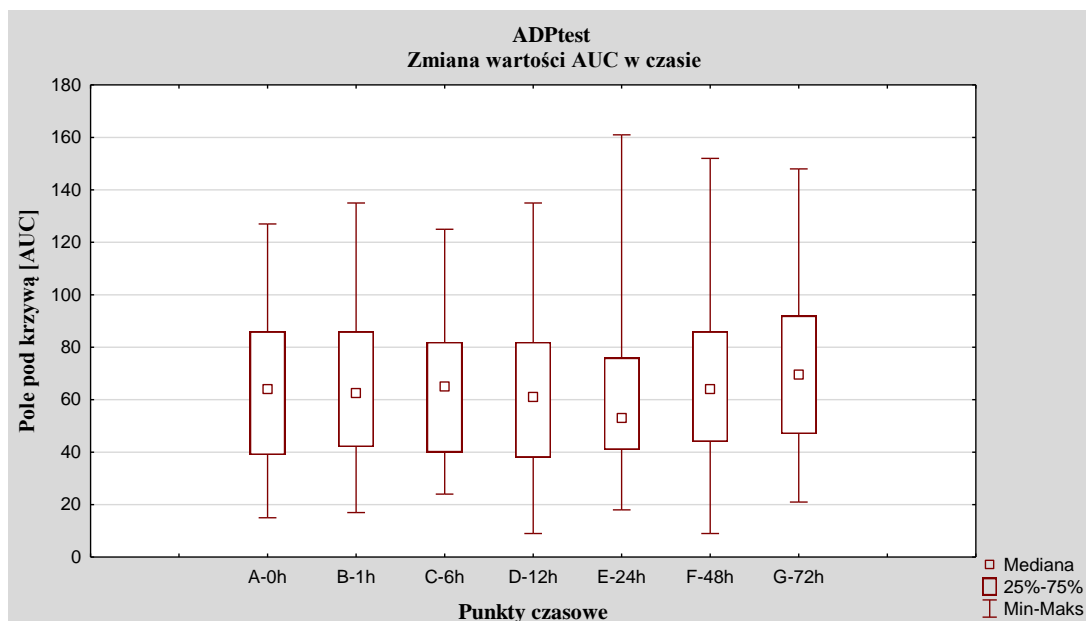
## 4.2 Funkcje płytek krwi

### 4.2.1 Agregometria impedancyjna

#### 4.2.1.1 ADPtest

Zmiany wartości AUC w czasie w teście z wykorzystaniem ADP prezentuje Rycina 17. Analiza uzyskanych wyników wykazała istotny spadek wartości AUC w punkcie czasowym 24h w odniesieniu do wartości wyjściowej (0h vs. 24h: 64,00 [39,00-86,00] vs. 53,00 [41,00-76,00], p= 0,042). Natomiast dobę po zakończeniu dożylnego wlewu lewosimendanu wartość AUC wzrosła (24h vs. 48h: 53,00 [41,00-76,00] vs. 64,00 [44,00-86,00], p= 0,006) osiągając poziom obserwowany przed rozpoczęciem leczenia lewosimendanem.

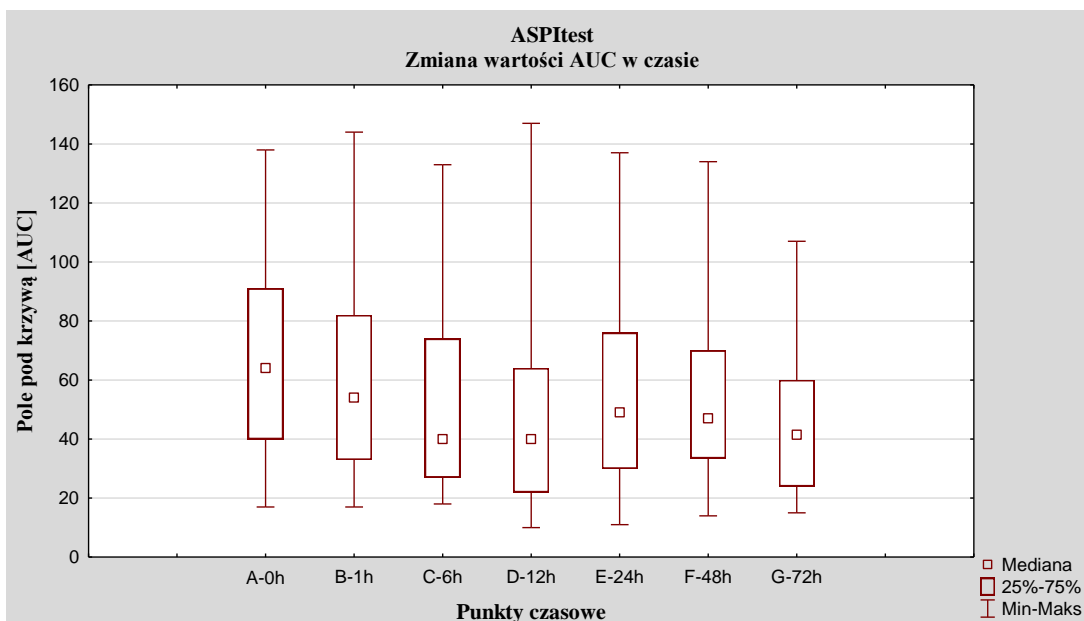




**Ryc. 17.** Zmiana wartości AUC w teście z wykorzystaniem ADP.

#### 4.2.1.2 ASPItest

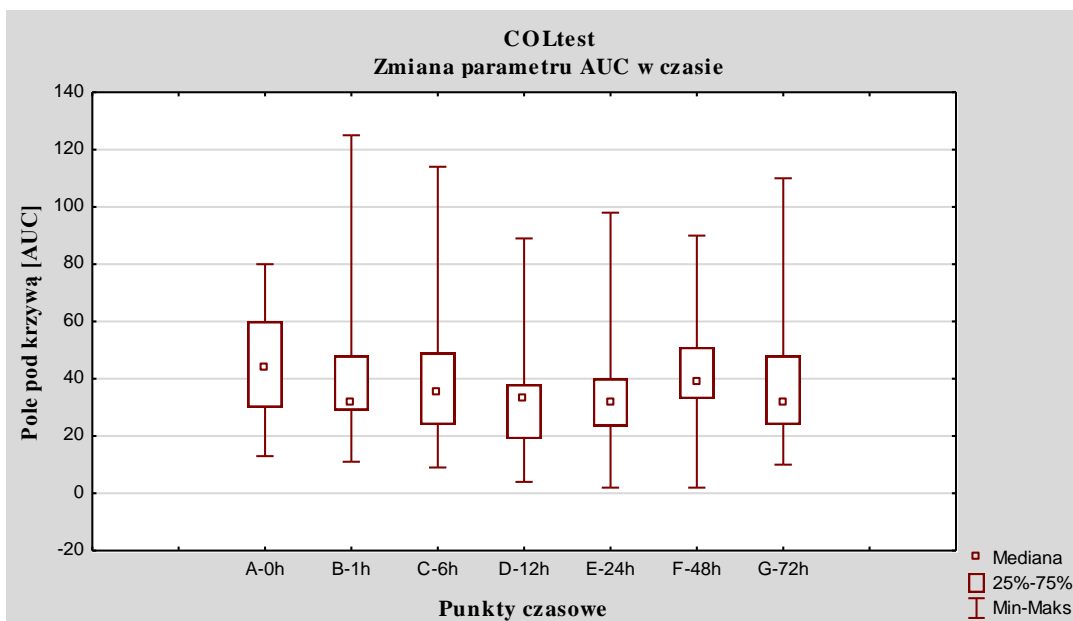
Wyniki kolejnego testu, w którym jako czynnik aktywacyjny wykorzystano kwas arachidonowy przedstawiono na Rycinie 18. W uzyskanych wynikach stwierdzono istotny spadek wartości AUC w badanej grupie w trakcie leczenia. Istotną statystycznie zmianę odnotowano już w 6-godzinie leczenia (0h vs. 6h: 64,00 [40,00-91,00] vs. 40,00 [27,00-74,00],  $p=0,003$ ). Największy spadek agregacji odnotowano po 12-godzinach od rozpoczęcia wlewu leku (0h vs. 12h: 64,00 [40,00-91,00] vs. 40,00 [22,00-64,00],  $p=0,001$ ). Istotną redukcję stopnia agregacji płytek krwi w odniesieniu do wartości z punktu czasowego przed leczeniem zaobserwowano także dobę po zakończeniu leczenia (0h vs. 48h: 64,00 [40,00-91,00] vs. 47,00 [33,50-70,00],  $p=0,016$ ) oraz dwie doby po zaprzestaniu dożylniej infuzji lewosimendanu (0h vs. 72h: 64,00 [40,00-91,00] vs. 41,50 [24,00-60,00],  $p=0,043$ ).



**Ryc. 18.** Zmiana wartości AUC w teście z wykorzystaniem kwasu arachidonowego.

#### 4.2.1.3 COLtest

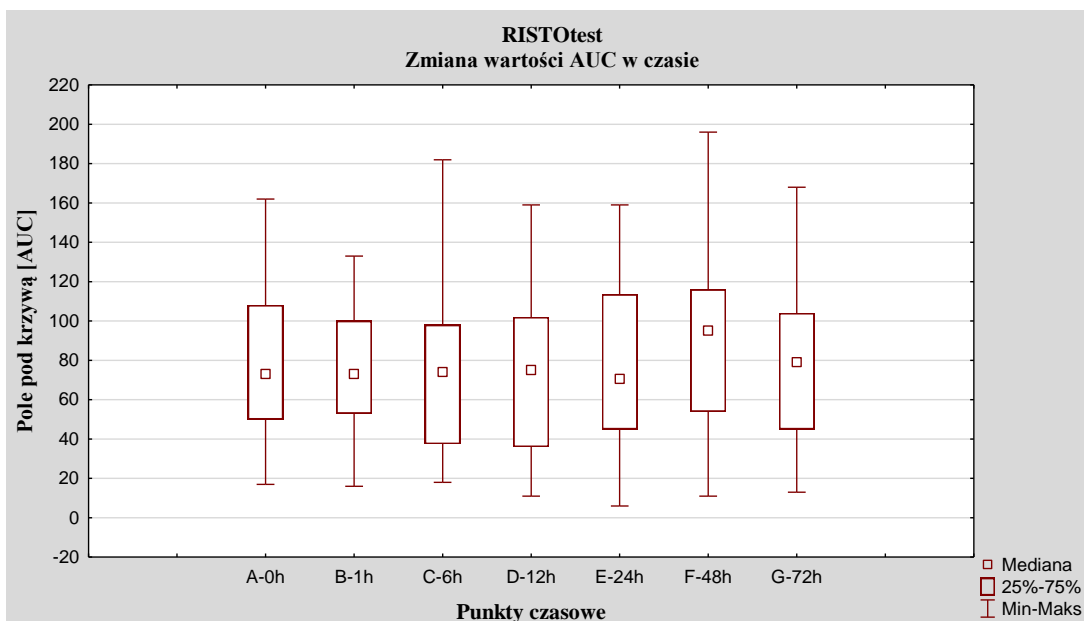
Wyniki testu z wykorzystaniem kolagenu przedstawiano na Rycinie 19. Istotny statystycznie spadek wartości AUC odnotowano już w 12-godzinie trwania leczenia (0h vs. 12h: 44,00 [30,00-60,00] vs. 33,00 [19,00-38,00],  $p=0,001$ ). Największy spadek agregacji płytek krwi zaobserwowano w 24-godzinie wlewu lewosimendanu (0h vs. 24h: 44,00 [30,00-60,00] vs. 31,50 [23,50-40,00],  $p=0,011$ ). Natomiast dobę po zakończeniu 24-godzinnego wlewu leku odnotowano istotny wzrost wartości AUC w odniesieniu do poziomu z punktu czasowego 24h, który odpowiada momentowi zakończenia leczenia (24h vs. 48h: 31,50 [23,50-40,00] vs 39,00 [33,00-51,00],  $p=0,022$ ).



**Ryc. 19.** Zmiana wartości AUC w teście COL.

#### 4.2.1.4 RISTOtest

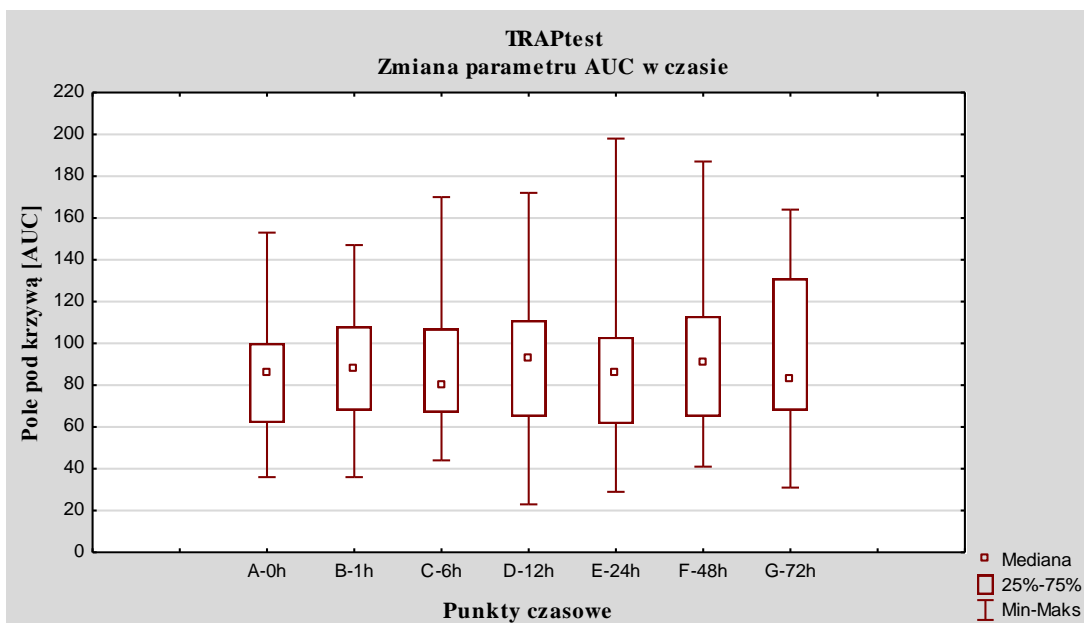
Rycina 20 przedstawia zmiany AUC w teście z ristocetyną. Podczas 24-godzinnego wlewu lewosimendanu wartość AUC utrzymywała się na porównywalnym poziomie do wartości odnotowanej przed rozpoczęciem leczenia. Dobę po zakończeniu leczenia stwierdzono wzrost AUC (0h vs. 48h: 73,00 [50,00-108,00] vs. 95,00 [54,00-116,00] nie wykazano jednak istotnych statystycznie różnic ( $p= 0,711$ ) pomiędzy analizowanymi zmiennymi.



Ryc. 20. Zmiana wartości AUC w teście z ristocetyną.

#### 4.2.1.5 TRAPtest

Wyniki testu TRAP wykorzystanego do oceny funkcji płytek krwi aktywowanych peptydem aktywującym receptor trombinowy-6 przedstawia Rycina 21. Najbardziej wyraźną zmianę mediany wartości AUC stwierdzono w 12-godzinie wlewu lewosimendanu (0h vs. 12h: 86,00 [62,00-100,00] vs. 93,00 [65,00-111,00], jednak podobnie jak w teście z ristocetyną nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy analizowanymi zmiennymi ( $p=0,969$ ).

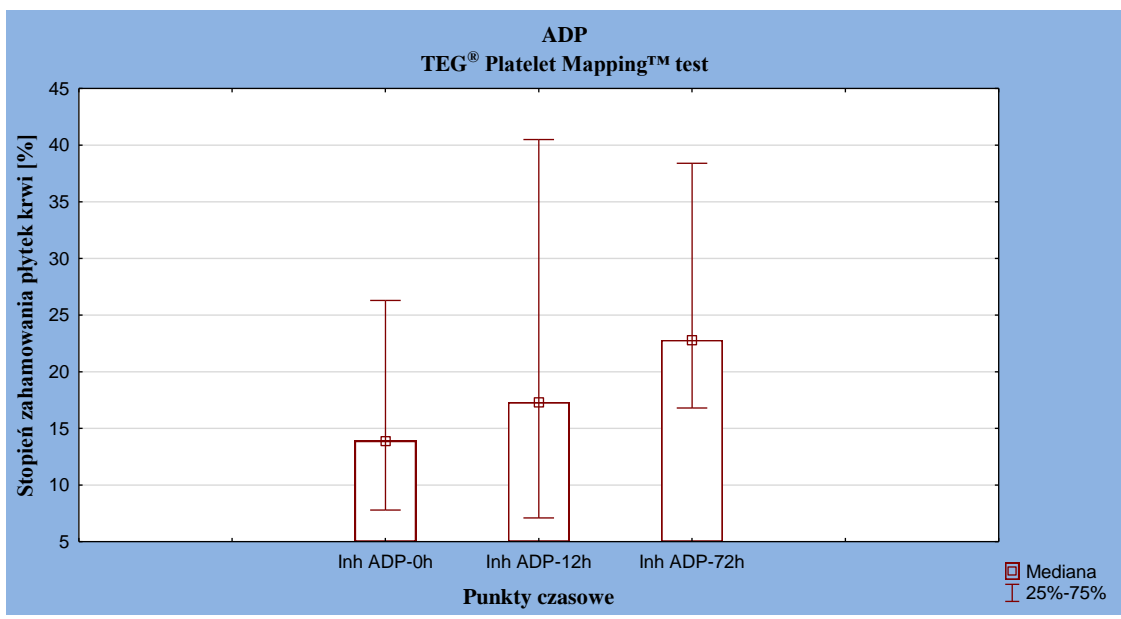


**Ryc. 21.** Zmiana wartości AUC w teście z wykorzystaniem TRAP.

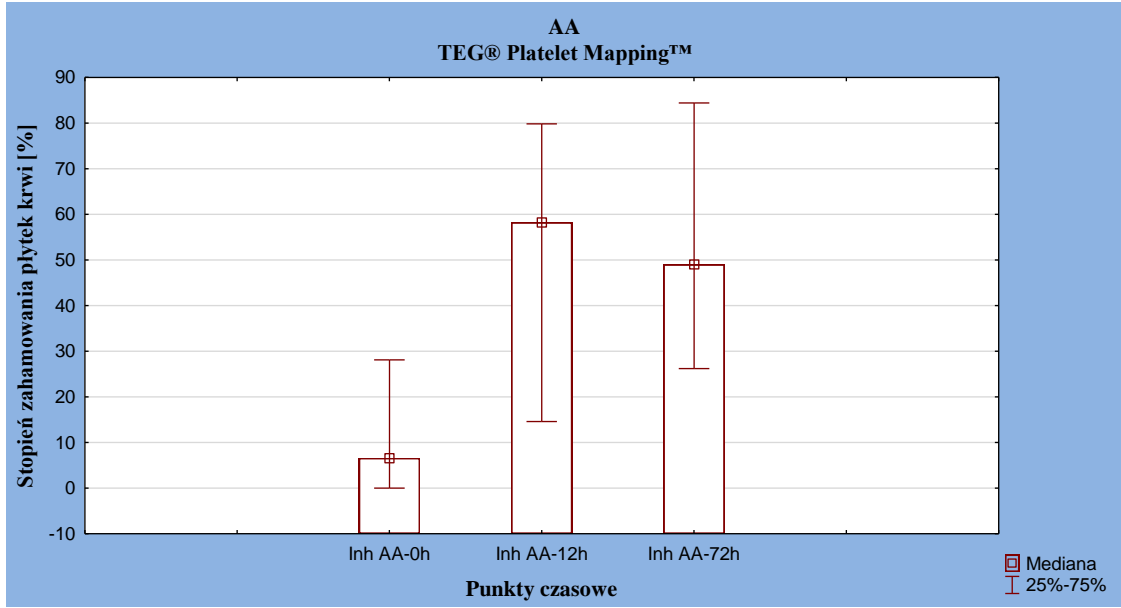
#### 4.2.2 Tromboelastografia

Wyniki przedstawione na Rycinie 22 dotyczą zmiany stopnia zahamowania funkcji płytek krwi ocenianych za pośrednictwem tromboelastografu. Analiza wyników testu z agonistą płytkowym ADP (Rycina 22A) nie wykazała istotnych statystycznie zmian stopnia inhibicji płytek krwi ( $p= 0,808$ ). Można jednak zaobserwować stopniowy wzrost zahamowania funkcji płytek krwi w trakcie badania (0h vs. 12h vs 72h: 13,90 [7,80-26,30] vs. 17,30 [7,10-40,50] vs. 22,80 [16,80-38,40]).

Wyniki testu, w którym oceniano funkcję płytek krwi aktywowane kwasem arachidonowym przedstawia Rycina 22B. Odnotowano statystycznie istotny wzrost stopnia zahamowania płytek krwi w trakcie leczenia (0h vs. 12h: 6,60 [0,00-28,10] vs. 58,20 [14,60-79,80],  $p= 0,0006$ ) oraz dwie doby po zaprzestaniu dożylnego wlewu lewosimendanu (0h vs. 72h; 6,60 [0,00-28,10] vs. 49,00 [26,20-84,40],  $p= 0,013$ ).



**A.**



**B.**

**Ryc. 22.** Zmiana stopnia zahamowania płytek krwi w formowaniu skrzepu w czasie. **A.** Test z wykorzystaniem ADP; **B.** Test z wykorzystaniem AA.

### 4.3 Badanie układu hemostazy

#### 4.3.1 T-TAS system

Tabela 14 przedstawia zestawienie uzyskanych wyników formowania skrzepliny w warunkach przepływu w grupie badanej. Analiza uzyskanych wyników nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi parametrami w analizowanych punktach czasowych. Zaobserwować można natomiast wzrost mediany parametru  $T_{10}$  (0h vs. 12h: 7,9 [6,6-11,4] vs. 10,3 [7,7-13,5]) oraz OT (0h vs. 12h: 9,5 [8,0-14,3] vs. 13,2 [9,8-18,0]) w trakcie leczenia lewosimendanem.

**Tabela 14.** Zmiana wartości parametrów systemu T-TAS w czasie.

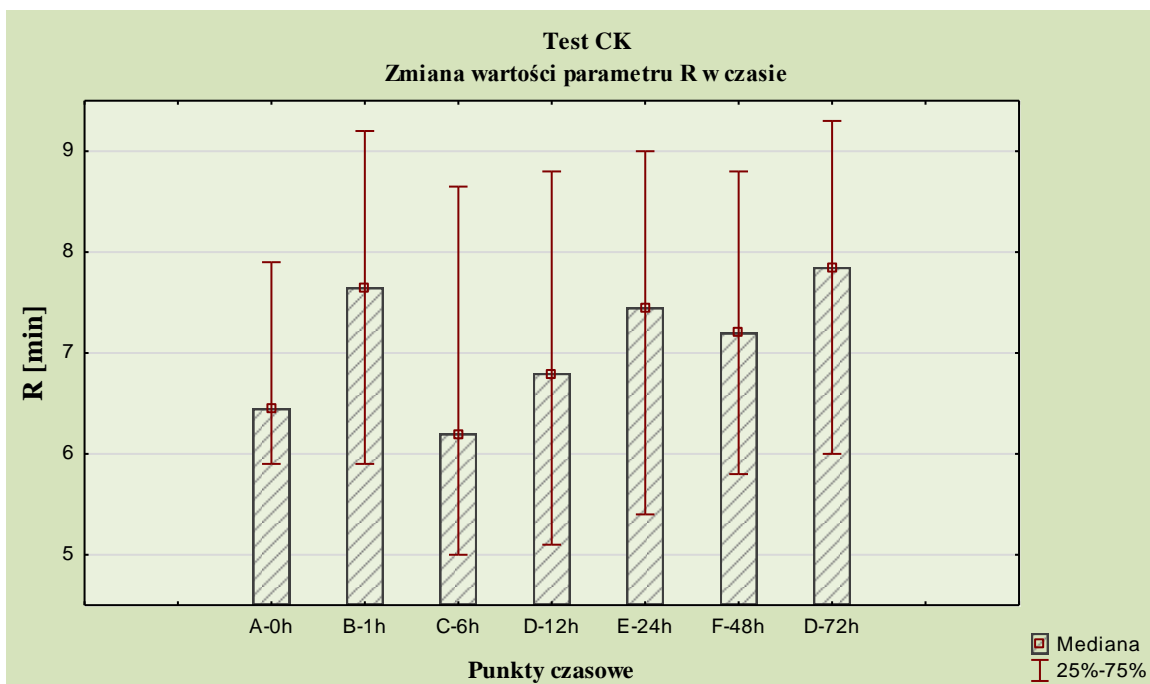
	$T_{10}$	$AUC_{30}$	OT
0h	7,9 [6,6-11,4]	1497,4 [776,0-1709,2]	9,5 [8,0-14,3]
12h	10,3 [7,7-13,5]	1455,8 [1109,9-1690,8]	13,2 [9,8-18,0]
72h	8,3 [7,2-11,5]	1577,4 [1325,4-1755,3]	12,3 [8,8-15,7]
p	<u>0,417</u>	<u>0,606</u>	<u>0,651</u>

Dane przedstawiono jako medianę [rozstęp międzykwartyłowy: Q1-Q3]

#### 4.3.2 Tromboelastografia

##### 4.3.2.1 CK-R

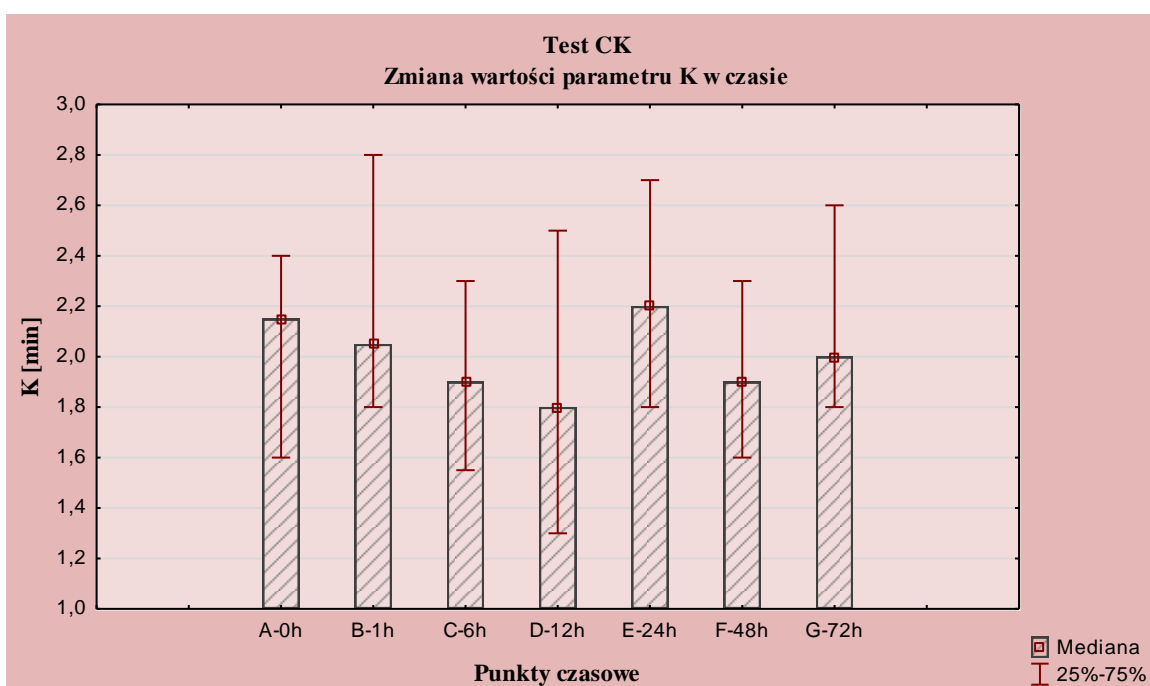
Rycina 23 przedstawia zmiany wartości parametru R w czasie badania. Analiza uzyskanych wyników wykazała wzrost mediany wartości R w trakcie leczenia lewosimendanem jak i w punktach czasowych po zakończeniu leczenia, gdzie w punkcie czasowym 72h odnotowano najwyższy wzrost w odniesieniu do wartości wyjściowej (0h vs. 72h: 6,45 [5,90-7,90] vs. 7,85 [6,00-9,30],  $p=0,029$ ). Jedynie w punkcie czasowym 6h stwierdzono nieistotny statystycznie spadek mediany wartości parametru R (0h vs. 6h: 6,45 [5,90-7,90] vs. 6,20 [5,00-8,65]).



**Ryc. 23.** Zmiany wartości parametru R w czasie badania.

#### 4.3.2.2 CK-K

Zestawienie zmian wartości parametru K w poszczególnych punktach czasowych przedstawia Rycina 24. Zaobserwowano jedynie nieznaczne zmiany w medianie wartości K w trakcie badania, które nie były znaczące statystycznie ( $p=0,399$ ).

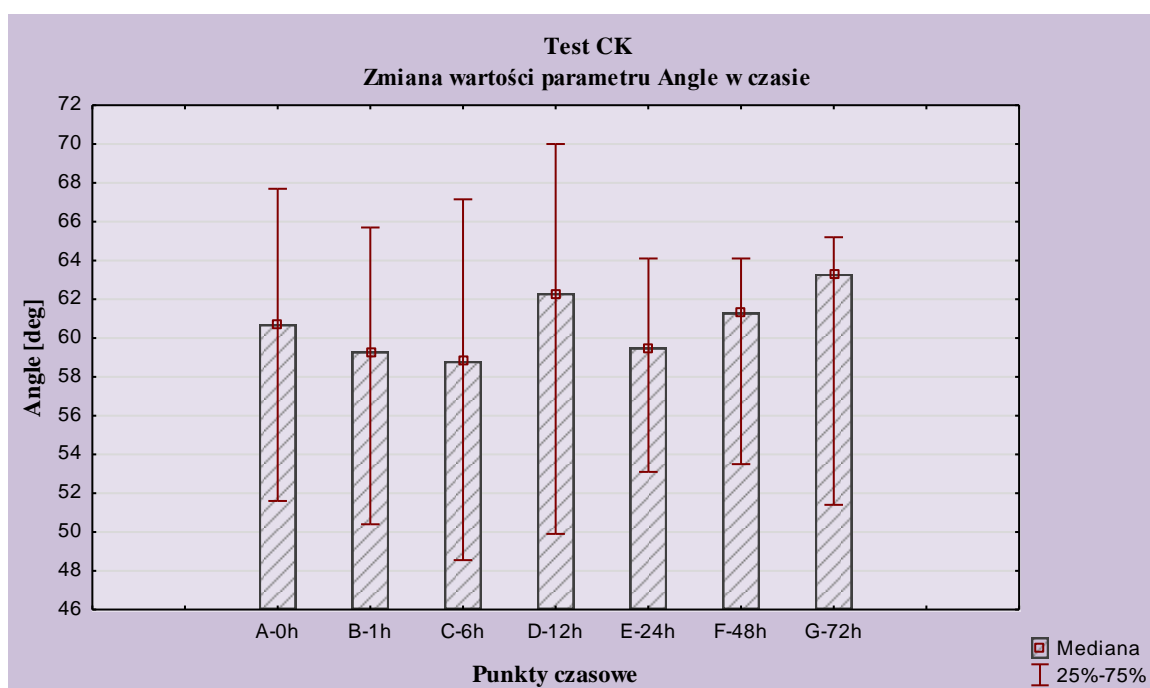




**Ryc. 24.** Zmiany wartości parametru K w czasie badania.

#### 4.3.2.3 CK-Angel

Przedstawione na Rycinie 25 wyniki dotyczą zmiany wartości parametru Angle. Podobnie jak w przypadku poprzedniego parametru (K) nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ( $p= 0,689$ ) pomiędzy wartościami analizowanych zmiennych w badanych punktach czasowych. Mediany uzyskanych wyników charakteryzowały się zbliżoną wartością na wszystkich etapach badania, zarówno w trakcie leczenia (0h vs. 12h vs. 24h: 60,70 [51,60-67,70] vs. 62,30 [49,90-70,00] vs. 59,50 [53,10-64,10]) jak i w kolejnych dobach po zakończeniu terapii (0h vs. 48h vs. 72h: 60,70 [51,60-67,70] vs. 61,30 [53,50-64,10] vs. 63,30 [51,40-65,20]).

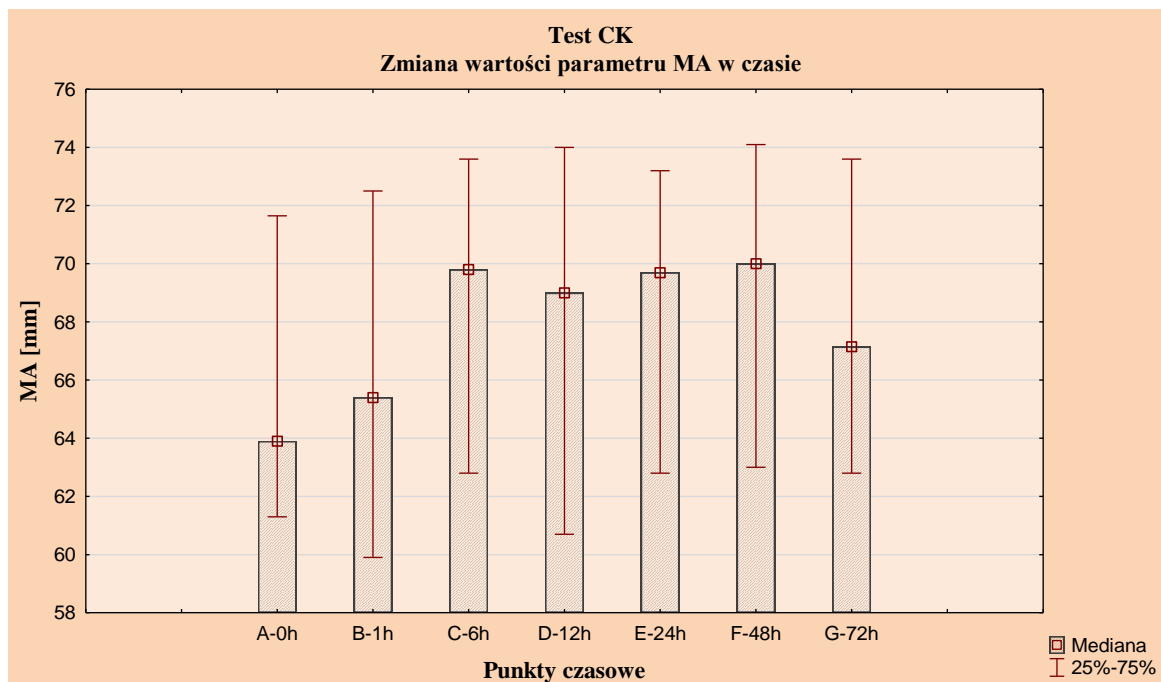


**Ryc. 25.** Zmiany wartości parametru Angle w czasie badania.

#### 4.3.2.4 CK-MA

Zmiany wartości parametru MA w czasie przedstawiono na Rycinie 26. Zaobserwowano wzrost wartości MA w trakcie leczenia, gdzie najwyższą różnicę w odniesieniu do wartości początkowej odnotowano w szóstej godzinie wlewu lewosimendanu

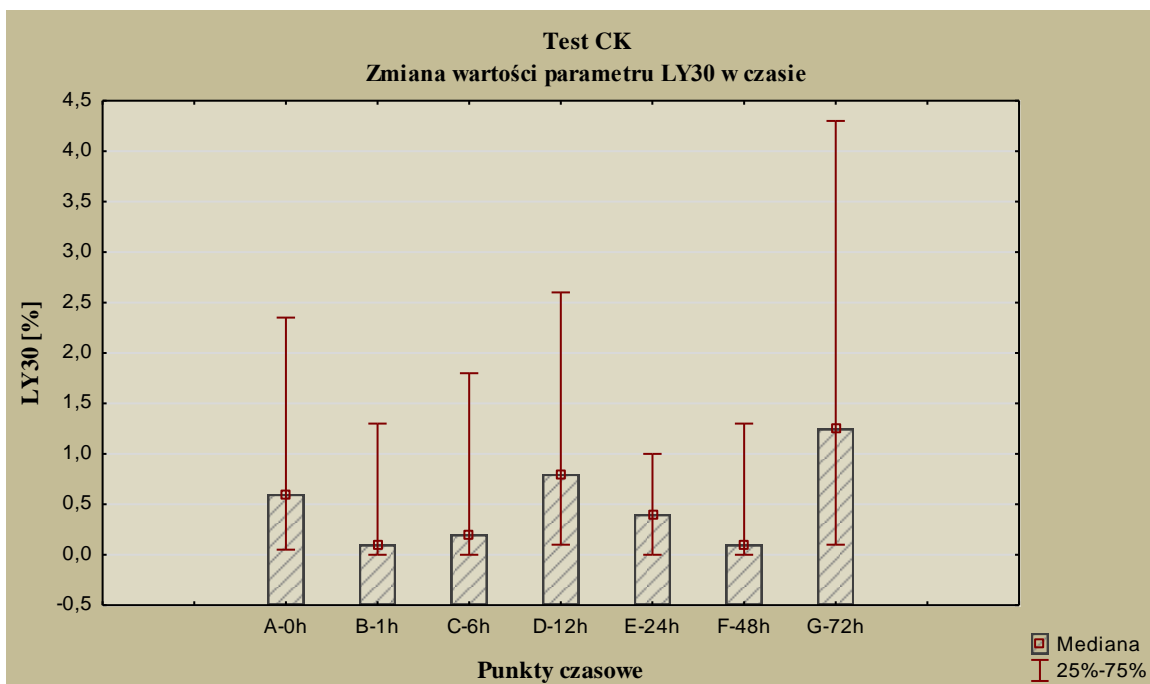
(0h vs. 6h: 63,90 [61,30-71,65] vs. 69,80 [62,80-73,60]) uzyskana różnica nie była jednak znamienna statystycznie ( $p= 0,081$ ). Podwyższone wartości parametru MA względem punktu wyjściowego utrzymywały się również po zakończeniu leczenia (0h vs. 48h: 63,90 [61,30-71,65] vs. 70,00 [63,00-74,10]) jednak obserwowane różnice nie były istotne statystycznie ( $p= 0,301$ ).



**Ryc. 26.** Zmiany wartości parametru MA w czasie badania.

#### 4.3.2.4 CK-LY30

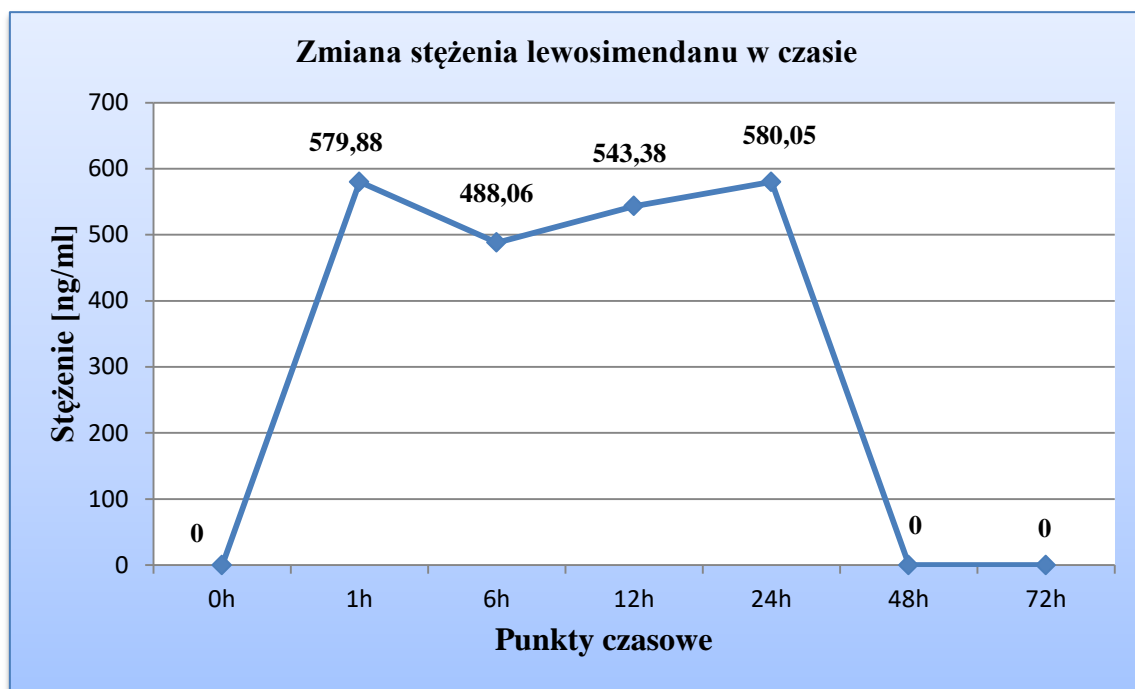
Na Rycinie 27 przedstawiono zestawienie uzyskanych wyników parametru LY30. Nie odnotowano istotnych statystycznie zmian w stopniu lizy skrzepy, opisywanej przez parametr LY30 w trakcie leczenia lewosimendanem jak i w kolejnych dobach po zakończeniu wlewu ( $p= 0,212$ ).



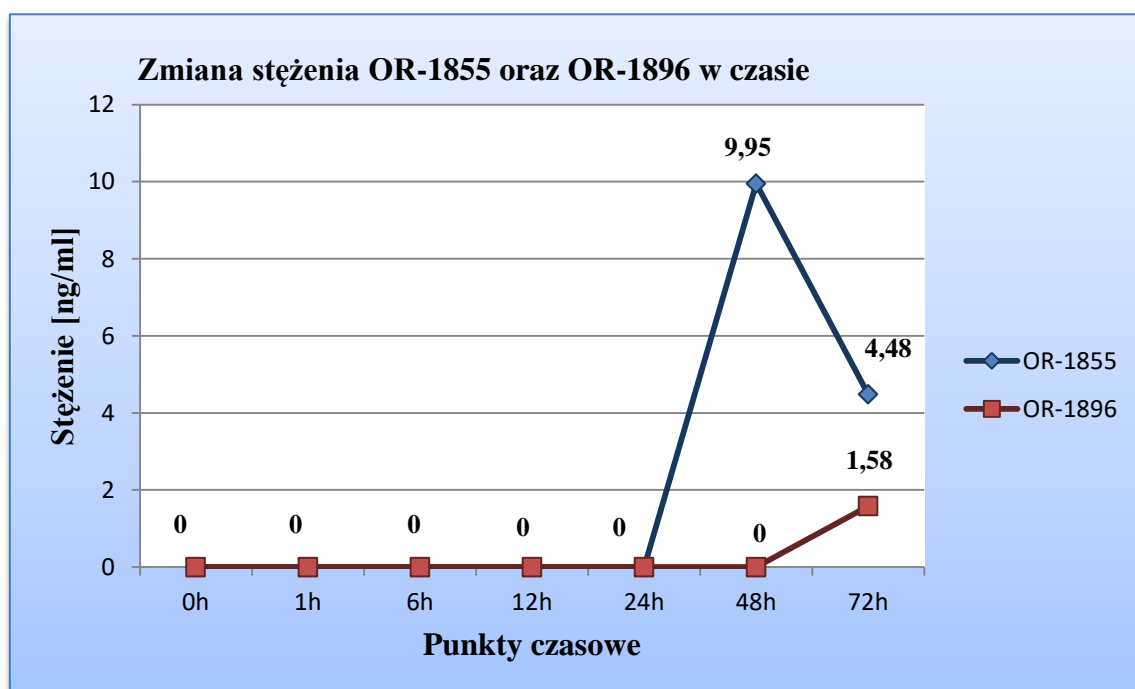
**Ryc. 27.** Zmiany wartości parametru LY30 w czasie badania.

#### 4.4 Farmakokinetyka

Rycina 28 A przedstawia zmiany stężenia lewosimendanu w czasie badania. Pomędzy pierwszą godziną wlewu a 24-godziną lewosimendan osiągnął maksymalne stężenia w organizmie. Następnie przez kolejne doby poziom lewosimendanu spadał, a wykrywalne stały się jego aktywne metabolity (Rycina 28 B).



A.



B.

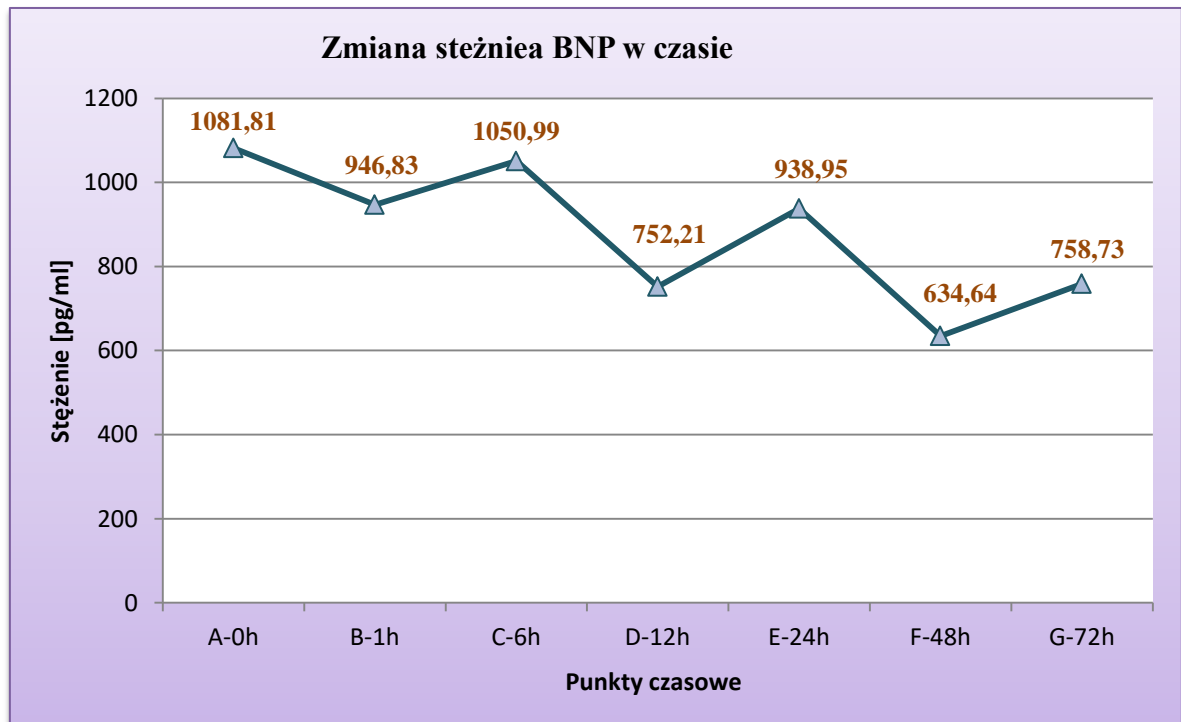
**Ryc. 28.** Zmiana stężenia lewosimendanu oraz jego aktywnych metabolitów w czasie badania. **A.** Lewosimendan; **B.** OR-1855 oraz OR-1896.

## 4.5 Parametry laboratoryjne- biomarkery sercowo-naczyniowe

### 4.5.1 BNP

Rycina 29 przedstawia zmiany stężenia BNP w czasie trwania badania. Zaobserwowano statystycznie istotne zmiany ( $p=0,0004$ ) pomiędzy wartościami uzyskanych stężeń BNP w kolejnych punktach czasowych. Analizując wartości stężenia BNP w trakcie badania, w odniesieniu do punktu wyjściowego przed rozpoczęciem leczeniem, odnotowano w każdym punkcie czasowym redukcję stężenia BNP. Statystycznie istotny spadek stężenia odnotowano już w 6-godzinie trwania leczenia (0h vs. 6h: 1081,81 [549,15-1703,09] vs. 1050,99 [627,49-1456,31],  $p=0,031$ ). Najwyższy spadek stężenia BNP w trakcie wlewu lewosimendanu zaobserwowano w 12-godzinie (0h vs. 12h: 1081,81 [549,15-1703,09] vs. 752,21 [580,36-1004,33],  $p=0,017$ ). Istotną redukcję stężenia BNP wykazano również w pierwszej (0h vs. 48h: 1081,81 [549,15-1703,09] vs. 634,64 [321,75-890,24],  $p=0,001$ ) oraz drugiej (0h vs. 72h: 1081,81 [549,15-1703,09] vs. 758,73 [433,60-1185,40],  $p=0,001$ ) dobie po zakończeniu leczenia.

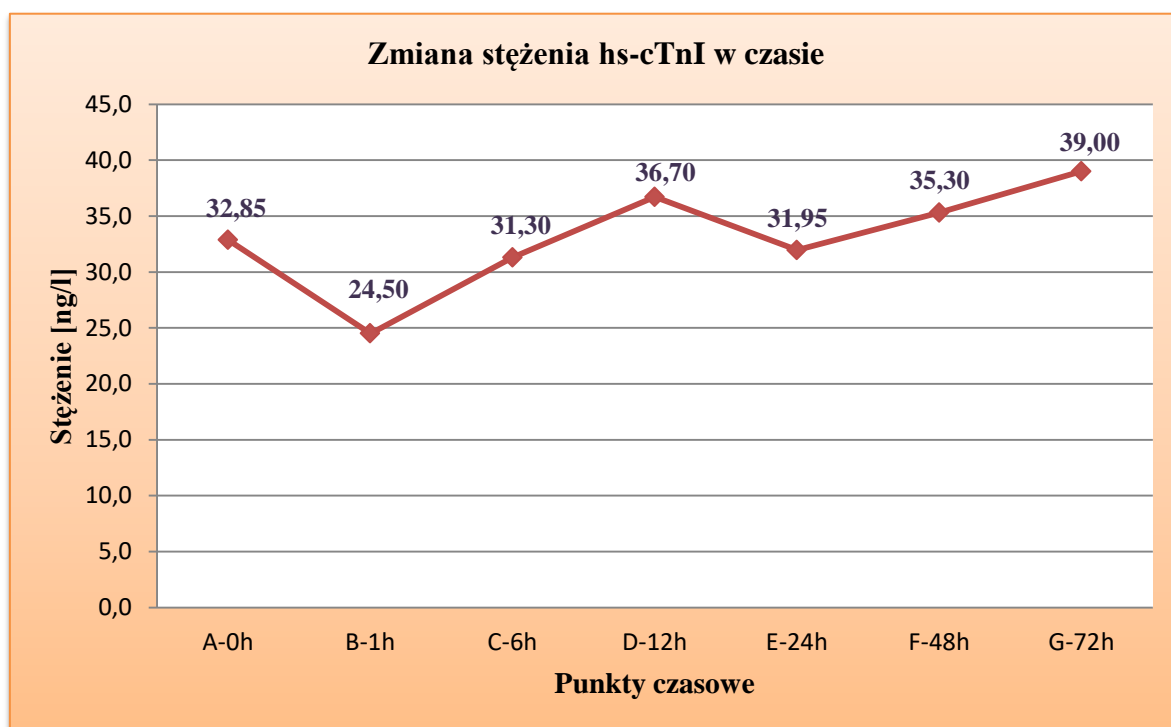
Wykonana dodatkowa analiza korelacji porządku rang Spearmana nie wykazała istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem BNP w osoczu, a stężeniem lewosimendanu oraz jego aktywnymi metabolitami (OR-1855, OR-1896).



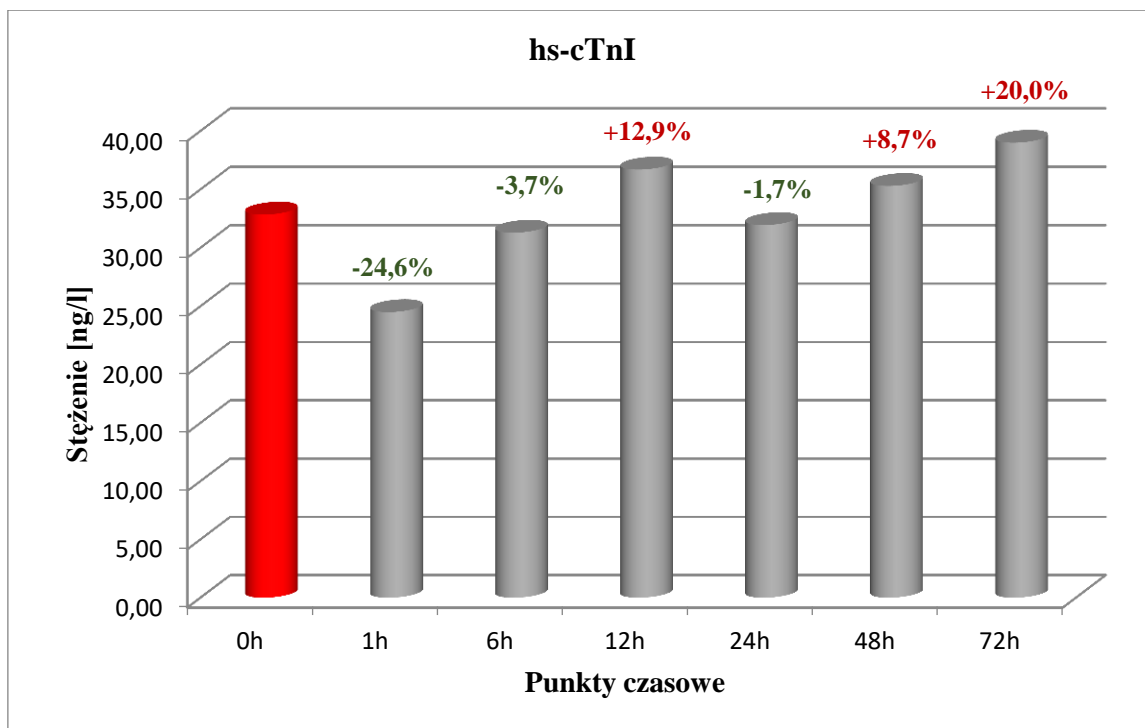
**Ryc. 29.** Zmiana stężenia BNP w czasie trwania badania.

#### 4.5.2 hs-cTnI

Przedstawione na Rycinie 30 dane prezentują dynamikę zmian stężenia hs-cTnI w czasie badania. Z kolei Rycina 31 prezentuje procentowe zmiany stężenia hs-cTnI w odniesieniu do punktu początkowego. Analizowane dane wskazują, że najwyższy spadek stężenia wynoszący 24,6% odnotowano w pierwszej godzinie leczenia lewosimendanem, natomiast najwyższy 20,0% wzrost stwierdzono dwie doby po zakończeniu leczenia. Zmiany te nie wykazały jednak istotności statystycznej ( $p= 0,633$ ).



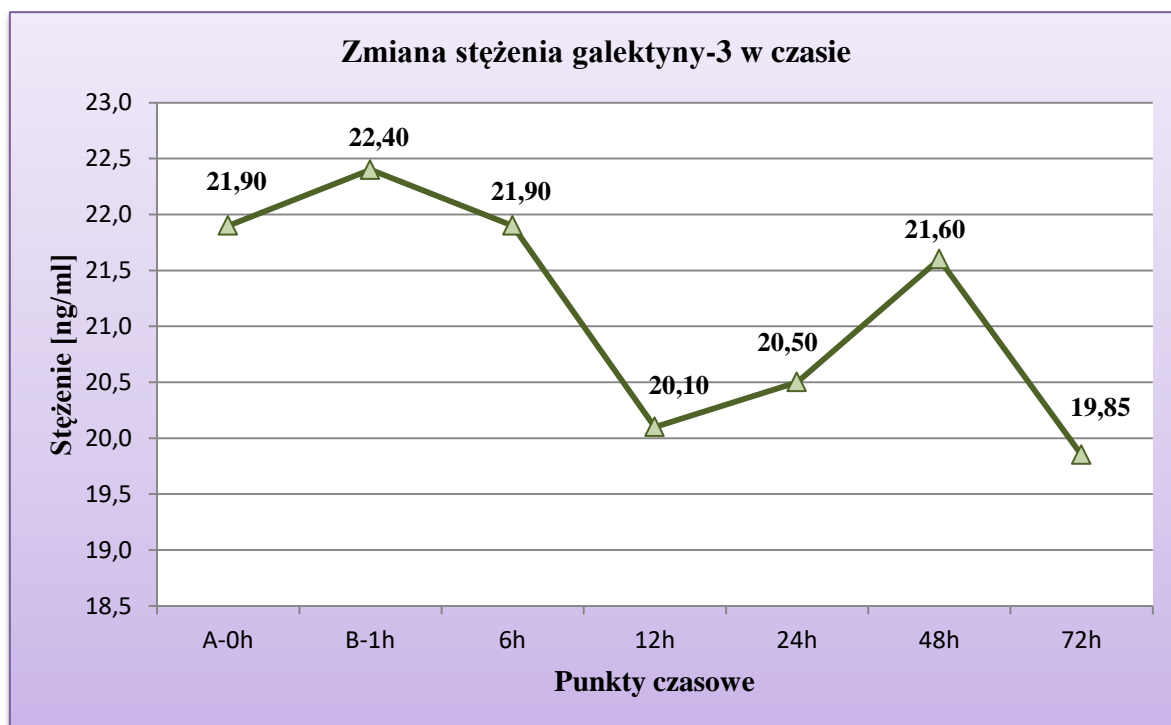
**Ryc. 30.** Zmiana stężenia hs-cTnI w czasie trwania badania.



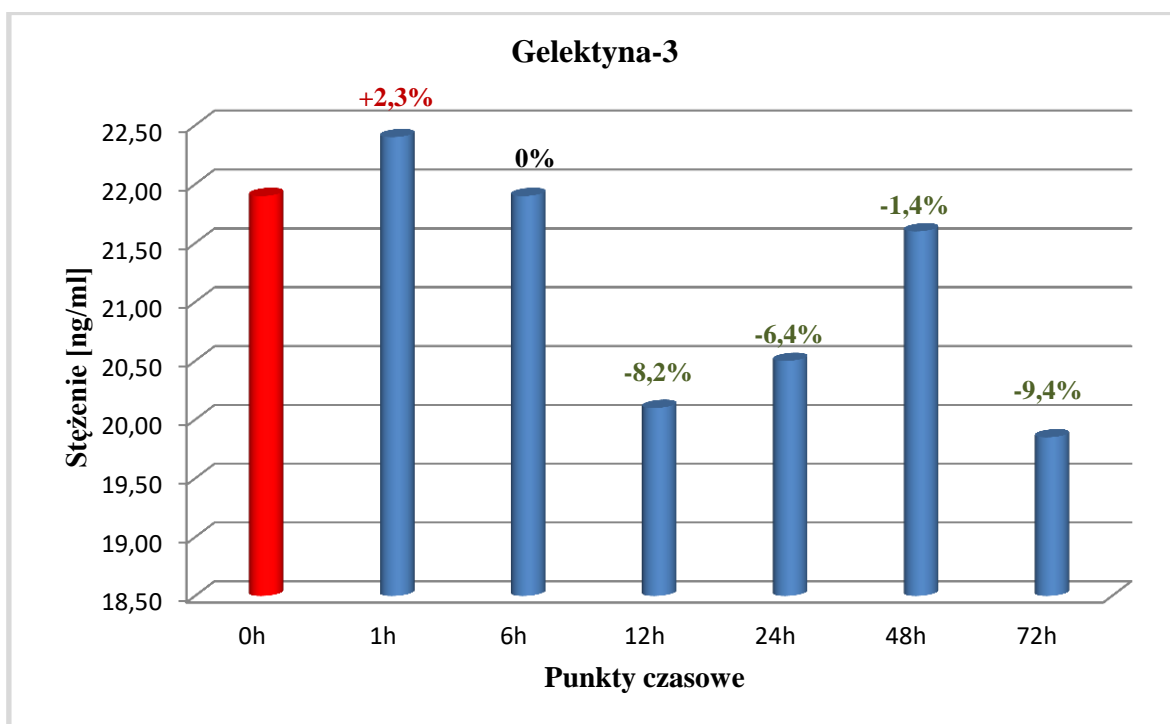
**Ryc. 31.** Różnice procentowe w medianach stężeń hs-cTnI w odniesieniu do punktu wyjściowego.

#### 4.5.3 Galektyna-3

Rycina 32 przedstawia zmiany stężenia galektyny-3 w czasie trwania badania. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w stężeniu tego biomarkera zarówno w trakcie leczenia lewosimendanem jak i w pierwszej i drugiej dobie po zakończeniu leczenia ( $p=0,155$ ). Przedstawione na Rycinie 33 różnice procentowe względem punktu wyjściowego wskazują, że najwyższy spadek stężenia galektyny-3 wystąpił w 12-godzinie (8,2%) oraz w drugiej dobie po zakończeniu leczenia (9,4%).



Ryc. 32. Zmiana stężenie galektyny-3 w czasie.



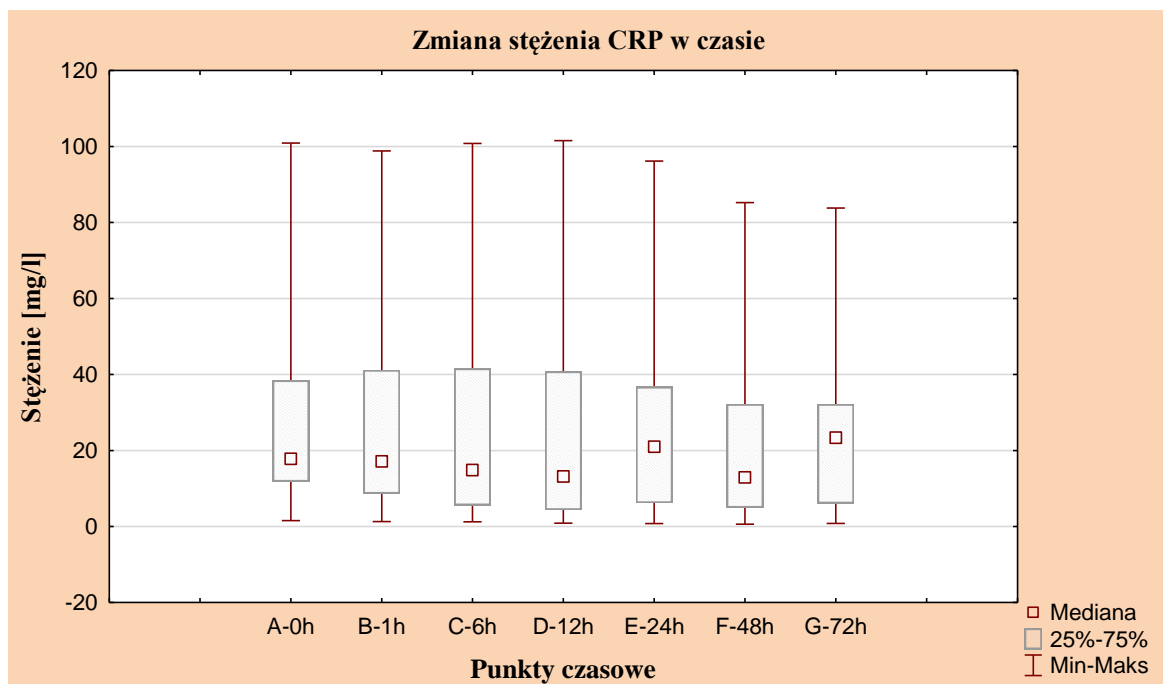
Ryc. 33. Różnice procentowe w medianach stężeń galektyny-3 względem punktu wyjściowego.



## 4.6 Pozostałe parametry laboratoryjne

### 4.6.1 CRP

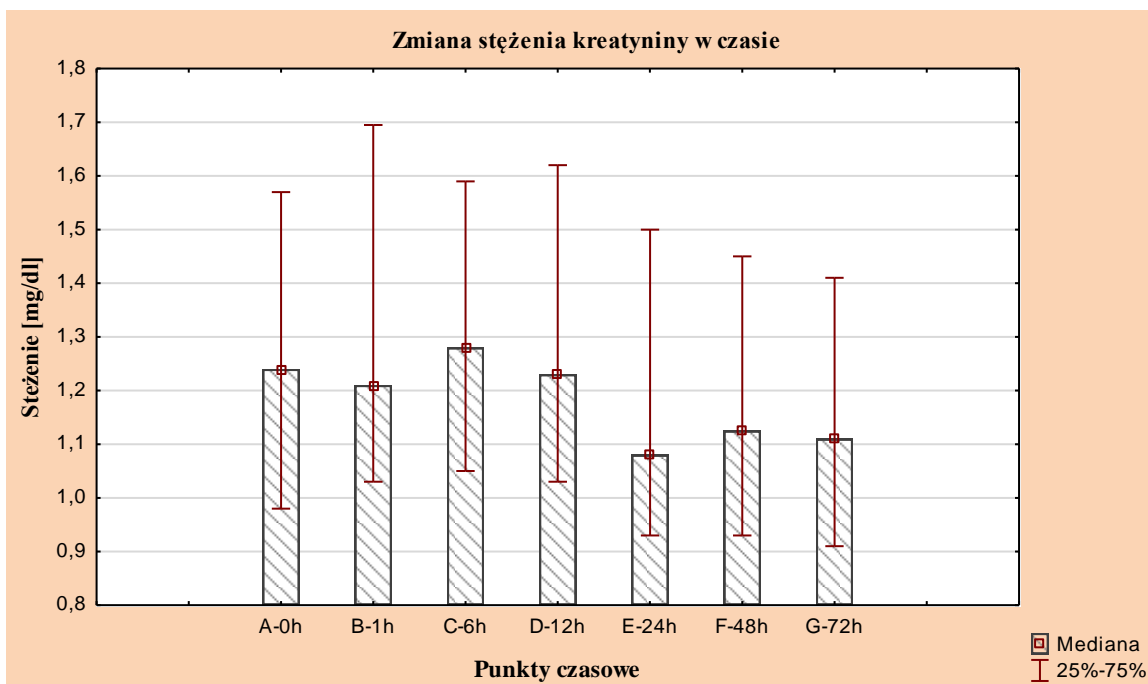
Zmiany stężeń CRP w trakcie trwania badania przedstawiono na Rycinie 34. Analiza grupy badanej wykazała istotne statystycznie zmiany stężenia tego biomarkera w osoczu w trakcie leczenia lewosimendanem ( $p=0,044$ ). Już w pierwszej oraz 6-godzinie leczenia stwierdzono statystycznie istotny spadek stężenia CRP (0h vs. 1h: 17,81 [11,84-38,44] vs. 17,06 [8,68-41,15],  $p=0,001$ ; 0h vs. 6h: 17,81 [11,84-38,44] vs. 14,86 [5,61-41,56],  $p=0,031$ ). Następnie w 12-godzinie wlewu leku odnotowano wyraźny spadek stężenia CRP (0h vs 12h: 17,81 [11,84-38,44] vs. 13,13 [4,38-40,79],  $p=0,073$ ).



Ryc. 34. Zmiany stężenia CRP w czasie trwania badania.

### 4.6.2 Kreatynina

Rycina 32 przedstawia zmiany stężenia kreatyniny w czasie trwania badania. Uzyskane wyniki wskazują na istotny statystycznie spadek stężenia kreatyniny w osoczu w 24-godzinie leczenia w odniesieniu do 6-godziny dożylnego wlewu lewosimendanu (6h vs. 24h: 1,28 [1,05-1,59] vs. 1,08 [0,93-1,5],  $p=0,026$ ) oraz w 48-godzinie (6h vs. 48h: 1,28 [1,05-1,59] vs. 1,12 [0,93-1,45],  $p=0,014$ ).



Ryc. 35. Zmiany stężenia kreatyniny w czasie trwania badania.

#### 4.7 Ocena zależności pomiędzy testami aktywności funkcji płytek a stężeniem biomarkerów sercowo-naczyniowych

Tabela 15 przedstawia zależności pomiędzy stężeniem galektyny-3, a funkcją płytek krwi ocenianą agregometrem impedancyjnym. Stwierdzono istotną statystycznie umiarkowaną, ujemną zależność pomiędzy stężeniem galektyny-3 a testem ADPtest (0h:  $R = -0,48$ ,  $p = 0,035$ ; 72h:  $R = -0,59$ ,  $p = 0,016$ ), RISTOtest (0h:  $R = -0,49$ ,  $p = 0,036$ ; 72h:  $R = -0,70$ ,  $p = 0,002$ ) oraz TRAPtest (0h:  $R = -0,61$ ,  $p = 0,005$ ; 72h:  $R = -0,60$ ,  $p = 0,013$ ) w obu analizowanych punktach czasowych.

Tabela 15. Korelacja stężenia galektyny-3 oraz testów funkcji płytek krwi w pierwszym i ostatnim punkcie czasowym.

	Galektyna-3_0h R	Galektyna-3_72h R	<i>p</i>
ADPtest- 0h	-0,48	-	0,035
ADP test- 72h	-	-0,59	0,016

ASPItest- 0h	-0,38	-	0,108
ASPItest- 72h	-	-0,10	0,708
COLtest- 0h	-0,41	-	0,078
COLtest- 72h	-	-0,12	0,668
RISTOtest- 0h	<b>-0,49</b>	-	<b>0,036</b>
RISTOtest- 72h	-	<b>-0,70</b>	<b>0,002</b>
TRAPtest- 0h	<b>-0,61</b>	-	<b>0,005</b>
TRAPtest- 72h	-	<b>-0,60</b>	<b>0,013</b>

R- współczynnik korelacji;

Korelację pomiędzy stężeniem BNP, a testami funkcji płytek wśród badanych pacjentów ilustruje Tabela 16. Istotną statystycznie umiarkowaną, ujemną zależność stwierdzono pomiędzy stężeniem BNP, a testem ADPtest w punkcie czasowym 72h (72h: R= -0,50, p=0,046). Natomiast w przypadku testów: ASPItest (0h: R= -0,58, p=0,009) oraz RISTOtest (0h: R= -0,60, p=0,008) istotną statystycznie korelację stwierdzono w pierwszym punkcie czasowym.

**Tabela 16.** Korelacja stężenia BNP oraz testów funkcji płytek krwi w pierwszym i ostatnim punkcie czasowym.

	<b>BNP_0h R</b>	<b>BNP_72h R</b>	<b>p</b>
<b>ADPtest- 0h</b>	-0,21	-	0,391
<b>ADP test- 72h</b>	-	<b>-0,50</b>	<b>0,046</b>
<b>ASPItest- 0h</b>	<b>-0,58</b>	-	<b>0,009</b>
<b>ASPItest- 72h</b>	-	-0,18	0,509
<b>COLtest- 0h</b>	-0,45	-	0,050
<b>COLtest- 72h</b>	-	-0,17	0,527
<b>RISTOtest- 0h</b>	<b>-0,60</b>	-	<b>0,008</b>

<b>RISTOtest- 72h</b>	-	-0,40	0,122
<b>TRAPtest- 0h</b>	-0,28	-	0,238
<b>TRAPtest- 72h</b>	-	-0,45	0,082

R- współczynnik korelacji;

Nie zaobserwowano jakichkolwiek istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem hs-cTnI a wynikami testów funkcji płytek krwi w analizowanych punktach czasowych.

## 5. Dyskusja

Lewosimendan został wprowadzony do doraźnej, krótkoterminowej terapii ostrej, niewyrównanej postaci ciężkiej przewlekłej niewydolności serca ponad 20 lat temu a jego skuteczność i bezpieczeństwo zostało udokumentowane dowodami naukowymi i danymi z randomizowanych badań kontrolowanych z udziałem ponad 9000 pacjentów. W ponad 200 badaniach klinicznych oceniono lewosimendan w różnych ustawieniach terapeutycznych, zarówno w okresie okołoperacyjnym, jak i w zaawansowanej niewydolności serca, a wyniki metaanaliz wykazały stałą tendencję w kierunku skuteczności i bezpieczeństwa jego stosowania [90]. Fizjologiczne działanie lewosimendanu jest plejotropowe co stwarza szerokie możliwości jego zastosowania w medycynie. Dotychczasowy stan wiedzy określający wpływ terapii lewosimendanem na hemostazę (głównie funkcje płytek krwi) pochodzi w zdecydowanej większości z badań *in vitro* przeprowadzonych na materiale pochodzącym od zdrowych dawców [91][92][93][94] oraz z badań na modelach zwierzęcych [95][96]. W powyższej pracy dokonano oceny wszystkich składowych hemostazy tj. funkcji płytek krwi, układu krzepnięcia oraz procesu fibrynolizy przy zastosowaniu dostępnych metod rutynowych i eksperymentalnych. Grupę badaną stanowili pacjenci wymagający natychmiastowego zastosowania leczenia inotropowo dodatniego w celu poprawy wydolności serca. Analizowani pacjenci otrzymywali równocześnie standardową terapię przeciwplatekową oraz przeciwkrzepliwą, jeżeli była wymagana. Uzyskane wyniki nie wyjaśniają jednoznacznie wpływu lewosimendanu na układ krzepnięcia, jednak pozwalają zaobserwować zależności, które wymagają dogłębnej analizy. Ponadto, dla celów niniejszej pracy, w grupie badanej oznaczono stężenie biomarkerów sercowo-naczyniowych we wszystkich punktach czasowych badania. Otrzymane wyniki potwierdzają dostępne dane dotyczące wpływu leczenia lewosimendanem na stężenie BNP.

Pierwszy etap badań stanowiących cel pracy obejmował analizę funkcji płytek krwi z wykorzystaniem agregometru impedancyjnego. Ocena stopnia agregacji płytek krwi w teście z ADP wykazała istotny spadek pomiędzy wartością wyjściową, a 24-godzinną wlewu lewosimendanu. Jednak dobę po zakończeniu leczenia odnotowano istotny wzrost w stopniu agregacji płytek krwi, którego wartość odpowiadała wartości wyjściowej agregacji sprzed rozpoczęcia leczenia lewosimendanem.

W kolejnym teście czynnikiem inicjującym agregację płytek krwi był kwas arachidonowy. Analiza wyników w grupie badanej wykazała istotny spadek agregacji w trakcie 24-godzinnej wlewu leku w odniesieniu do punktu wyjściowego. Również w 48-godzinie oraz w 72-godzinie stwierdzono niższy poziom agregacji płytek krwi względem punktu wyjściowego. Z kolei w trzecim teście oceniającym funkcję płytek krwi, w którym czynnikiem aktywującym był kolagen, zaobserwowano istotny spadek agregacji płytek krwi w trakcie wlewu lewosimendanu. Jednakże, po upływie doby od zakończenia leczenia stwierdzono, podobnie jak w przypadku testu z agonistą płytkowym ADP, istotny wzrost agregacji. Dostępne w literaturze badania, w których do oceny funkcji płytek wykorzystano ADP lub kolagen wskazują na wyraźne działanie ograniczające agregację płytek krwi przez lewosimendan. Kaptan i wsp. [91] w badaniu *in vitro* oceniali metodą turbidymetryczną wpływ lewosimendanu na agregację płytek krwi w materiale pobranym od 12 zdrowych ochotników. Funkcje płytek krwi badano w próbkach krwi do których dodano lewosimendan w trzech różnych stężeniach (odpowiednio 10, 25 oraz 45 ng/ml). Stężenie lewosimendanu w poddanych obserwacji próbkach było zbliżone do wartości otrzymywanych w trakcie wlewu dożylnego leku w warunkach klinicznych. Po inkubacji krwi z lekiem oceniano odpowiedź płytek krwi po dodaniu do osocza bogatopłytkowego ADP (5 i 10  $\mu$ M) oraz kolagenu (2 i 5  $\mu$ g/ml). Wykazano znaczące zahamowanie agregacji płytek krwi indukowanej przez ADP oraz kolagen we wszystkich przygotowanych rozcieńczeniach [91]. W innym badaniu *in vitro* Plaschke i wsp. [92] we krwi obwodowej oceniano funkcję płytek krwi uzyskanej od 3 zdrowych dawców. Funkcję płytek krwi oceniano po dodaniu agonistów: ADP (10  $\mu$ mol/l) oraz kolagenu (5  $\mu$ g/ml). Uzyskane w tym badaniu wyniki również wskazują na antyagregacyjne działanie lewosimendanu [92], co potwierdza wyniki niniejszej pracy. Można dodatkowo zaobserwować, że efekt zahamowania agregacji płytek krwi uzyskany przy wysokich dawkach lewosimendanu był bardziej widoczny przy agregacji indukowanej przez ADP niż przy stymulacji kolagenem [22]. Różnica ta jest prawdopodobnie związana z różnymi mechanizmami aktywacji płytek [22][97]. Podobnie Tawfik i wsp. [95] w badaniu przeprowadzonym na modelu zwierzęcym wykazali antyagregacyjne działanie lewosimendanu hamujące agregację płytek krwi indukowaną kolagenem (5  $\mu$ g/ml) [95].

W kolejnych testach oceniających funkcje płytek krwi z wykorzystaniem agregometru, w których czynnikiem aktywacyjnym była ristocetyna oraz peptyd odpowiedzialny za

pobudzenie receptora dla trombiny, nie zaobserwowano istotnych zmian w agregacji płytek krwi w trakcie wlewu leku w grupie badanej oraz w pierwszej i drugiej dobie po zakończeniu leczenia. Pataricza i wsp. [93] badali wpływ lewosimendanu na indukowaną trombiną agregację płytek krwi w materiale pobranym od 19 zdrowych ochotników. Agregację oceniano metodą turbidymetryczną w odpowiedzi na trombinę (0,5 IU/ml do 1 IU/ml) w osoczu bogatopłytkowym zawierającym albuminę oraz (0,1 IU/ml) w osoczu pozbawionym albuminy. Autorzy zauważyli, że niewielka zmiana stężenia albuminy w osoczu modyfikuje hamowanie przez lewosimendan indukowanej trombiną agregacji płytek *in vitro* [93]. W badaniu Ambrus i wsp. [94] również oceniali wpływ lewosimendanu na indukowaną trombiną agregację płytek krwi w modelu *in vitro* w materiale pochodzącym od 14 zdrowych ochotników. Jak wskazują autorzy, inkubacja lewosimendanu (0,06  $\mu\text{mol/l}$ ) z płukanymi płytkami krwi przez 2 minuty zmniejszyła agregację płytek krwi indukowaną trombiną o 67%. Co więcej, wydłużenie czasu inkubacji do 15 min wzmacniało działanie antyagregacyjne lewosimendanu do 84% [22][94]. Przyniesione badania oceniające funkcje płytek krwi w odpowiedzi na trombinę wskazują na antyagregacyjne działanie lewosimendanu, jednak stopień zahamowania płytek krwi może być ściśle powiązany ze stanem klinicznym oraz innymi czynnikami jak na przykład czas trwania wlewu czy stężenie albuminy.

Drugą metodą wykorzystaną do oceny funkcji płytek krwi był test mapowania płytek wykonany za pośrednictwem tromboelastografu. Jest to rzadko wykorzystywana metoda testowania funkcji płytek krwi, która dostarcza wynik wyrażony w postaci odsetka zahamowanych płytek krwi indukowanych jednym z dwóch dostępnych w tej metodzie agonistów: ADP lub kwasem arachidonowym. W przypadku testu mapowania płytek z udziałem ADP nie zaobserwowano istotnych różnic w stopniu zahamowania funkcji płytek krwi pomiędzy analizowanymi punktami czasowymi w grupie badanej. Natomiast w teście z udziałem kwasu arachidonowego procent zahamowania płytek krwi znacznie się zwiększył, zarówno w 12 jak i w 72-godzinie badania, w odniesieniu do wartości wyjściowej przed rozpoczęciem wlewu lewosimendanu. Ze względu na brak reprezentatywnych badań o pokrewnej tematyce, niemożliwe jest zestawienie otrzymanych wyników z innymi pracami.

Do oceny wpływu lewosimendanu na układ krzepnięcia wykorzystano tromboelastografię (test CK). Pierwszy etap opisywany przez parametr R w analizowanej grupie wykazał istotny wzrost wartości R w drugiej dobie po zakończeniu leczenia. Kolejne

dwa parametry opisujące kinetykę formowanego skrzepu tj. K oraz Angle osiągnęły zbliżone wartości we wszystkich punktach czasowych w analizie grupy badanej. Maksymalna spoistość skrzepu opisywana przez wskaźnik MA uległa zwiększeniu we wszystkich ocenianych punktach czasowych, najwyraźniejszy wzrost odnotowano dobę po zakończeniu wlewu lewosimendanu, jednak uzyskane wartości nie wykazywały istotności statystycznej. Ostatnim ocenianym wskaźnikiem był stopień lizy skrzepu- LY30. Nie stwierdzono jednak znaczących zmian w trakcie leczenia lewosimendanem, jak i po jego zakończeniu w parametrze LY30. W badaniu przeprowadzonym przez Huang i wsp. [98] na modelu zwierzęcym oceniano przy pomocy tromboelastografu wpływ lewosimendanu na układ krzepnięcia *in vivo*. Uzyskane wyniki wykazały, że przy zastosowaniu istotnych klinicznie dawek lewosimendanu nie wywiera on znaczącego wpływu na układ krzepnięcia [98]. Rozbieżności w tych obserwacjach mogą wynikać z kilku czynników, głównie dotyczących analizowanej grupy badanej. Eksperymenty doświadczalne Huang i wsp. przeprowadzono na modelu zwierzęcym a nie ludzkim, jak w niniejszej pracy.

Analiza formowania skrzepliny w warunkach przepływu przy pomocy systemu T-TAS z wykorzystaniem mikrochipów z powierzchnią trombogenną, to kolejna po tromboelastografii metoda wykorzystana do oceny funkcji hemostazy. Jest to nowatorska, rozwijająca się metoda imitująca warunki fizjologicznego przepływu krwi. Nie uzyskano jednak statystycznie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi parametrami w badanej grupie. Prawdopodobnie wynika to z niskiej liczebności analizowanej grupy. Metoda ta przez swój unikatowy mechanizm działania może jednakże dostarczyć wartościowych wyników, które pomogą rozstrzygnąć wątpliwości związane z wpływem lewosimendanu na hemostazę.

Kolejnym etapem niniejszej pracy była ocena wpływu lewosimendanu na stężenie wybranych biomarkerów sercowo-naczyniowych, zarówno w trakcie leczenia lewosimendanem jak i bezpośrednio po zakończeniu (48-godzin oraz 72-godziny) wlewu leku. Pierwszym analizowanym biomarkerem był BNP. Uzyskane wyniki wykazały istotny spadek stężenia BNP w trakcie leczenia oraz w kolejnych dobach po zakończeniu terapii. Uzyskane wyniki są zgodne z rezultatami otrzymanymi w badaniach innych autorów przeprowadzonych w podobnych grupach pacjentów. Li i wsp. [99] w randomizowanym badaniu z pojedynczą zaślepioną próbą w grupie 101 pacjentów z ADHF porównywali efekt działania lewosimendanu w połączeniu z placebo (n= 51) vs. lewosimendan w połączeniu z



Shenfu injection (n= 50). U wszystkich pacjentów początkowe stężenie BNP przekraczało 400 pg/ml. Badacze wykazali istotny spadek stężenia BNP w obu grupach ( $p < 0,001$ ) po 24-godzinnym leczeniu lewosimendanem [99]. Podobne wyniki otrzymał Lelonek i wsp. [100], którzy wykazali że stężenie BNP uległo istotnemu obniżeniu z 1838 pg/ml [823–3271] przy przyjęciu do 1654 pg/ml [1001–2706] przy wypisie ( $p = 0,018$ ) po zastosowaniu leczenia lewosimendanem [100]. W kolejnym badaniu z podwójnie zaślepioną próbą, kontrolowanym placebo, autorstwa Mushtaq i wsp. [101] pacjenci z rozpozną ADHF zostali losowo przydzieleni do grupy z placebo (n= 19) lub do grupy otrzymującej lewosimendan (n= 23). Stężenie BNP oceniano przed rozpoczęciem 24-godzinnej infuzji leku oraz po jego zakończeniu. W grupie pacjentów otrzymujących placebo, stężenie BNP nie uległo zmianie ( $1042 \pm 811$  vs.  $1043 \pm 867$  pg/ml,  $p = 0,9$ ), natomiast w grupie otrzymującej wlew lewosimidanu badacze zaobserwowali istotny spadek stężenia BNP ( $1163 \pm 897$  vs.  $509 \pm 543$  pg/ml,  $p < 0,001$ ) [101].

Kolejnym ocenianym biomarkerem sercowo-naczyniowym była hs-cTnI. Analiza grupy badanej wykazała brak istotnych zmian w stężeniu hs-cTnI w trakcie podawania lewosimidanu oraz po zakończeniu leczenia. Uzyskane wyniki różnią się od wyników przedstawionych w badaniach innych autorów. W pracy Qu i wsp. [102] 87 pacjentów z rozpozną ostrą dekompenacją RHF (niewydolność prawej komory serca, *right heart failure*) podzielono na dwie grupy: pacjenci otrzymujący lewosimendan (n= 46) oraz grupę kontrolną (n= 41). U pacjentów leczonych lewosimendanem odnotowano znaczne obniżenie stężenia cTnI w porównaniu z grupą kontrolną [102]. Również Mansiroglu i wsp. [103] w badaniu przeprowadzonym na grupie 47 pacjentów z rozpoznaniem ADHF, stwierdzili istotny spadek stężenia hs-cTnI po zastosowanym leczeniu lewosimendanem ( $0,058 \pm 0,069$  vs.  $0,040 \pm 0,046$  ng/ml,  $p = 0,046$ ) [103].

Ostatnim badanym biomarkerem była galektyna-3, uznawana za markerem włóknienia mięśnia sercowego, który jednak nie jest szeroko stosowany w rutynowej praktyce klinicznej [104]. W badanej grupie pacjentów stężenie galektyny-3 nie uległo istotnym statystycznie zmianom w trakcie badania. Dostępne w literaturze dane różnią się od wyników uzyskanych w powyższej pracy, ponieważ wykazują, że terapia lewosimendanem przyczynia się do redukcji stężenia galektyny-3 w osoczu. W badaniu Xu i wsp. [105] przeprowadzonym na modelu zwierzęcym AHF wykazali istotny ( $p < 0,001$ ) spadek stężenia galektyny-3 po

zastosowaniu leczenia lewosimendanem. Co więcej naukowcy ci wykazali, że wyższa dawka lewosimendanu powodowała większy spadek stężenia galektyny-3 [105]. Również Yao i wsp. [106] w badaniu na grupie 92 pacjentów z CHF z ostrym początkiem objawów oceniali poziom galektyny-3 przed oraz bezpośrednio po zakończeniu leczenia. Stężenie galektyny-3 po zakończeniu leczenia było wyraźnie niższe [106].

Analiza uzyskanych wyników nie wykazała wyraźnego wpływu w trakcie leczenia lewosimendanem jak i bezpośrednio po zakończeniu leczenia na zmiany stężenia hs-cTnI oraz galektyny-3 w osoczu. Uzyskane różnice w stężeniach obu tych biomarkerów oscylują w granicach krótkoterminowej zmienności biologicznej ocenianej w pracy Schindler i wsp. [107], jednak w grupie pacjentów ze stabilną HF [107]. Co więcej, zarówno w przypadku hs-cTnI jak i galektyny-3 dostępne w literaturze badania wykazują znaczący wpływ stosowanej terapii lewosimendanem na stężenie powyższych biomarkerów. Może to być spowodowane niską liczebnością badanej grupy w porównaniu do przytoczonych wyżej prac, jak również odmienną metodyką badawczą dotyczącą tych biomarkerów.

Oprócz wcześniej omówionych biomarkerów sercowo-naczyniowych w powyższej pracy przeanalizowano również zmiany stężenia CRP oraz kreatyniny w trakcie badania. Po rozpoczęciu wlewu lewosimendanu odnotowano istotny spadek stężenia CRP. Przeciwpalne działanie lewosimendanu znajduje potwierdzenie w wielu badaniach. Lin i wsp. [108] w badaniu przeprowadzonym na grupie 180 pacjentów z rozpoznaniem HF stwierdzili istotny ( $p < 0,05$ ) spadek stężenia CRP oznaczanego metodą o wysokiej czułości po zastosowanym leczeniu lewosimendanem [108]. Zbliżone wyniki zaprezentowali w swoim badaniu Qu i wsp. [102] którzy w grupie pacjentów z rozpoznaniem RHF leczonej lewosimendanem zaobserwowali istotny spadek stężenia CRP ( $p = 0,001$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej nie otrzymującej terapii lewosimendanem [102]. Podobnie w pracy Parissis i wsp. [109] wykazano, że leczenie lewosimendanem wywołało istotne obniżenie stężenia CRP ( $p < 0,01$ ), podczas gdy pozostawało one niezmiennie w grupie placebo [109]. Potwierdza to przeciwzapalne działanie lewosimendanu, zaobserwowane również w niniejszej pracy.

Analiza zmian stężenia kreatyniny w osoczu wykazała istotny spadek stężenia tego biomarkera bezpośrednio po zakończeniu leczenia lewosimendanem. Dostępne w literaturze

dane potwierdzają powyższe obserwacje. Fedele i wsp. [110] w grupie pacjentów z ADHF zaobserwowali istotny spadek stężenia kreatyniny w drugiej dobie po zakończeniu leczenia lewosimendanem ( $1,76 \pm 0,37$  mg/dL vs.  $1,51 \pm 0,5$  mg/d;  $p = 0,002$ ) [110]. Również w badaniu Qu i wsp. [102] naukowcy wykazali spadek stężenia kreatyniny po zakończeniu dożylnego wlewu lewosimendanu [102].

Wykonano dodatkową analizę polegającą na ocenie zależności pomiędzy stężeniem biomarkerów sercowo-naczyniowych a testami funkcji płytek krwi w pierwszym i ostatnim punkcie czasowym. Analiza grupy badanej wykazała istotną statystycznie ujemną zależność pomiędzy stężeniem BNP oraz galektyny-3 a testami funkcji płytek. Uzyskane wyniki różnią się od wyników przedstawionych w pracach innych autorów. Chen i wsp. [111] wykazali na grupie pacjentów z CAD silną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem galektyny-3 w osoczu a agregacją płytek krwi [111]. W innym badaniu Budak i wsp. [112] korelowali stężenie BNP i średnią objętość płytek krwi (MPV) jako wykładnik aktywacji płytek krwi w grupie pacjentów z AHF. Naukowcy stwierdzili dodatnią zależność pomiędzy stężeniem BNP a MPV [112]. Ograniczona liczba dostępnych danych literaturowych uniemożliwiają jednak wyciągnięcie jednoznacznych wniosków z tych obserwacji.

Istotną kwestią, którą należy wziąć pod uwagę analizując uzyskane wyniki jest możliwość obarczenia wyników błędem zarówno przedanalizycznym jak i analitycznym. Błąd przedanalizyczny obejmuje nieprawidłowości związane z pobraniem materiału, transportem do laboratorium oraz czasem jaki upłynął do momentu wykonania analizy. Natomiast na prawdopodobieństwo popełnienia błędu analitycznego może wskazywać wykonywanie oznaczeń przez różnych operatorów, wykorzystywanie różnych partii odczynników niezbędnych do przeprowadzenia badania oraz zmiana warunków otoczenia wykonywanych testów. Ponadto, istotnym ograniczeniem w niniejszej pracy jest stosunkowo niewielka liczebność grupy badanej. Jednakże kliniczne znaczenie badania, przeprowadzonego w warunkach szpitalnych w grupie pacjentów z rozpoznaną HF i ocenianą w różnych punktach czasowych terapii dożylną lewosimendanem, podkreśla znaczenie powyższych obserwacji, których wyniki z pewnością powiększą ograniczoną ilość dostępnych danych literaturowych dotyczących tej tematyki.

Podsumowując, zagadnienia prezentowane w niniejszej pracy od wielu lat stanowią przedmiot rozważań klinicystów, którzy na co dzień podejmują trud leczenia pacjentów cierpiących z powodu niewydolności serca i co za tym idzie szeregiem powikłań będących następstwem tej choroby. Jednak dostępna wiedza dotycząca wpływu lewosimendanu na proces krzepnięcia jest wciąż niewystarczająca. Fakt ten stał się przyczynkiem dla przeprowadzenia tej pracy.

W powyższym badaniu wykazano jak wpływ terapii lewosimendanem na hamowanie funkcję płytek krwi, potwierdzony dwiema metodami badawczymi. Z kolei analizy dotyczące pozostałych etapów krzepnięcia nie wykazały jednoznacznych wyników. W dalszym toku badania dokonano oceny zmian stężeń biomarkerów sercowo-naczyniowych, do których zaliczamy BNP, hs-cTnI oraz galektyna-3, a także dodatkowo CRP i kreatyniny po zastosowanym leczeniu lewosimendanem. W przypadku BNP, CRP oraz kreatyniny zgodnie z danymi literaturowymi stwierdzono redukcję stężeń w osoczu w następstwie dożylnego podania lewosimendanu. Natomiast analizując zmiany stężeń hs-cTnI oraz galektyny-3 nie zaobserwowano istotnych zmian, w odróżnieniu od wyników prac innych autorów.

Należy jednak podkreślić, że dostępne dane literaturowe dotyczące powyższej tematyki są ograniczone i zazwyczaj nie obejmują porównywalnej grupy pacjentów czy stosowanych metod. Co więcej, ze względu na napotkanie innych ograniczeń, z których najistotniejsza wydaje się być niska liczebność grupy badanej, kluczową kwestią pozostaje rozszerzenie grupy pacjentów włączonych do badań w przyszłości, co z pewnością umożliwi przybliżenie się do rozwiązania tego zagadnienia i poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów działania lewosimendanu na funkcję płytek krwi i układu krzepnięcia w celu osiągnięcia lepszych efektów leczenia pacjentów z HF.

## 6. Wnioski

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wykazują, że stosowanie lewosimendanem w grupie pacjentów z niewydolnością serca wpływa na proces krzepnięcia oraz stężenie parametrów laboratoryjnych, co wykazano w następujących wnioskach:

- ❖ Otrzymywanie przez pacjentów z rozpoznaniem HF leczenia lewosimendanem wiązało się ze zmniejszeniem stopnia agregacji płytek krwi, co szczególnie widoczne było w testach, w których czynnikiem aktywującym był kwas arachidonowy, kolagen oraz ADP.
- ❖ Terapia lewosimendanem prowadziła do obniżenia stężenia BNP w większości analizowanych punktów czasowych.
- ❖ Dodatkowo zaobserwowano, że dożylna infuzja lewosiemendanu wpływa na obniżenie stężenia CRP oraz kreatyniny w surowicy.

## 7. Streszczenie

Lewosimendan to lek o działaniu inotropowym, który charakteryzuje się specyficznym mechanizmem działania. Lek ten poprawia kurczliwość mięśnia sercowego bez zwiększania zapotrzebowania na tlen, wewnątrzkomórkowego stężenia cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP) oraz  $Ca^{2+}$ . Dodatkowo wykazuje działanie wazodylatacyjne poprzez otwarcie kanałów potasowych zależnych od adenozyotrójfosforanu (ATP) w komórkach mięśni gładkich budujących ściany naczyń krwionośnych. Ponadto, dostępne badania wskazują na potencjalny wpływ lewosimendanu na hemostazę.

Celem pracy była ocena wpływu lewosimendanu i jego aktywnych metabolitów na proces krzepnięcia u pacjentów z niewydolnością serca (HF). Dodatkowo, oceniano wpływ lewosimendanu na zmiany stężenia biomarkerów sercowo-naczyniowych.

W badaniu wzięło udział 25 pacjentów z dekompenacją przewlekłej niewydolności serca (CHF). Wszyscy pacjenci otrzymali leczenie inotropowe. Lewosimendan podawano w ciągłej infuzji dożylniej przez 24 godziny: 0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  przez 1 godzinę, następnie 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  przez 23 godziny. Badanie przeprowadzono w 7 punktach czasowych: 0h (przed rozpoczęciem podawania leku), a następnie 1h, 6h, 12h, 24h, 48h oraz 72h od rozpoczęcia infuzji lewosimendanu. Funkcję płytek krwi oraz układu krzepnięcia oceniano za pomocą dostępnych metod: agregometria impedancyjna (Analizator Multiplate<sup>®</sup>: ADPtest, ASPItest, COLtest, TRAPtest, RISTOtest), tromboelastografia (TEG<sup>®</sup>: test platelet mapping<sup>™</sup> [ADP,AA]; test CK) oraz system całościowej analizy formowania skrzepu (T-TAS: AR-chip). Oceniano również stężenie w osoczu peptydu natriuretycznego typu B (BNP), galektyny-3 oraz troponiny sercowej I ocenianej metodą wysokoczułą (hs-cTnI).

Testy ADPtest 0h vs. 24h: 64,00 [39,00-86,00] vs. 53,00 [41,00-76,00],  $p= 0,042$ ), ASPItest (0h vs. 12h: 64,00 [40,00-91,00] vs. 40,00 [22,00-64,00],  $p= 0,001$ ) oraz COLtest (0h vs. 12h: 44,00 [30,00-60,00] vs. 33,00 [19,00-38,00],  $p= 0,001$ ) wykazały istotny spadek aktywności płytek krwi w trakcie leczenia lewosimendanem. Test platelet mapping-AA potwierdził spadek aktywności płytek krwi (0h vs. 12h: 6,60 [0,00-28,10] vs. 58,20 [14,60-79,80],  $p= 0,0006$ ). W teście CK stwierdzono istotny statystycznie ( $p= 0,029$ ) wzrost parametru R (0h vs. 72h: 6,45 [5,90-7,90] vs. 7,85 [6,00-9,30]). Analiza zmian stężenia

biomarkerów sercowo-naczyniowych wykazała istotną statystycznie redukcję stężenia BNP w osoczu w trakcie leczenia lewosimendanem (0h vs. 12h: 1081,81 [549,15-1703,09] vs. 752,21 [580,36-1004,33],  $p= 0,017$ ) jak i po jego zakończeniu (0h vs. 48h: 1081,81 [549,15-1703,09] vs. 634,64 [321,75-890,24],  $p= 0,001$ ). W przypadku galektyny-3 oraz hs-cTnI nie wykazano znamienych statystycznie zmian stężenia.

Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że leczenie lewosimendanem wpływało hamująco na funkcję płytek krwi. Ponadto, potwierdzono, że dożylna infuzja lewosimendanu przyczynia się do obniżenia stężenia BNP w osoczu oraz parametrów laboratoryjnych takich jak CRP oraz kreatynina. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność dalszych badań ukierunkowanych na ocenę wpływu terapii lewosimendanem na hemostazę z udziałem większej grupy pacjentów.

## 8. Abstract

Levosimendan is an inotropic agent with a special mechanism of action. This drug increases the contractile force of the myocardium without boosting oxygen demand, intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The second mechanism of action is the vasodilatory effect by the opening of adenosine triphosphate (ATP)-dependent potassium channels of smooth muscle cells and myocytes. Furthermore, the existing data suggest a potential impact of levosimendan on haemostasis.

The aim of this study was to evaluate the influence of levosimendan and its active metabolites on haemostasis and thrombus formation in patients with heart failure (HF). In addition, the effect of levosimendan on changes in the concentration of cardiovascular biomarkers was assessed.

The study comprised 25 patients with decompensation of chronic heart failure (CHF). All patients were subjected to inotropic treatment. Levosimendan was administered by continuous intravenous infusion over 24 hours: 0.2  $\mu\text{g}$  /kg/min for 1 hour, then 0.1  $\mu\text{g}$ /kg/min for 23 hours. Peripheral blood was collected according to the following schedule: before and 1h, 6h, 12h, 24h, 48h, and 72h after levosimendan infusion. The function of platelets and the coagulation system was assessed with the use of available methods, that is impedance aggregometry (The Multiplate<sup>®</sup> Analyzer: ADPtest, ASPItest, COLtest, TRAPtest, RISTOtest), Thromboelastography (TEG<sup>®</sup>: the platelet mapping<sup>™</sup> assay [ADP,AA]; CK assay), and total thrombus formation analysis system (T-TAS system: AR-chip). The concentration of B-type natriuretic peptide (BNP), galectin-3, and highly sensitive cardiac troponin I (hs-cTnI) in the plasma was also evaluated.

ADPtest (0h vs. 24h: 64.00 [39.00-86.00] vs. 53.00 [41.00-76.00],  $p= 0.042$ ), ASPItest (0h vs. 12h: 64.00 [40.00-91.00] vs. 40.00 [22.00-64.00],  $p= 0.001$ ) and COLtest (0h vs. 12h: 44.00 [30.00-60.00] vs. 33.00 [19.00-38.00],  $p= 0.001$ ) showed a significant decrease in platelet activity during treatment with levosimendan. The Platelet Mapping Test with AA reagent revealed statistically significant differences in the level of platelet inhibition during the treatment (0h vs. 12h: 6.60 [0.00-28.10] vs. 58.20 [14.60-79.80],  $p= 0.0006$ ). The analysis of the CK test indicated an increase in the R parameter in the study group (0h vs. 72h: 6.45 [5.90-7.90] vs. 7.85 [6.00-9.30]). The analysis of changes in the concentration of



cardiovascular biomarkers demonstrated a statistically significant reduction in plasma BNP levels during (0h vs. 12h: 1081.81 [549.15-1703.09] vs. 752.21 [580.36-1004.33],  $p= 0.017$ ) and after (0h vs. 48h: 1081.81 [549.15-1703.09] vs. 634.64 [321.75-890.24],  $p= 0.001$ ) treatment with levosimendan. In the case of galectin-3 and hs-cTnI, no statistically significant changes were found.

The results of this study suggest that levosimendan therapy has an inhibitory effect on platelet function. Moreover, the research confirmed the impact of intravenous levosimendan infusion on plasma BNP concentration and other parameters commonly assessed in this group of patients. The obtained outcomes indicate that this aspect requires further verification on a larger sample of patients.

## 9. Piśmiennictwo

- [1] Sorsa T, Pollesello P, Rosevear PR, Drakenberg T, Kilpeläinen I,. Stereoselective binding of levosimendan to cardiac troponin C causes Ca<sup>2+</sup>-sensitization. *Eur J Pharmacol.* 2004,13;486:1-8.
- [2] Kaheinen P,. Levosimendan: Studies on its mechanisms of action and beyond. ISBN 978-952-10-5735-9.
- [3] Pagel PS, Haikala H, Pentikäinen PJ, Toivonen ML, Nieminen MS, Lehtonen L, Papp JG, Warltier DC,. Pharmacology of levosimendan: A new myofilament calcium sensitizer. *Cardiovascular Drug Reviews.* 1996,14;286-316.
- [4] Papp Z, Édes I, Fruhwald S, De Hert SG, Salmenperä M, Leppikangas H, Mebazaa A, Landoni G, Grossini E, Caimmi P, Morelli A, Guarracino F, Schwinger RHG , Meyer S, Algotsson L, Wikström BG, Jörgensen K, Filippatos G, Parissis JT, García González MJ, Parkhomenko A, Yilmaz MB, Kivikko M, Pollesello P, Follath F,. Levosimendan: molecular mechanisms and clinical implications: consensus of experts on the mechanisms of action of levosimendan. *Int J Cardiol.* 2012;159:82-87.
- [5] Robertson IM, Sun YB, Li MX, Sykes BD,. A structural and functional perspective into the mechanism of Ca<sup>2+</sup>-sensitizers that target the cardiac troponin complex. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49:1031-1041.
- [6] Li MX, Hwang PM,. Structure and Function of Cardiac Troponin C (TNNC1): Implications for Heart Failure, Cardiomyopathies, and Troponin Modulating Drugs. *Gene.* 2015;571:153-166.
- [7] Pathak A, Lebrin M, Vaccaro A, Senard JM, Despas F,. Pharmacology of levosimendan: inotropic, vasodilatory and cardioprotective effects. *J Clin Pharm Ther.* 2013;38:341-349.
- [8] Tolle WG, Stranz C,. Levosimendan, a New Inotropic and Vasodilator Agent. *Anesthesiology.* 2006; 104:556–569.
- [9] Ozdem SS, Yalcin O, Meiselman HJ, Baskurt OK, Usta C,. The role of potassium channels in relaxant effect of levosimendan in rat small mesenteric arteries. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2006;20:123-127.

- [10] Pataricza J, Krassoi I, Hohn J, Kun A, Papp JG,. Functional role of potassium channels in the vasodilating mechanism of levosimendan in porcine isolated coronary artery. *Cardiovasc Drugs*. 2003;17:115-121.
- [11] Bowman P, Haikala H, Paul RJ: Levosimendan, a calcium sensitizer in cardiac muscle, induces relaxation in coronary smooth muscle through calcium desensitization. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;288:316–325.
- [12] Haikala H, Linden IB: Mechanisms of action of calcium-sensitizing drugs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;6:10–9.
- [13] Antoniadis C, Tousoulis D, Koumallos N, Marinou K, Stefanadis C,. Levosimendan: beyond its simple inotropic effect in heart, *Pharmacol. Ther*. 2007;114:184–197.
- [14] Pollesello P, Papp Z., The cardioprotective effects of levosimendan: preclinical and clinical evidence. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50:257-263.
- [15] Antila S, Sundberg S, Lehtonen LA,. Clinical Pharmacology of Levosimendan *Clin Pharmacokinet*. 2007;46:535-552.
- [16] Charakterystyka produktu leczniczego. 2022  
[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjDlps\\_oHzAhUKrYsKHRtHBx4QFnoECAMQAQ&url=https%3A%2F%2Frejestrmedyczne.ezdrowie.gov.pl%2Fapi%2Frppl%2Fmedicinalproducts%2F34002%2Fcharacteristic&usg=AOvVaw1uAmMwonRqH2iYfO4MueBL](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjDlps_oHzAhUKrYsKHRtHBx4QFnoECAMQAQ&url=https%3A%2F%2Frejestrmedyczne.ezdrowie.gov.pl%2Fapi%2Frppl%2Fmedicinalproducts%2F34002%2Fcharacteristic&usg=AOvVaw1uAmMwonRqH2iYfO4MueBL). Data wejścia: 03.05.2023r.
- [17] Follath F, Cleland JG, Just H, Papp JGY, Scholz H, Peuhkurinen K, Harjola VP, Mitrovic V, Abdalla M, Sandell EP, Lehtonen L,. Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe lowoutput heart failure (the LIDO study): a randomised double-blind trial. *Lancet*. 2002;360:196–202.
- [18] Moiseyev VS, Poder P, Andrejevs N, Ruda MY, Golikov AP, Lazebnik L.B, Kobalava Z.D, Lehtonen LA, Laine T, Nieminen MS, Lie KI,. Safety and efficacy of a novel calcium sensitizer, levosimendan, in patients with left ventricular failure due to an acute myocardial infarction. A randomized, placebo-controlled, double-blind study (RUSSLAN). *Eur Heart J*, 2002;23:1422–1432.

- [19] Mebazaa A, Nieminen MS, Packer M, Cohen-Solal A, Kleber FX, Pocock SJ, Thakkar R, Padley RJ, Pöder P, Kivikko, . Levosimendan vs dobutamine for patients with acute decompensated heart failure: the SURVIVE Randomized Trial. *JAMA*, 2007;297:1883–1891.
- [20] Packer M, Colucci W, Fisher L, Massie BM, Teerlink JR, Young J, Padley RJ, Thakkar R, Delgado-Herrera L, Salon J, Garratt C, Huang B, Sarapohja T, . Effect of levosimendan on the short-term clinical course of patients with acutely decompensated heart failure. *JACC Heart Fail*. 2013;1:103-111.
- [21] Feneck R, . Phosphodiesterase inhibitors and the cardiovascular system. 2008;8: DOI:<https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkn010>.
- [22] Sikora J, Pstrągowski K, Skibińska N, Sobczak P, Sikora A, Marszał MP, Fabiszak T, Grzešek G, Kubica J, . Impact of levosimendan on platelet function. *Thromb Res*. 2017;159:76-81.
- [23] Lancaster MK, Cook SJ, . The effects of levosimendan on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*. 1997;339:97–100.
- [24] Edes I, Kiss E, Kitada Y, Powers FM, Papp JG, Kranias EG, Solaro RJ. Effects of Levosimendan, a cardiotonic agent targeted to troponin C, on cardiac function and on phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> sensitivity of cardiac myofibrils and sarcoplasmic reticulum in guinea pig heart. *Circ Res*. 1995;77:107–113.
- [25] Szilagyi S, Pollesello P, Levijoki J, Kaheinen P, Haikala H, Edes I, Papp Z. The effects of levosimendan and OR-1896 on isolated hearts, myocyte-sized preparations and phosphodiesterase enzymes of the guinea pig. *Eur J Pharmacol*. 2004;486:67–74.
- [26] McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Bohm M, Burri H, Butler J, Celutkiene J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, . 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021;00:1-128.
- [27] Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, .

Wytyczne ESC dotyczące diagnostyki i leczenia ostrej i przewlekłej niewydolności serca w 2016 roku. *Kardiologia Polska*. 2016;10:1037–1147.

[28] Conrad N, Judge A, Tran J, Mohseni H, Hedgecott D, Crespillo AP, Allison M, Hemingway H, Cleland JG, McMurray JJV, Rahimi K. Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals. *Lancet* 2018;391:572580.

[29] Solnica B. Diagnostyka laboratoryjna chorób układu sercowo-naczyniowego. W: Solnica B,. Diagnostyka Laboratoryjna. Wydanie II. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2020; s. 19-30.

[30] Nessler J, Windak A, Oleszczyk M, Golińska-Grzybała K, Gackowski A,. Zasady postępowania w niewydolności serca. Wytyczne Kolegium Lekarzy Rodzinnych w Polsce oraz Sekcji Niewydolności Serca Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. *Lekarz Rodzinny* Wydanie specjalne 1/2015.

[31] Njoroge JN], Teerlink JR,. Pathophysiology and Therapeutic Approaches to Acute Decompensated Heart Failure. *Circ Res*. 2021;128:1468-1486.

[32] Vahdatpour C, Collins D, Sheldon Goldberg S,. Cardiogenic Shock. *J Am Heart Assoc*. 2019; 8: e011991.

[33] Damman K, Kjekshus J, Wikstrand J, Cleland JG, Komajda M, Wedel H, Waagstein F, McMurray JJ. Loop diuretics, renal function and clinical outcome in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. 2016;18:328-336.

[34] Ter Maaten JM, Martens P, Damman K, Dickstein K, Ponikowski P, Lang CC, Ng LL, Anker SD, Samani NJ, Filippatos G, Cleland JG, Zannad F, Hillege HL, van Veldhuisen DJ, Metra M, Voors AA, Mullens W. Higher doses of loop diuretics limit uptitration of angiotensin-converting enzyme inhibitors in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *Clin Res Cardiol*. 2020;109:1048-1059.

[35] Francis GS, Bartos JA, Adatya S,. Inotropes. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:2069-2078.

[36] Tariq S, Aronow WS,. Use of Inotropic Agents in Treatment of Systolic Heart Failure. *Int J Mol Sci*. 2015;16:29060–29068.

- [37] Amin A, Maleki M,.Positive inotropes in heart failure: a review article. *Heart Asia*. 2012;4:16–22.
- [38] Bistola V, Arfaras-Melainis A, Polyzogopoulou E, Ikonomidis I, Parissis J,. Inotropes in Acute Heart Failure: From Guidelines to Practical Use: Therapeutic Options and Clinical Practice. *Card Fail Rev*. 2019;5:133–139.
- [39] Bistola V, Chioncel O,. Inotropes in acute heart failure. *Continuing Cardiology Education*, doi: 10.1002/cce2.59.
- [40] Kranias EG, Hajjar RJ,. Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulator. *Circ Res*. 2012;110:1646–1660.
- [41] Byrne MJ, Power JM, Prevolos A, Mariani JA, Hajjar RJ, Kaye DM,. Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. *Gene Ther*. 2008;15:1550-1557.
- [42] Iakobishvili Z, Cohen E, Garty M et al. Use of intravenous morphine for acute decompensated heart failure in patients with and without acute coronary syndromes. *Acute Card Care*, 2011;13:76–80.
- [43] Peacock WF, Hollander JE, Diercks DB et al. Morphine and outcomes in acute decompensated heart failure: an ADHERE analysis. *Emerg Med J*. 2008;25:205–209.
- [44] Vasile VC, Jaffe AS,. Natriuretic Peptides and Analytical Barriers. *Clin Chem*. 2017;63:50-58.
- [45] Nessler J, Straburzyńska-Migaj E, Windak A, Solnica B, Szmitkowski M, Paradowski M, Kaźmierczak J, Puacz E, Rozentryt P,. Expert consensus on the usefulness of natriuretic peptides in heart failure. *Kardiol Pol*. 2018;76:215-224.
- [46] Surma S, Bańkowski E,. Progress in study on natriuretic peptides. *Folia Cardiologica*. 2020;2;137–148.

- [47] Rubattu S, Sciarretta S, Valenti V, Stanzione R, Volpe M,. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use, and implication in cardiovascular diseases. *Am J Hypertens*. 2008;21:733-741.
- [48] Szabó G. Biology of the B-type natriuretic peptide: structure, synthesis and processing. *Biochem Anal Biochem*. 2012;1: DOI: 10.4172/2161-1009.1000e129.
- [49] Kyrzopoulos S, Adamopoulos S, Parissis JT, Rassias J, Kostakis G, Iliodromitis E, Degiannis D, Kremastinos DT,. Levosimendan reduces plasma B-type natriuretic peptide and interleukin 6, and improves central hemodynamics in severe heart failure patients. *Int J Cardiol*. 2005;99:409-413.
- [50] Moertl D, Berger R, Huelsmann M, Bojic A, Pacher R,. Short-term effects of levosimendan and prostaglandin E1 on hemodynamic parameters and B-type natriuretic peptide levels in patients with decompensated chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2005;7:1156-1163.
- [51] Cohen-Solal A, Logeart D, Huang B, Cai D, Nieminen MS, Mebazaa A,. Lowered B-type natriuretic peptide in response to levosimendan or dobutamine treatment is associated with improved survival in patients with severe acutely decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:2343-2348.
- [53] Parissis JT, Andreadou I, Markantonis SL, Bistola V, Louka A, Pyriochou A, Paraskevaidis I, Filippatos G, Iliodromitis EK, Kremastinos DT,. Effects of Levosimendan on circulating markers of oxidative and nitrosative stress in patients with advanced heart failure. *Atherosclerosis*. 2007;195:e210-215.
- [54] Malfatto G, Della Rosa F, Villani A, Rella V, Branzi G, Facchini M, Parati G,. Intermittent levosimendan infusions in advanced heart failure: favourable effects on left ventricular function, neurohormonal balance, and one-year survival. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;60:450-455.
- [55] Avgeropoulou C, Andreadou I, Markantonis-Kyroudis S, Demopoulou M, Missovoulos P, Androulakis A, Kallikazaros I,. The Ca<sup>2+</sup>-sensitizer levosimendan improves oxidative damage, BNP and pro-inflammatory cytokine levels in patients with advanced decompensated heart failure in comparison to dobutamine. *Eur J Heart Fail*. 2005;7:882-887.

- [56] Hara A, Niwa M, Kanayama T, Noguchi K, Niwa A, Matsuo M, Kuroda T, Hatano Y, Okada H, Tomita H,. Galectin-3: A Potential Prognostic and Diagnostic Marker for Heart Disease and Detection of Early Stage Pathology. *Biomolecules*. 2020;10:1277.
- [57] Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, Yuan H,. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy. *Int J Mol Med*. 2018;41:599–614.
- [58] Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ,. Identification of galectin- 3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:1213-1217.
- [59] Meier ID, Walker MP, Matera AG,.Gemin4 is an essential gene in mice, and its overexpression in human cells causes relocalization of the SMN complex to the nucleoplasm. *Biol Open*. 2018;7: bio032409.
- [60] Park JW, Voss PG, Grabski S, Wang JL, PattersonRJ,. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:3595-3602.
- [61] Zhong X, Qian X, Chen G, Song X,. The role of galectin-3 in heart failure and cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019;46:197-203.
- [62] Świącki P, Knapp M, Lisowska A,. The role of galectin 3 as a diagnostic and prognostic marker in cardiology. *Folia Cardiologica*. 2018;1:29–34.
- [63] Amin HZ, Amin LZ, Wijaya IP,. Galectin-3: a novel biomarker for the prognosis of heart failure. *Clujul Med*. 2017;90:129–132.
- [64] Wettersten N, Maisel A. Role of Cardiac Troponin Levels in Acute Heart Failure. *Card Fail Rev*. 2015;1:102–106.
- [65] Negahdary M, Namayandeh SM , Behjati-Ardekani M , Ghobadzadeh S, Dehghani H, Soltani MH,. The Importance of the Troponin Biomarker in Myocardial Infarction. *J. Biol. Today's World*. 2016;5:1-12.
- [66] Gherasim L,. Troponins in Heart Failure – a Perpetual Challenge. *Maedica (Bucur)*. 2019; 14:371–377.



- [67] Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, Dendale P, Dorobantu M, Edvardsen T, Folliguet T, Gale CP, Gilard M, Jobs A, Jüni P, Lambrinou E, Lewis BS, Mehilli J, Meliga E, Merkely B, Mueller C, Roffi M, Rutten FH, Sibbing D, Siontis GCM,. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* . 2021;42:1289-1367.
- [68] Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P,. Wytuczne ESC dotyczące postępowania w ostrym zawale serca z uniesieniem odcinka ST w 2017 roku. *Kardiologia Polska* 2018;76: 229–313.
- [69] Garmo C, Bajwa T, Burns B,. *Physiology, Clotting Mechanism*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
- [70] Ghoshal K, Bhattacharyya M,. *Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis*. *ScientificWorldJournal*. 2014; 2014:781857.
- [71] Fritsma GA,. *Platelet Structure and Function*. *Clin Lab Sci*. 2015;28:125.
- [72] Theroux P,. *Podstawy leczenia i nowe możliwości terapeutyczne w ostrych zespołach wieńcowych bez uniesionego odcinka ST*. W: Theroux P. *Ostre Zespoły Wieńcowe. A Companion to Braunwald's Heart Disease*. Wydanie 1 polskie. Redakcja naukowa Stępińska J. Wydawnictwo Elsevier Urban & Partner, Wrocław: 2014; tom 2; 196-203.
- [73] Windyga J, Undas A,. *Hemostaza fizjologiczna*. W: Windyga J., Pasiński T. i wsp. *Zakrzepy i zatory*. Wydanie 1. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2014; s. 5-14.
- [74] Poddar MK], Banerjee S,. *Molecular Aspects of Pathophysiology of Platelet Receptors*. DOI: 10.5772/intechopen.92856.
- [75] Saboor M, Ayub Q, Ilyas S, Moinuddin S,. *Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology*. *Pak J Med Sci*. 2013;29:891–896.
- [76] Cattaneo M,. *Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs*. *Exp. Rev. Cardiovasc. Ther*. 2007;5:45-55.

- [77] Koupenova M, Ravid K. Biology of Platelet Purinergic Receptors and Implications for Platelet Heterogeneity. *Front. Pharmacol.* 2018; <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00037>.
- [78] Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J.* 2010;31:17-28.
- [79] Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 2014;58:515-523.
- [80] Zawilska K. Fizjologia Hemostazy. W: Haus I, Dmoszyńska A, Robak T. Podstawy Hematologii. Wydanie IV. Wydawnictwo CZELEJ. Lublin 2019; s. 27-45.
- [81] Lipe B, Ornstein DL. Deficiencies of Natural Anticoagulants, Protein C, Protein S, and Antithrombin. *Circulation.* 2011;124:e365–e368.
- [82] Chapina JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.* 2015; 29:17–24.
- [83] Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of Fibrinolysis and Basic Principles of Management. Hemostasis and Thrombosis: Practical Guidelines in Clinical Management, First Edition. Hussain I. Saba and Harold R. Roberts. Published 2014 by John Wiley & Sons, Ltd.
- [84] Walczak B, Demkow U, Fijałkowska A. Methods of estimating concentration of the D-dimers used in venous thromboembolism diagnosis. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2009;77:264–270.
- [85] Sibbing D, Aradi D, Alexopoulos D, Ten Berg J, Bhatt DL, Bonello L, Collet JP, Cuisset T, Franchi F, Gross L, Gurbel P, Jeong YH, Mehran R, Moliterno DJ, Neumann FJ, Pereira NL, Price MJ, Sabatine MS, So DYF, Stone GW, Storey RF, Tantry U, Trenk D, Valgimigli M, Waksman R, Angiolillo DJ. Updated Expert Consensus Statement on Platelet Function and Genetic Testing for Guiding P2Y<sub>12</sub> Receptor Inhibitor Treatment in Percutaneous Coronary Intervention. *JACC Cardiovasc. Interv.* 2019;12;1521–1537.
- [86] Wiśniewski A, Sikora J, Karczmarska-Wódzka A, Sobczak P. A Combination of Aspirin and Clopidogrel Predict More Favorable Dynamics of Platelet Reactivity versus Clopidogrel Alone in the Acute Phase of Minor Stroke. *Healthcare.* 2021;9:628.

- [87] Wiśniewski A, Karczmarzka-Wódzka A, Sikora J, Sobczak P, Lemanowicz A, Filipiska K, Ślusarz R. Hypercoagulability as Measured by Thrombelastography May Be Associated with the Size of Acute Ischemic Infarct— A Pilot Study. *Diagnostics*. 2021;11:712.
- [88] Sikora J, Karczmarzka-Wódzka A, Bugieda J, Sobczak P. The Use of Total Thrombus Formation Analysis System as a Tool to Assess Platelet Function in Bleeding and Thrombosis Risk—A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2021;22:8605.
- [89] Hosokawa K, Ohnishi T, Kondo T, Fukasawa M, Koide T, Maruyama I, Tanaka KA. A novel automated microchip flow-chamber system to quantitatively evaluate thrombus formation and antithrombotic agents under blood flow conditions. *J Thromb Haemost*. 2011;9:2029-2037.
- [90] Kurdi M, Pollesello P, Booz GW. Levosimendan Comes of Age: 20 Years of Clinical Use. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2020 Jul;76:1-3.
- [91] Kaptan K, Erinç K, Ifran A, Yildirim V, Uzun M, Beyan C, Işık E. Levosimendan has an inhibitory effect on platelet function. *Am. J. Hematol*. 2008; 83:46–49.
- [92] Plaschke K, Bent F, Rosenhagen C, Wagner S, Hofer S, Kopitz J. The inhibitory in-vitro effect of high-dose levosimendan on platelet function may be mediated through its action as a phosphodiesterase inhibitor. *Coron. Artery Dis*. 2012;23:215–220.
- [93] Pataricza J, Ambrus N, Pollesello P, Levijoki J, Kun A, Varro A, Papp JG. Inhibition of thrombin-induced platelet aggregation by levosimendan is modified by small changes in albumin concentration in vitro, *Exp. Clin. Cardiol*. 2013;1–4.
- [94] Ambrus N, Szolnoky J, Pollesello P, Kun A, Varró A, Papp JG, Pataricza J. Prolonged antispasmodic effect in isolated radial artery graft and pronounced platelet inhibition induced by the inodilator drug, levosimendan, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 2012;110:269–274.
- [95] Tawfik MK, El-Kherbetawy MK, Makary S. Cardioprotective and Anti-Aggregatory Effects of Levosimendan on Isoproterenol-Induced Myocardial Injury in High-Fat-Fed Rats Involves Modulation of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Inhibition of Apoptosis: Comparison to Cilostazol. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2018;23:456-471.

- [96] Bent F, Plaschke K, Levosimendan's effect on platelet function in a rat sepsis model. *Platelets*. 2013;24:189–193.
- [97] Riondino S, Lotti LV, Cutini L, Pulcinelli FM,. Collagen-induced platelet shape change is not affected by positive feedback pathway inhibitors and cAMP-elevating agents, *J. Biol. Chem.* 2005;280:6504–6510.
- [98] Huang HC, Tsai HJ, Wang CC, Tsao CM, Ka SM, Liaw WJ, Wu CC,. Levosimendan mitigates coagulopathy and organ dysfunction in rats with endotoxemia. *J Chin Med Assoc.* 2017;80:432-441.
- [99] Li M, Zhang Y, Wan Q, Li Y, Qu T, Yuan F,. Use of levosimendan combined with Shenfu injection to treat acute heart failure patients with hypotension: a prospective randomized controlled single-blind study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2022;22:130.
- [100] Lelonek M, Stopczyńska I, Korościk E, Straburzyńska-Migaj E, Gruchała M,. Multicenter experiences with levosimendan therapy and its safety in patients with decompensated advanced heart failure. *Adv Clin Exp.* 2020;29:1305-1312.
- [101] Mushtaq S, Andreini D, Farina S, Salvioni E, Pontone G, Sciomer S, Volpato V, Agostoni P,. Levosimendan improves exercise performance in patients with advanced chronic heart failure. *ESC Heart Fail.* 2015;2:133–141.
- [102] Qu C, Feng W, Zhao Q, Liu Q, Luo X, Wang G, Sun M, Yao Z, Sun Y, Hou S, Zhao C, Zhang R, Qu X,. Effect of Levosimendan on Acute Decompensated Right Heart Failure in Patients With Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:778620.
- [103] Mansiroglu AK, Oner E, Erturk M, Karakurt H, Somuncu MU, Birant A, Kalkan Ak, Ozturk D, EksikA,. Assessment of sustained effects of levosimendan on right ventricular systolic functions in patients with advanced heart failure. *Acta Cardiol.* 2016;71:411-415.
- [104] Cheng Z, Cai K, Xu C, Zhan Q, Xu X, Xu D, Zeng Q,. Prognostic Value of Serum Galectin-3 in Chronic Heart Failure: A Meta-Analysis. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:783707.

- [105] Xu J, Song Z, Li L, Liu W, Zhang M, Li J,. Effects of different doses of levosimendan combined with Shenmai injection on immune function and galectin-3 and HSP70 levels in rats with acute heart failure. *ALL LIFE*. 2021;1:1073–1080.
- [106] Yao L, Tan Y, Chen F,. Correlation between galectin-3, RDW, Hpc, HS and ferritin and prognosis of patients with acute onset of chronic heart failure. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022;22:471.
- [107] Schindler EI, Szymanski JJ, Hock KG, Geltman EM, Scott MG,. Short- and Long-term Biologic Variability of Galectin-3 and Other Cardiac Biomarkers in Patients with Stable Heart Failure and Healthy Adults. *Clin Chem*. 2016;62:360-366.
- [108] Lin G, Dong B, Li Y, Huang W,. Diagnostic value of cardiac magnetic resonance imaging for myocardial fibrosis in patients with heart failure and its predictive value for prognosis. *Am J Transl Res* 2022;14:4657-4665.
- [109] Parissis JT, Adamopoulos S, Farmakis D, Filippatos G, Paraskevaidis I, Panou F, Iliodromitis E, Kremastinos DTh,. Effects of serial levosimendan infusions on left ventricular performance and plasma biomarkers of myocardial injury and neurohormonal and immune activation in patients with advanced heart failure. *Heart*. 2006;92:1768–1772.
- [110] Fedele F, Bruno N, Brasolin B, Caira C, D'Ambrosi A, Mancone M,. Levosimendan improves renal function in acute decompensated heart failure: possible underlying mechanisms. *Eur J Heart Fail*. 2014;16:281-288.
- [111] Chen Y, Fu W, Zheng Y, Yang J, Liu Y, Qi Z, Wu M, Fan Z, Yin K, Chen Y, Gao W, Ding Z, Dong J, Li Q, Zhang S, Hu L,. Galectin 3 enhances platelet aggregation and thrombosis via Dectin-1 activation: a translational study. *Eur Heart J*. 2022;ehac034.
- [112] Budak YU, Huysal K, Demirci H,. Correlation between mean platelet volume and B-type natriuretic peptide concentration in emergency patients with heart failure. *Biochem Med*.2015;25:97-102.

## 10. Wykaz ryciny

Ryc. 1. Struktura chemiczna: A. Simendanu; B. Lewosimendanu; C. Dextrosimendan	13
Ryc. 2. Lewosimendan- mechanizm rozszerzający naczynia krwionośne	17
Ryc. 3. Szlak metaboliczny powstawania głównych metabolitów lewosimendanu	19
Ryc. 4. Struktura chemiczna: A. Inhibitor PDE III (Milrinon); B. Lewosimendan	26
Ryc. 5. Klasyfikacje HF z uwzględnieniem LVEF	27
Ryc. 6. Podstawowe badania laboratoryjne wykonywane podczas diagnostyki niewydolności serca	30
Ryc. 7. Algorytm rozpoznawania HF	31
Ryc. 8. Leki stosowane w leczeniu pacjentów z HF	32
Ryc. 9. Przykładowe czynniki wywołujące ostrą dekomensację przewlekłej niewydolności serca	34
Ryc. 10. Procesy patofizjologiczne, które mogą prowadzić do podwyższonego poziomu troponin	49
Ryc. 11. Uproszczony schemat procesu hemostazy	51
Ryc. 12. Uprozczone etapy oddziaływania plazminy z fibryną oraz fibrynogenem- powstanie FDP	69
Ryc. 13. Kryteria włączenia i wyłączenia z badanie	72
Ryc. 14. Punkty czasowe, w których pobierano materiał	73
Ryc. 15. Schemat układu pomiarowego tromboelastografu TEG®	76
Ryc. 16. Schemat mikrochip'u AR	80
Ryc. 17. Zmiana wartości AUC w teście z wykorzystaniem ADP	89
Ryc. 18. Zmiana wartości AUC w teście z wykorzystaniem kwasu arachidonowego	89
Ryc. 19. Zmiana wartości AUC w teście COL	91

Ryc. 20. Zmiana wartości AUC w teście z ristocetyną	92
Ryc. 21. Zmiana wartości AUC w teście z wykorzystaniem TRAP	93
Ryc. 22. Zmiana stopnia zahamowania płytek krwi w formowaniu skrzepu w czasie. A. Test z wykorzystaniem ADP; B. Test z wykorzystaniem AA	94
Ryc. 23. Zmiany wartości parametru R w czasie badania	96
Ryc. 24. Zmiany wartości parametru K w czasie badania	96
Ryc. 25. Zmiany wartości parametru Angle w czasie badania	97
Ryc. 26. Zmiany wartości parametru MA w czasie badania	98
Ryc. 27. Zmiany wartości parametru LY30 w czasie badania	99
Ryc. 28. Zmiana stężenia lewosimendanu oraz jego aktywnych metabolitów w czasie badania. A. Lewosimendan; B. OR-1855 oraz OR-1896	100
Ryc. 29. Zmiana stężenia BNP w czasie trwania badania	101
Ryc. 30. Zmiana stężenia hs-cTnI w czasie trwania badania	102
Ryc. 31. Różnice procentowe w medianach stężeń hs-cTnI w odniesieniu do punktu wyjściowego	103
Ryc. 32. Zmiana stężenie galektyny-3 w czasie	104
Ryc. 33. Różnice procentowe w medianach stężeń galektyny-3 względem punktu wyjściowego	104
Ryc. 34. Zmiany stężenia CRP w czasie trwania badania	105
Ryc. 35. Zmiany stężenia kreatynina w czasie trwania badania	106

## 11. Wykaz tabel

Tabela 1. Główne mechanizmy działania lewosimendanu	14
Tabela 2. Profil badania	21
Tabela 3. Wyniki pierwszorzędowego oraz drugorzędowego punktu końcowego badania SURVIVE	22
Tabela 4. Izoenzymy fosfodiesterazy wraz z miejscami występowania w organizmie człowieka oraz hydrolizowane cząsteczki	24
Tabela 5. Klasyfikacja czynnościowa wg NYHA	28
Tabela 6. Podawane dożylnie leki rozszerzające naczynia	37
Tabela 7. Leki o działaniu inotropowym dodatnim	37
Tabela 8. Dostępne badania oceniające poziom BNP u pacjentów leczonych lewosimendanem	44
Tabela 9. Zawartość ziarnistości występujących w płytkach krwi	54
Tabela 10. Podział receptorów integrynowych	56
Tabela 11. Osoczowe czynniki krzepnięcia	63
Tabela 12. Główne czynniki biorące udział w procesie fibrynolizy	67
Tabela 13. Ogólna charakterystyka grupy badanej	86
Tabela 14. Zmiana wartości parametrów systemu T-TAS w czasie	95
Tabela 15. Korelacja stężenia galektyny-3 oraz testów funkcji płytek krwi w pierwszym i ostatnim punkcie czasowym	106
Tabela 16. Korelacja stężenia BNP oraz testów funkcji płytek krwi w pierwszym i ostatnim punkcie czasowym	107



**Załącznik**

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy

**KOMISJA BIOETYCZNA**

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

---

**KB 185/2016**

Bydgoszcz, 23.02.2016r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

**Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy**

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **23.02.2016r.** przeanalizowała wniosek, który złożył kierownik badania:

**prof. dr hab. n. med. Jacek Kubica,  
Katedra Kardiologii i Chorób Wewnętrznych  
Collegium Medicum w Bydgoszczy**

z zespołem w składzie:

- **prof. dr hab. n. med. Jacek Kubica, prof. dr hab. n. med. Grzegorz Grzešek,  
prof. dr hab. n. med. Danuta Rość, mgr Katarzyna Stankowska, dr n. med. Joanna  
Boińska, dr n. med. Karolina Obońska, dr n. med. Joanna Sikora, Przemysław Sobczak,  
lek. Krzysztof Pstrągowski, mgr Emilia Siemińska**

w sprawie badania:

**„Wpływ lewosimendanu oraz jego aktywnych metabolitów OR-1896 i OR-1855  
na aktywność płytek krwi.”**

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

**Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku**

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

***Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (26.01.2016 r.) do końca 2018 r.***

*Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.*

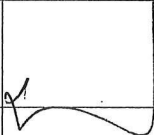
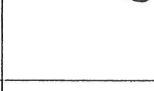


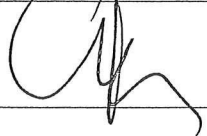
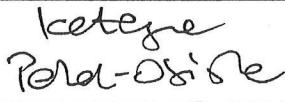
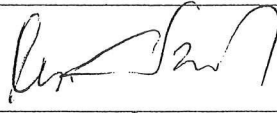

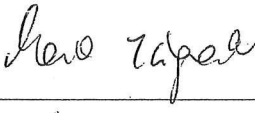
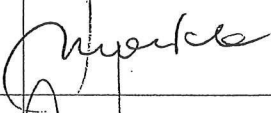
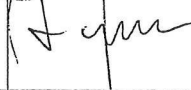
*Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.*

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:  
prof. dr hab. n. med. Jacek Kubica,  
Katedra Kardiologii i Chorób Wewnętrznych  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

**Lista obecności**  
**na posiedzeniu Komisji Bioetycznej**  
**w dniu 23.02.2016 r.**

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	przewodniczący	
2.	Prof. dr hab. Adam Buciński	z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
4.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
9.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
10.	Dr hab. n. med. Maria Kłopotcka		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas		
13.	Mgr piel. Hanna Ziemniarska		